



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCar/UNESP**

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Departamento de Fármacos e Medicamentos - Laboratório de
Farmacologia**

**Recuperação espontânea, curso temporal e influência
circadiana na habituação das respostas
cardiovasculares ao estresse de restrição repetido em
ratos**

Aluno: Carlos Eduardo dos Santos
Orientador: Pof. Dr. Carlos Cesar Crestani
Co-orientador: Dr. Ricardo Benini

Araraquara
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Carlos Eduardo dos Santos, realizada em 30/04/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani (UNESP)

Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso (UNESP)

Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves (UFLA)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Carlos Eduardo dos Santos, realizada em 30/04/2020:

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP

Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso
UNESP

Prof. Dr. Fernando Henrique Ferrari Alves
UFLA

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Sandra Lia do Amaral Cardoso, Fernando Henrique Ferrari Alves e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

RESUMO

O estresse está envolvido na etiologia de diversas doenças cardiovasculares. Essas doenças estão relacionadas a alterações morfofuncionais desencadeadas pela exposição crônica a eventos aversivos. Entretanto, um importante mecanismo adaptativo que parece reduzir as alterações morfofuncionais e as doenças relacionadas ao estresse é a progressiva redução das respostas fisiológicas e comportamentais durante a exposição repetida a um mesmo estímulo estressor, um fenômeno chamado habituação. Apesar da relevância do processo de habituação, os mecanismos relacionados com esse fenômeno ainda são pouco compreendidos. Dessa forma, os objetivos desse estudo foram: 1) avaliar em ratos quantos dias de estresse de restrição são necessários para ocorrer a habituação das respostas cardiovasculares; 2) identificar quantos dias de interrupção do protocolo de estresse de restrição repetido (ERR) são necessários para a recuperação da habituação das respostas cardiovasculares (i.e., recuperação espontânea); e 3) verificar se o período do dia influencia a magnitude do processo de habituação das respostas cardiovasculares. Avaliamos também a habituação da resposta de corticosterona ao ERR. Observamos que o aumento de corticosterona circulante diminuiu na 10ª sessão de restrição no período de estresse e recuperação em relação à resposta de animais estressados agudamente. A habituação das respostas cardiovasculares foi identificada como um retorno mais rápido da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA) aos valores basais durante o período de recuperação da 10ª sessão de restrição. A habituação da FC e da PA foram observadas após 10 dias de descontinuação da exposição ao protocolo de ERR. No entanto, a recuperação espontânea de ambas as respostas cardiovasculares habitadas foi observada 20 dias após a última sessão de ERR. A análise do curso temporal revelou valores diminuídos da resposta de FC durante o período de recuperação na 3ª sessão de restrição, sem redução adicional na 5ª, 7ª e 10ª sessões. A diminuição da resposta da PA foi identificada na 3ª e 5ª sessões, enquanto resposta reduzida da temperatura cutânea da cauda foi observada apenas na 5ª e 7ª sessões. Em relação à hora do dia, foi identificada a habituação da resposta taquicárdica quando o ERR foi realizado nos períodos da manhã e da noite, mas não à tarde. Em conjunto, esses achados fornecem evidências de recuperação espontânea da habituação de respostas cardiovasculares ao ERR. Os resultados também indicam que a habituação cardiovascular depende do número de exposição ao estímulo aversivo e da hora do dia.

ABSTRACT

Stress is related to the development of several cardiovascular diseases. These diseases are related to morphofunctional changes that can be triggered by chronic exposure to aversive events. However, an important adaptive mechanism that seems to reduce morphofunctional changes and diseases is the progressive reduction in physiological responses upon repeated exposure to the same stressor stimulus, a phenomenon called habituation. Despite the relevance of the habituation process, the mechanisms related to this phenomenon are still poorly understood. Thus, the objectives of this study were: 1) to evaluate in male rats how many days of restraint stress are necessary for habituation to occur; 2) identify how many days of interruption of the repeated restraint stress protocol are necessary for the recovery of the habituated response (i.e., spontaneous recovery); and 3) to verify if the period of the day influences the magnitude of the habituation process in rats. We also evaluated the habituation of the corticosterone response to repeated restraint stress. We observed that the increase in serum corticosterone decreased during the stress of recovery period of the 10th session of restraint, when compared to the response of animals acutely stressed. The habituation of cardiovascular responses was identified as a faster return of heart rate (HR) and blood pressure (BP) to baseline values during the recovery period of the 10th restraint session. Habituation of HR and BP was still observed after 10 days of discontinuation of the repeated exposure to restraining stress. However, spontaneous recovery of both habituated responses was observed 20 days after the last session of repeated restraint exposure. Time course analysis revealed decreased HR values during the recovery period at the 3rd restraint session, with no further reduction at the 5th, 7th and 10th sessions. The decrease in BP response was identified at the 3rd and 5th sessions, while reduced response of the tail skin temperature was observed only at the 5th and 7th sessions. Regarding the time of day, habituation to the tachycardic response was identified when repeated restraint stress was performed on the morning and evening, but not in the afternoon. Together, these findings provide evidence of spontaneous recovery of the habituation of cardiovascular responses to repeated restraint stress. The results also indicate that cardiovascular habituation depends on the number of trials and the time of day.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa Rute por estar sempre presente mesmo quando fui ausente, pelo carinho e apoio ofertado em todos os momentos.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela dádiva da vida, pela capacitação e por me mostrar que sou capaz.

Aos colegas e amigos do Laboratório que me apoiaram sem medir esforços, pacientes em todos os momentos e sempre dispostos a ajudar, destaco Lucas Gomes, Willian Ferreira e Ricardo Benini.

Ao Prof. Dr. Crestani pela oportunidade de fazer parte do laboratório, pelo aprendizado, dedicação, paciência e disponibilidade em ensinar.

Aos Professores do Laboratório de Neuropsicofarmacologia que fizeram parte da minha formação e crescimento profissional.

Aos amigos que fiz nessa jornada.

Feliz por ter participado desse processo. Obrigado!

EPÍGRAFE

“Se sou fiel no pouco, Ele me confiará mais!”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Habitução ao estresse	9
1.2 Recuperação espontânea da habituação	10
1.3 Curso temporal da habituação	11
1.4 Influência circadiana no processo de habituação	11
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAS E MÉTODOS	13
3.1 Animais	13
3.2 Estresse de restrição	13
3.3 Canulação da artéria femoral	13
3.4 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca	14
3.5 Registro da temperatura cutânea da cauda	14
3.6 Dosagem de corticosterona	15
3.7 Delineamento experimental	15
<i>3.7.1. Habitução da resposta de corticosterona após a exposição repetida ao estresse de restrição</i>	15
<i>3.7.2. Avaliação da habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição após um período de descontinuação da exposição ao estresse (recuperação espontânea)</i>	16
<i>3.7.3. Influência do número de sessões de estresse na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição (curso temporal)</i>	17
<i>3.7.4. Influência da hora do dia na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição (influência do ritmo circadiano)</i>	17

3.8	Análise estatística	18
4.	RESULTADOS.....	20
4.1	Habituação da resposta de corticosterona decorrente da exposição repetida ao estresse de restrição.....	20
4.2	Avaliação da habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição após um período de descontinuação da exposição ao estresse (recuperação espontânea)	21
4.3	Avaliação da influência do número de sessões de estresse no processo de habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição (curso temporal)	24
4.4	Avaliação da influência da hora do dia no processo de habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição (influência circadiana)	27
5.	DISCUSSÃO	30
5.1	Recuperação espontânea	31
5.2	Influência do número de sessões	32
5.3	Influência da hora do dia	35
6.	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS 2017) mostram que as principais causas de morte do mundo são devidas às patologias do sistema cardiovascular, incluindo doenças isquêmicas e o acidente vascular cerebral (OMS 2017). Além do mais, houve aumento na ocorrência destas incidências na última década, o que vem aumentando o interesse e as pesquisas que visam melhorar a compreensão dos fatores relacionados às doenças do sistema cardiovascular. Nesse sentido, estudos clínicos e pré-clínicos tem evidenciado a importância de fatores psicossociais na etiologia e progressão de doenças cardiovasculares (Carnevali et al., 2013; Carlos C. Crestani, 2016; Friedman, 1959; Grippo & Johnson, 2009; Roest et al., 2010; Rozanski et al., 1999; Rugulies, 2002; Sgoifo et al., 2014; Smith et al., 2004). Dentre os diversos fatores psicossociais, o estresse psicológico tem sido reconhecido como um fator de risco para diversas disfunções cardiovasculares (Inoue, 2014; Steptoe & Kivimäki, 2012, 2013; von, 2012), e esse efeito é independente de fatores de risco cardiovascular tradicionais (por exemplo: idade, sexo, tabagismo, diabetes mellitus e obesidade) (Carlos C. Crestani, 2016; Kivimäki et al., 2006; Rosengren et al., 2004; Steptoe & Kivimäki, 2013).

Um das definições de estresse seria uma resposta neuro-hormonal não-específica de um organismo provocado por um fator prejudicial ou potencialmente prejudicial (Selye, 1970). Essas respostas agudamente provocadas pelo estressor ativa o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema nervoso autônomo simpático (SNS), essa última resposta sendo responsável por alterações cardiovasculares como aumento da frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA) (Sikora et al., 2016). O estresse pode resultar em sérios problemas de saúde como doenças gastrointestinais, neuropsiquiátricas, musculoesqueléticas e cardiovasculares. Desse modo, o aumento nos

níveis de estresse ao longo dos tempos fez com que esse se tornasse um grande problema de saúde pública da sociedade moderna (Dinel et al., 2019).

1.1 Habituação ao estresse

Agudamente, o estresse promove alterações fisiológicas que são importantes para a manutenção da homeostasia, incluindo aumento dos níveis de glicocorticoides circulante, ativação do sistema autônomo simpático e parassimpático, modulação da atividade do barorreflexo, aumento da PA e FC e redistribuição do fluxo sanguíneo (Dampney et al., 2008; Sousa et al., 2015; Ulrich-Lai & Herman, 2009). Apesar dessas respostas serem adaptativas a curto prazo, a exposição repetida ou prolongada a essas alterações fisiológicas podem trazer prejuízos ao indivíduo, especialmente ao sistema cardiovascular, predispondo este indivíduo a doenças (B S McEwen & Stellar, 1993; Bruce S. McEwen, 1998). Nesse sentido, a diminuição das respostas evocadas pelo estresse é frequentemente observada durante a exposição repetida a um mesmo estímulo aversivo não fatal (isto é, estressor homotípico) Grissom & Bhatnagar, 2009; Herman, 2013; McCarty, 2016; Rabasa et al., 2015). Esse fenômeno foi denominado “habituação” (Cyr e Romero, 2009; Rankin et al., 2009; Thompson, 2009; Thompson e Spencer, 1966), e é definido como um processo de aprendizagem (associativo e não associativo) que não envolve adaptação sensorial ou fadiga sensorial/motora (Cyr e Romero, 2009; McCarty, 2016; Rankin et al., 2009; Thompson e Spencer, 1966).

A habituação tem sido proposta como um mecanismo de adaptação a eventos aversivos crônicos, no qual limita os impactos a longo-prazo do estresse crônico, garantindo assim o bem-estar do organismo (Bennett et al., 2018; Cyr e Romero, 2009; Grissom & Bhatnagar, 2009; Herman, 2013; McCarty, 2016). Além disso, a habituação a um estressor repetido conserva energia ao atenuar as respostas a estímulos aversivos

que não ameaçam a vida, o que aumenta a probabilidade de sobreviver a um desafio futuro inesperado (Grissom & Bhatnagar, 2009; McCarty, 2016).

Apesar da relevância do processo de habituação, a maior parte do conhecimento disponível sobre esse processo foi oriundo de estudos que avaliaram a habituação de respostas neuroendócrinas ao estresse (ativação eixo HPA e resposta simpática adrenomedular) (McCarty, 2016), de modo que o processo de habituação das respostas cardiovasculares ao estresse ainda são pouco compreendidas (Crestani, 2016). Além disso, os mecanismos e fatores relacionados com o processo de habituação ainda precisam ser explorados.

1.2 Recuperação espontânea da habituação

A reversibilidade da habituação após um período de descontinuação da exposição ao estímulo aversivo (isto é, recuperação espontânea) foi proposta como uma característica relevante para demonstrar que a diminuição de uma resposta é habituação e não uma diminuição inespecífica decorrente de dessensibilização ou fadiga (Rankin et al., 2009; Thompson, 2009; Thompson e Spencer, 1966). No entanto, apenas alguns estudos avaliaram a recuperação espontânea de respostas fisiológicas habituadas, e até o momento, nenhum estudo demonstrou consistentemente esse fenômeno (McCarty, 2016). Por exemplo, estudos identificaram sinais de habituação da resposta de ativação do eixo HPA 20 a 60 dias após a última sessão do protocolo de estresse homotípico (Bhatnagar et al., 2002; Nyhuis et al., 2010; Rabasa et al., 2015). Além disso, recuperação espontânea da habituação das respostas cardiovasculares ao estresse nunca foi avaliada.

Baseado nas informações mencionadas acima, uma das propostas do presente estudo foi investigar o tempo necessário para a recuperação espontânea da habituação

das respostas cardiovasculares decorrentes da exposição repetida ao estresse de restrição.

1.3 Curso temporal da habituação

Uma característica proposta para a habituação das respostas ao estresse é que esse processo ocorre progressivamente a cada exposição ao estímulo aversivo (Thompson & Spencer, 1966; Rankin et al., 2009). No entanto, apesar do relato de algumas evidências de habituação progressiva das respostas neuroendócrinas durante a exposição repetida ao estímulo aversivo (De Boer et al., 1988; SF De Boer et al., 1990; Keim e Sigg, 1976; Lachuer et al., 1994; Pfister, 1979; Rabasa et al., 2013), alguns estudos relataram habituação da resposta do eixo HPA já no início do protocolo homotípico, sem redução adicional com exposição adicional ao estímulo aversivo (Rabasa et al., 2015, 2013, 2011). Além disso, foi relatada uma recuperação espontânea da habituação do eixo HPA e das respostas cardiovasculares ainda durante a exposição ao protocolo homotípico (Benini et al., 2019; Gomez et al., 2002; Lachuer et al., 1994). Portanto, o curso temporal do processo de habituação ainda é debatido na literatura (Rabasa et al., 2015). *Desse modo, uma segunda proposta do presente estudo foi avaliar o curso temporal de habituação das respostas cardiovasculares durante a exposição repetida ao estresse de restrição.*

1.4 Influência circadiana no processo de habituação

Além das características inerentes ao estímulo estressor, o processo de habituação também pode ser determinado por fatores inespecíficos. Nesse sentido, o ritmo circadiano é um fator potencial que afeta a habituação. De fato, uma extensa literatura demonstra que as respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse exibem

uma variação circadiana. Por exemplo, a influência da hora do dia foi amplamente relatada nas alterações do eixo HPA evocadas por estresse (Dunn et al., 1972; Fonken et al., 2016; Kant et al., 1986; Kräuchi et al., 1983; Tannenbaum et al., 1997; Torrellas et al., 1981). Influência circadiana nas alterações comportamentais, do sono, do peso corporal, na ingestão de alimentos e em respostas inflamatórias induzidas por estímulos aversivos também foi reportada (Cohen et al., 2015; Daut et al., 2020; Fonken et al., 2016; Koehl et al., 2002; Kräuchi et al., 1983; Kusnecov et al., 1995; Rybkin et al., 1997; Torrellas et al., 1981). No entanto, a influência do ritmo circadiano no processo de habituação é pouco conhecida (Retana-Márquez et al., 2003). *Desse modo, uma segunda proposta do presente estudo foi avaliar a influência da hora do dia na habituação das respostas cardiovasculares durante a exposição repetida ao estresse de restrição.*

2. OBJETIVOS

Avaliar a resposta sérica à corticosterona após exposição repetida ao estresse de restrição para reproduzir os dados bem estabelecidos sobre a habituação da ativação do eixo HPA;

Identificar o curso temporal e a influência do ritmo circadiano na habituação das respostas cardiovasculares após exposição repetida ao estresse de restrição repetido em ratos;

Encontrar a recuperação espontânea após um período de interrupção da exposição ao estímulo aversivo relacionado ao protocolo de estresse de restrição repetido;

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 150 ratos Wistar com peso aproximado de 250 gramas (60 dias de idade). Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP). Os animais foram transferidos para o biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP) no mínimo sete dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (40x32x16cm, sendo quatro por caixa) em condições controladas de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 7:00 h às 19:00 h), com acesso livre a água e alimento (Presence, Neovia, São Paulo, Brasil). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR/UNESP (aprovação nº 39/2018).

3.2 Estresse de restrição

O estresse de restrição consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro=6,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preenchem aproximadamente 20% do tubo) (Barron & Van Loon, 1989; C. C. Crestani et al., 2009; Carlos C. Crestani et al., 2010; McDougall, 2005). Imediatamente após o término da sessão de restrição os animais retornaram para a caixa moradia.

3.3 Canulação da artéria femoral

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg, i.p.) e foi implantado um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares. Após implantação do cateter, este foi exteriorizado na região dorsal do animal e fixado à pele por sutura cirúrgica. Os animais receberam o anti-inflamatório não-esteroidal

flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) para analgesia pós-operatória e uma formulação de antibiótico contendo estreptomicinas e penicilinas para prevenir a infecção (560 mg / mL / kg, i.m.). Os animais foram mantidos em caixas individuais após a cirurgia.

3.4 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., EUA) através de um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial pulsátil foi registrada utilizando um amplificador (Bridge ML221, ADInstruments, Austrália), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML 866, ADInstruments, Austrália). Os valores de pressão arterial média (PAM) e FC foram obtidos a partir do sinal de pressão arterial pulsátil.

3.5 Registro da temperatura cutânea da cauda

A temperatura da pele da cauda foi usada como uma medida indireta da vasoconstrição cutânea mediada por ativação simpática vasomotora (Ahmed et al., 2003; Busnardo et al., 2013; Vianna & Carrive, 2005). A temperatura cutânea da cauda foi registrada utilizando um termovisor (IRI4010, InfraRed Integrated Systems Ltd, Northampton, Reino Unido). Para análise das imagens, a temperatura foi medida em cinco pontos ao longo da cauda do rato, e uma média dos valores foi calculada para cada registro (Busnardo et al., 2013).

3.6 Dosagem de corticosterona

A corticosterona sérica foi mensurada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando kit comercialmente disponível (Cayman chemical, Michigan-USA). Para a mensuração foram realizadas coletas sanguíneas de 0,2ml por meio da cânula implantada na artéria femoral. Para a obtenção do soro, as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 1 hora para a coagulação do sangue, sendo posteriormente centrifugadas a 2000xg por 15 minutos. Após a centrifugação, o soro foi separado e estocado em freezer -80°C para posterior análise.

3.7 Delineamento experimental

Exceto para experimentos que avaliaram a influência do ritmo circadiano (*ver descrição abaixo*), em todos os outros protocolos as sessões de estresse de restrição e as medidas fisiológicas (ou seja, cardiovascular e corticosterona) foram realizadas durante o período da manhã. No dia do teste, os animais em todos os protocolos foram transferidos para a sala experimental em sua caixa moradia, e foi permitido um período de 60 minutos para que os animais se adaptassem às condições da sala de registro, como som e iluminação, antes de iniciar o experimento. Na sala do experimento a temperatura era controlada (24°C) e isolada acusticamente das outras salas do laboratório.

3.7.1. Habituação da resposta de corticosterona após a exposição repetida ao estresse de restrição

Este protocolo teve como objetivo avaliar a habituação da ativação do eixo HPA após exposição repetida ao estresse de restrição. Para isso, avaliamos o aumento causado pela restrição na concentração sérica de corticosterona em um conjunto diferente de ratos submetidos a (1) uma sessão aguda de 120 minutos de estresse de

restrição (grupo agudo) ou (2) dez sessões diárias de 120 minutos de estresse de restrição (estresse de restrição repetido - ERR). A resposta de corticosterona do grupo ERR foi avaliada na 10ª sessão de restrição, e os valores foram comparados com os obtidos no grupo agudo. Amostras de sangue (~ 200 µL) para determinação da concentração sérica de corticosterona foram coletadas a partir do cateter da artéria femoral imediatamente antes (basal) e 15, 60, 90, 120, 140, 160 e 180 minutos após o início da sessão de estresse de restrição.

3.7.2. Avaliação da habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição após um período de descontinuação da exposição ao estresse (recuperação espontânea)

Este protocolo teve como objetivo avaliar a recuperação da habituação das respostas cardiovasculares decorrentes da exposição repetida ao estresse de restrição após um período de descontinuação da exposição à restrição. Para isso, avaliamos as respostas de aumento da PAM e FC e a queda da temperatura da pele da cauda causadas pelo estresse de restrição em diferentes grupos experimentais: (1) uma sessão aguda de 120 minutos de estresse de restrição (agudo), (2) dez sessões diárias de 120 minutos de estresse de restrição (ERR), (3) dez sessões diárias de 120 minutos de estresse de restrição, seguidos por 10 dias sem estresse (ERR + 10 dias) e (4) dez sessões diárias de 120 minutos de estresse por restrição, seguidos por 20 dias sem estresse (ERR + 20 dias). Os animais do grupo agudo não foram perturbados, com exceção da limpeza das caixas, e foram mantidos no biotério pelo mesmo período que os animais submetidos aos protocolos de ERR. Além disso, a sessão aguda de restrição foi realizada no mesmo dia dos animais estressados cronicamente. As respostas cardiovasculares do grupo ERR foram registradas na 10ª sessão de restrição. Alterações cardiovasculares durante uma

sessão de 120 minutos de estresse de restrição nos grupos “ERR + 10 dias” e “ERR + 20 dias” foram obtidas 10 e 20 dias após a 10ª sessão do protocolo ERR, respectivamente.

3.7.3. Influência do número de sessões de estresse na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição (curso temporal)

Este protocolo teve como objetivo avaliar a influência do número de sessões de estresse de restrição no processo de habituação das respostas cardiovasculares. Para isso, investigamos as respostas de aumento da PAM e FC e a diminuição da temperatura da pele da cauda desencadeadas pelo estresse de restrição em diferentes grupos de ratos submetidos a 1 (grupo agudo), 3, 5, 7 ou 10 sessões diárias de 120 minutos de estresse por restrição. As respostas cardiovasculares foram registradas na última sessão de restrição nos grupos submetidos à exposição repetida ao estresse de restrição.

3.7.4. Influência da hora do dia na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição (influência do ritmo circadiano)

Este protocolo teve como objetivo avaliar a influência do ritmo circadiano na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. Para isso, investigamos as respostas de aumento da PAM e FC e a queda da temperatura da pele da cauda desencadeadas pelo estresse de restrição em diferentes grupos de ratos submetidos a (1) uma sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição realizada durante o período da manhã (8h) (agudo manhã), (2) dez sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição realizados durante o período da manhã (ERR manhã), (3) uma sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição realizada durante o período da tarde (14h) (agudo tarde), (4) dez sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição realizados durante o período da tarde (ERR tarde), (5) uma sessão aguda de 60 minutos

de estresse de restrição realizada durante o período noturno (20h) (agudo noite); e (6) dez sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição realizados durante o período noturno (ERR noite). Os animais dos grupos agudos foram deixados em repouso, exceto para a limpeza das gaiolas no biotério pelo mesmo período que os ratos dos grupos ERR, e foram submetidos à sessão aguda de restrição no mesmo dia dos animais estressados cronicamente. As respostas cardiovasculares dos grupos ERR foram registradas na 10ª sessão de restrição.

Para os registros cardiovasculares, os registros da PA e da FC começaram pelo menos 30 minutos antes do início da sessão de estresse e foram realizados durante todo o período de restrição. A temperatura da pele da cauda foi medida 10, 5 e 0 minutos antes da restrição e a cada 10 minutos durante a sessão de estresse. A PA, a FC e a temperatura cutânea da cauda também foram registradas na caixa moradia após o final da sessão de estresse de restrição (período de recuperação).

3.8 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores basais (isto é, níveis pré-estresse) da PAM, FC e temperatura cutânea da cauda dos protocolos que avaliaram a recuperação espontânea e o curso temporal foram comparados usando ANOVA monofatorial. Os parâmetros cardiovasculares basais dos dados obtidos no protocolo que avaliou a influência do ritmo circadiano foram comparados usando a ANOVA bifatorial, com estresse (agudo vs repetido) e hora do dia (manhã vs tarde vs noite) como fatores principais. As curvas temporais da resposta de corticosterona foram comparadas usando ANOVA bifatorial, com estresse (agudo vs repetido) como fator principal e tempo como medida repetida. As curvas temporais das alterações cardiovasculares dos protocolos que avaliaram a recuperação espontânea e o

curso temporal foram analisadas usando ANOVA bifatorial, com estresse (agudo vs repetido) como fator principal e tempo como medida repetida. As curvas temporais das alterações cardiovasculares no protocolo que avaliou a influência do ritmo circadiano foram analisadas usando a ANOVA multifatorial, com estresse (agudo vs repetido) e hora do dia (manhã vs tarde vs noite) como fatores principais e tempo como medida repetida.

A média de todos os pontos durante o estresse de restrição e o período de recuperação nas curvas temporais também foi calculada (ou seja, resposta média ao longo do período de "estresse" e "recuperação"), e esses valores foram comparados usando ANOVA bifatorial ou multifatorial, como descrito acima para análise das curvas temporais. Quando a ANOVA indicou interação entre os fatores, o teste *post hoc* de Bonferroni foi realizado para identificação de diferenças específicas entre os grupos experimentais. A significância em todas as análises foi estabelecida em $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Habituação da resposta de corticosterona decorrente da exposição repetida ao estresse de restrição

A análise dos valores basais (isto é, valores pré-estresse) da concentração sérica de corticosterona indicou diferenças nos animais submetidos ao estresse de restrição agudo versus repetido (ERR) (38 ± 12 vs 11 ± 3 ng/ml, $t=2,18$, $P=0,0466$). A análise das curvas temporais da concentração sérica de corticosterona indicou efeito do estresse ($F_{(1,14)}=25$, $P=0,0002$) e do tempo ($F_{(7,98)}=25$, $P<0,0001$), bem como uma interação estresse x tempo ($F_{(7,98)}=2,6$, $P=0,0192$) (Figura 1). A análise *post-hoc* revelou que os valores do grupo ERR foram menores ao longo do período de estresse e recuperação (Figura 1). A análise das respostas séricas médias de corticosterona ao longo do período de restrição e recuperação também indicou efeito do estresse ($F_{(1,14)}=21$, $P=0,0004$) e do tempo ($F_{(7,98)}=18$, $P=0,0007$), mas sem interação estresse x tempo ($F_{(7,98)}=3,6$, $P=0,0779$) (Figura 1).

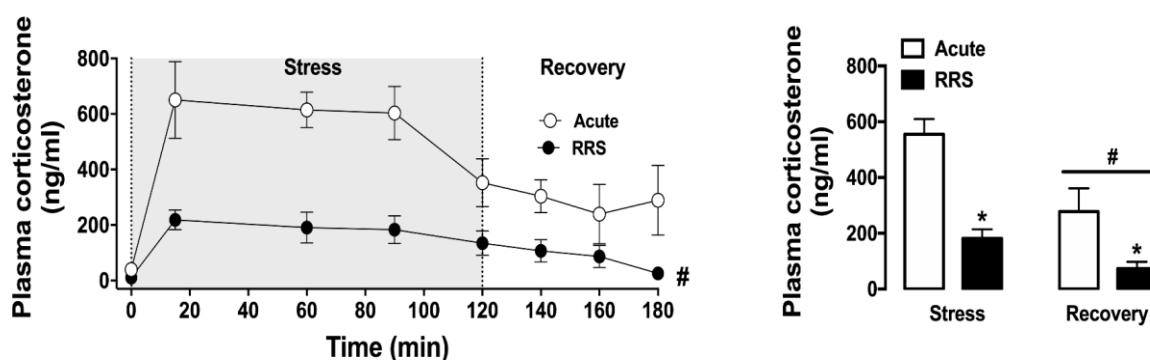


Figura 1: Habituação da resposta de corticosterona sérica ao estresse de restrição. **(Esquerda)** Curvas temporais das alterações na concentração sérica de corticosterona na 1ª sessão (agudo, círculos brancos, $n=8$) e na 10ª sessão (RRS, círculos pretos, $n=8$) de 120 min de estresse de restrição. A área sombreada indica o período de restrição. Os círculos representam a média±EPM. # $P<0,05$ durante todo o período em comparação com o grupo agudo, ANOVA bifatorial, seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. **(Direita)** Valores médios de corticosterona durante todo o período de restrição e recuperação na primeira (aguda, barras brancas, $n=8$) e na 10ª sessão (RRS, barras pretas, $n=8$) de 120 minutos de estresse de restrição. As barras representam a média±EPM. * $P<0,05$, indicando o efeito principal do estresse, # $P<0,05$, indicando o efeito principal do tempo. ANOVA bifatorial.

4.2 Avaliação da habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição após um período de descontinuação da exposição ao estresse (recuperação espontânea)

A análise dos valores basais de PAM ($F_{(3,29)}=0.06$, $P=0.9765$), FC ($F_{(3,29)}=0.11$, $P=0.9480$) e temperatura cutânea da cauda ($F_{(3,29)}=0.62$, $P=0.6054$) não indicou diferenças significativas entre os grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1 –Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (T) e tamanho da amostra (n).

	PAM (mmHg)	FC (bpm)	T(°C)	N
Agudo	106±2.8	334±6.9	31±0.7	8
ERR	107±2	340±9.4	30±0.6	8
ERR + 10 dias	107±3.6	339±12.2	31±0.7	8
ERR + 20 dias	106±2.6	342±7.9	31±0.5	9

ANOVA monofatorial.

A análise das curvas temporais de PAM e da FC indicou efeito do tempo (PAM: $F_{(95,2755)}=27$, $P<0,0001$; FC: $F_{(95,2755)}=18$, $P<0,0001$) e uma interação estresse x tempo (PAM: $F_{(285,2755)}=1,6$, $P<0,0001$; FC: $F_{(285,2755)}=1,9$, $P<0,0001$), mas sem influência do estresse (PAM: $F_{(3,29)}=1,17$, $P=0,3379$; FC: $F_{(3,29)}=1,13$, $P=0,3505$) (Figura 2). A análise *post-hoc* revelou respostas diminuídas de PAM e FC durante momentos específicos do período de recuperação nos grupos ERR ($P<0,05$) e ERR+10 dias ($P<0,05$), mas não no grupo ERR+20 dias ($P>0,05$) (Figura 2). A análise das curvas temporais da temperatura cutânea da cauda indicou efeito do tempo ($F_{(13,390)}=32$, $P<0,0001$), mas sem influência

do estresse ($F_{(3,29)}=1,8$, $P=0,147$) e interação estresse x tempo ($F_{(39,390)}=1,1$, $P=0,4371$) (Figura 2).

A análise da resposta média da PAM ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do estresse ($F_{(3,29)}=3,1$, $P=0,0397$) e do tempo ($F_{(1,29)}=45$, $P<0,0001$) e interação estresse x tempo ($F_{(3,29)}=3,4$, $P=0,0293$) (Figura 2). A análise da resposta média da FC durante todo o período de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ($F_{(1,29)}=9,2$, $P=0,0051$) e interação estresse x tempo ($F_{(3,29)}=2,9$, $P=0,0495$), mas sem influência do estresse ($F_{(3,29)}=2,0$, $P=0,1294$) (Figura 2). A análise *post-hoc* revelou valores diminuídos da PAM e da FC durante o período de recuperação nos grupos ERR ($P<0,05$) e ERR+10 dias ($P<0,05$), mas não no grupo RRS+20 dias ($P>0,05$) (Figura 2) A análise da variação da temperatura cutânea da cauda indicou efeito do tempo ($F_{(1,29)}=18$, $P=0,0002$), mas sem influência do estresse ($F_{(3,29)}=1,9$, $P=0,1480$) e interação estresse x tempo ($F_{(3,29)}=0,8$, $P=0,4954$) (Figura 2).

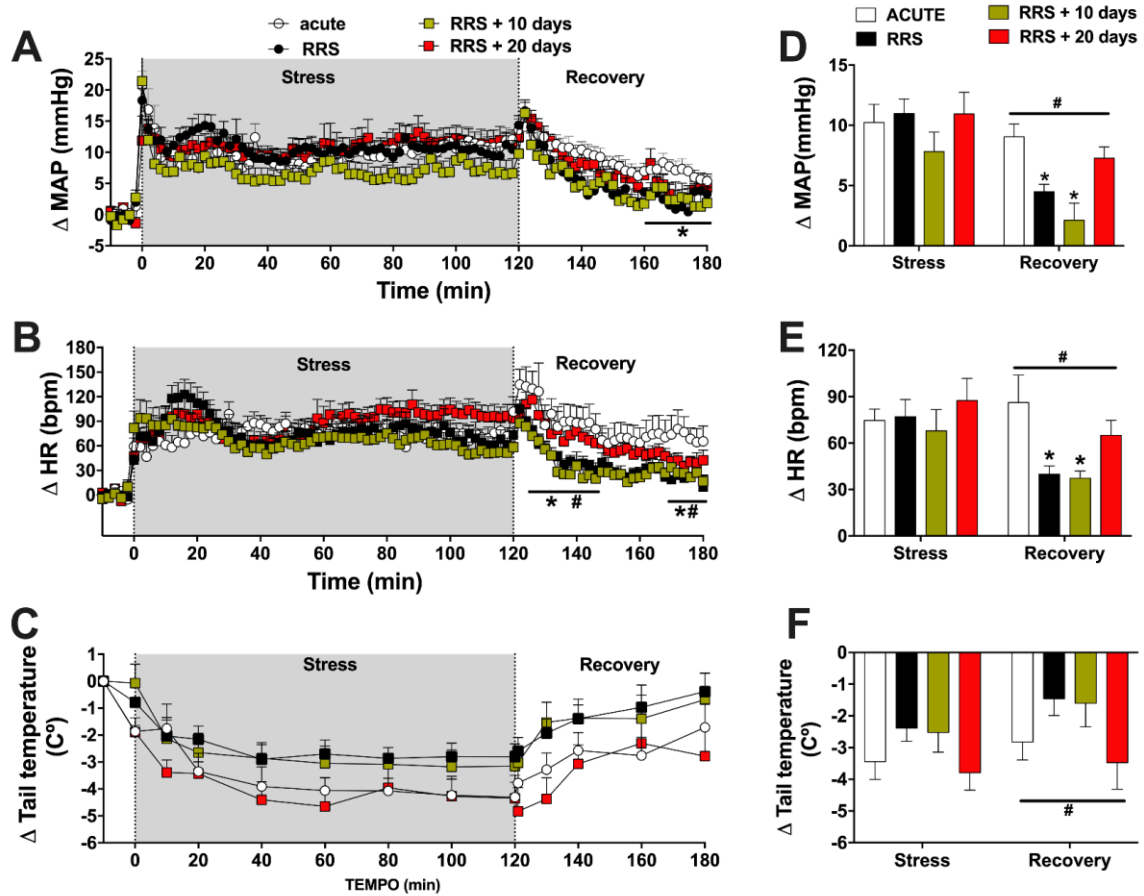


Figura 2: Recuperação espontânea da habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. (A – C) Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ T) durante a primeira sessão (agudo, círculos brancos, n=8) e a décima sessão (ERR, círculos pretos, n=8) de restrição, bem como 10 (RRS + 10 dias, círculos verdes, n=8) e 20 dias (RRS + 20 dias, círculos vermelhos, n=9) após a última sessão (10ª sessão) do protocolo ERR. A área sombreada indica o período de restrição. Os círculos representam a média e as barras o EPM. * $P < 0,05$, ERR versus agudo; # $P < 0,05$, ERR + 10 dias versus agudo. ANOVA bifatorial seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. (D – F) Δ PAM, Δ FC e Δ temperatura da cauda ao longo do período de estresse e recuperação nos grupos agudo (barras brancas, n=8), RRS (barras pretas, n=8), RRS + 10 dias (barras verdes, n=8) e RRS + 20 dias (barras vermelhas, n=9). As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ versus o grupo agudo no mesmo período, # $P < 0,05$ indicando o efeito principal do tempo. ANOVA bifatorial seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

4.3 Avaliação da influência do número de sessões de estresse no processo de habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição (curso temporal)

A análise dos valores basais de PAM ($F_{(4,38)}=0.38$, $P=0.8176$), FC ($F_{(4,38)}=2.6$, $P=0.0472$) e temperatura cutânea da cauda ($F_{(4,38)}=2.6$, $P=0.0793$) não indicou diferenças significativas entre os grupos experimentais (Tabela 2).

Tabela 2 – Média dos Parâmetros basais da pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (T).

	PAM (mmHg)	FC (bpm)	T(°C)	N
Agudo	106±2.8	357±4.6	31±0.7	8
ERR 3 dias	109±1.9	366±7.3	29±0.6	9
ERR 5 dias	105±3	389±8.6	29±0.9	9
ERR 7 dias	106±2.7	378±12.4	30±0.6	8
ERR 10 dias	107±2	356±8.4	30±0.6	9

N = número de ratos por grupo; * $P < 0.05$ verso respectivo grupo agudo. Teste Anova (one-way).

A análise das curvas temporais de variação da PAM, FC e temperatura cutânea da cauda indicou efeito do estresse (PAM: $F_{(4,38)}=4,1$, $P=0,0080$; FC: $F_{(4,38)}=4,5$, $P=0,0049$; temperatura: $F_{(4,38)}=8,9$, $P<0,0001$) e do tempo (MAP: $F_{(95,3610)}=23$, $P<0,0001$; HR: $F_{(95,3610)}=17$, $P<0,0001$; temperatura: $F_{(13,494)}=39$, $P<0,0001$), bem como uma interação estresse x tempo (MAP: $F_{(380,3610)}=1,7$, $P<0,0001$; HR: $F_{(380,3610)}=2,5$, $P<0,0001$; temperatura: $F_{(52,494)}=6,5$, $P<0,0001$) (Figura 3). A análise *post-hoc* revelou resposta diminuída da PAM em animais submetidos a 3 ($P<0,05$), 5 ($P<0,05$) ou 7 ($P<0,05$) dias de estresse de restrição, quando comparados aos animais estressados

agudamente (Figura 3). A análise também revelou diminuição da resposta taquicárdica durante as sessões 3 ($P<0,05$), 5 ($P<0,05$), 7 ($P<0,05$) e 10 ($P<0,05$) (Figura 3). Além disso, a resposta da temperatura cutânea da cauda foi diferente em relação à observada no grupo agudo na 5ª ($P<0,05$) e 7ª ($P<0,05$) sessões (Figura 3).

A análise das respostas médias da PAM, FC e temperatura cutânea durante todo o período de restrição e recuperação indicou efeito do estresse (PAM: $F_{(4,38)}=4,1$, $P=0,0075$; FC: $F_{(4,38)}=5,9$, $P=0,0009$; temperatura: $F_{(4,38)}=11$, $P<0,0001$) e do tempo (MAP: $F_{(1,38)}=45$, $P<0,0001$; HR: $F_{(1,38)}=12$, $P=0,0016$; temperatura: $F_{(1,38)}=125$, $P<0,0001$), bem como uma interação estresse x tempo (MAP: $F_{(4,38)}=3,3$, $P=0,0188$; HR: $F_{(4,38)}=2,7$, $P=0,0504$; temperatura: $F_{(4,38)}=15$, $P<0,0001$) (Figura 3). A análise *post-hoc* revelou diminuição da resposta de PAM durante os períodos de estresse ($P<0,05$) e recuperação ($P<0,05$) na 3ª sessão, bem como durante a recuperação da 5ª sessão ($P<0,05$), em relação aos valores do grupo agudo (Figura 3). A análise também revelou valores menores de FC durante o período de recuperação em animais submetidos a 3 ($P<0,05$), 5 ($P<0,05$), 7 ($P<0,05$) ou 10 sessões ($P<0,05$) de restrição (Figura 3). Além disso, a resposta da temperatura cutânea da cauda foi diferente em relação à observada no grupo agudo durante o período de estresse e recuperação da 5ª ($P<0,05$) e 7ª ($P<0,05$) sessões (Figura 3).

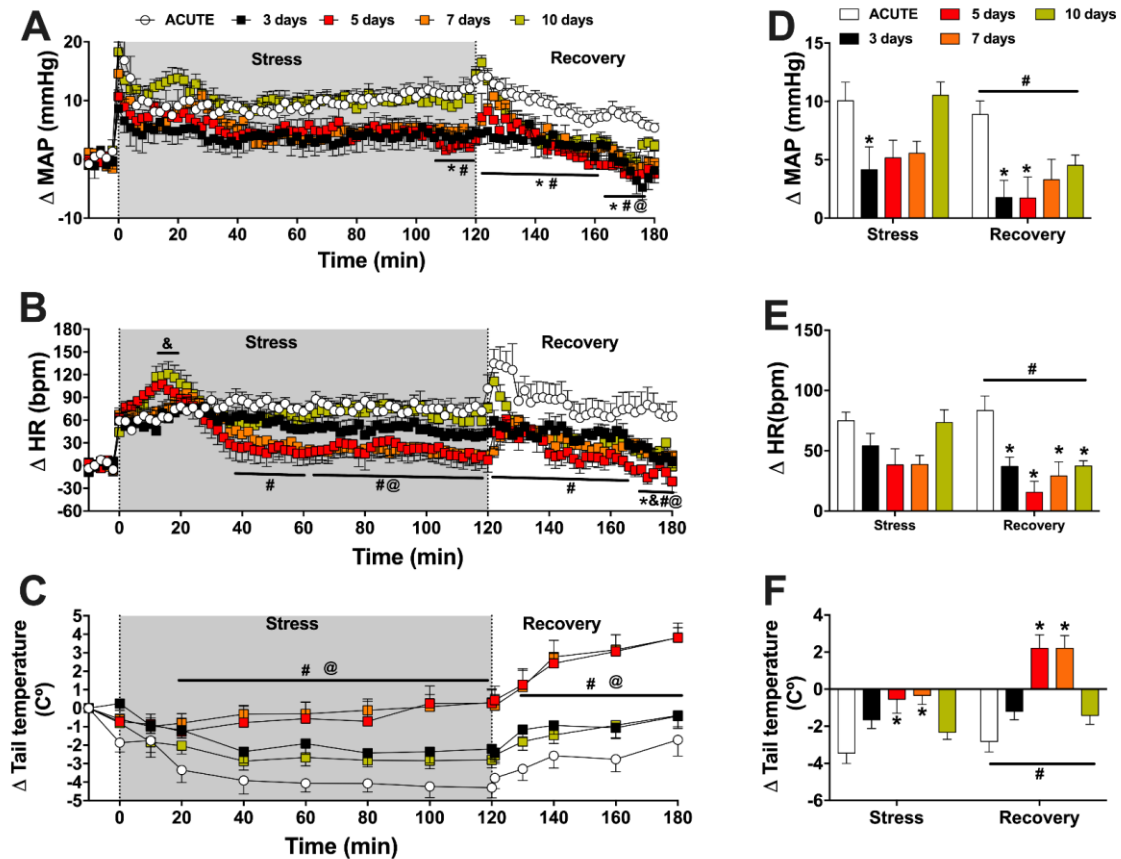


Figura 3: Influência do número de sessões de estresse na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. (A – C) Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ T) na 1° (agudo, círculos brancos, n=8), 3° (3 dias, círculos pretos, n=9), 5° (5 dias, círculos vermelhos, n=9), 7° (7 dias, círculos alaranjados, n=8) e 10° (10 dias, círculos verdes, n=9) sessões de estresse de restrição. A área sombreada indica o período de restrição. Os círculos representam a média e as barras o EPM. * P<0,05, 3 dias versus grupo agudo; # P<0,05, 5 dias versus grupo agudo; @ P<0,05, 7 dias versus grupo agudo; & P<0,05, 10 dias versus grupo agudo. ANOVA bifatorial acompanhado do teste *post-hoc* de Bonferroni. (D – F) Δ PAM, Δ FC e Δ temperatura da cauda ao longo do período de estresse e recuperação na 1° (agudo, barras brancas, n=8), 3° (barras pretas, n=9), 5° (barras vermelhas, n=8), 7° (barras laranja, n=8) e 10° (barras verdes, n=8), sessão de 120min de estresse de restrição. As barras representam a média±EPM. *P<0,05 versus o respectivo grupo agudo, # P<0,05 indicando o efeito principal do tempo. ANOVA bifatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

4.4 Avaliação da influência da hora do dia no processo de habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição (influência circadiana)

A análise dos valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda não indicou efeito do estresse ou da hora do dia (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (T) e tamanho amostral (n).

	<i>PAM (mmHg)</i>	<i>FC (bpm)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>N</i>
Agudo manhã	104±1	353±7	28.8±0.6	9
ERR manhã	108±1	359±8	28.0±0.5	9
Agudo tarde	104±2	369±6	27.4±0.6	9
ERR tarde	106±2	358±8	27.6±0.6	9
Agudo noite	103±4	356±15	28.7±0.7	9
ERR noite	99±3	383±6	28.3±0.5	9
<i>Interação</i>	<i>F</i> _(2,48) =1.5 <i>P</i> =0.2141	<i>F</i> _(2,48) =2.2 <i>P</i> =0.1164	<i>F</i> _(2,48) =0.3 <i>P</i> =0.7238	
<i>Hora do dia</i>	<i>F</i> _(2,48) =2.1 <i>P</i> =0.1308	<i>F</i> _(2,48) =1.2 <i>P</i> =0.3038	<i>F</i> _(2,48) =1.7 <i>P</i> =0.1994	
<i>Estresse</i>	<i>F</i> _(1,48) =0.06 <i>P</i> =0.8055	<i>F</i> _(1,48) =1.1 <i>P</i> =0.3036	<i>F</i> _(1,48) =0.6 <i>P</i> =0.4526	

ANOVA bifatorial. ERR – repeated restraint stress.

A análise das curvas temporais de variação da PAM indicou efeito do tempo ($F_{(65,2990)}=48$, $P<0,0001$) e uma interação estresse x tempo x hora do dia ($F_{(130,2990)}=1,2$, $P=0,0494$), mas sem influência do estresse ($F_{(1,46)}=0,05$, $P=0,8363$) e hora do dia ($F_{(2,46)}=1,5$, $P=0,2242$) (Figura 4). A análise das curvas temporais de variação da FC indicou efeito do estresse ($F_{(1,46)}=5,1$, $P=0,0293$), hora do dia ($F_{(2,46)}=5,2$, $P=0,0095$) e tempo ($F_{(65,2990)}=78$, $P<0,0001$); bem como uma interação restrição x tempo x hora do dia ($F_{(130,2990)}=1,4$, $P=0,0106$) (Figura 4). A análise *post-hoc* revelou resposta reduzida de FC no grupo ERR noite, quando comparado ao grupo agudo noite ($P<0,05$) (Figura 4). A análise das curvas temporais temperatura cutânea da

cauda indicou efeito do tempo ($F_{(14,644)}=18$, $P<0,0001$), mas sem influência do estresse ($F_{(1,46)}=0,8$, $P=0,3660$) e da hora do dia ($F_{(2,46)}=2,2$, $P=0,1190$) e interação estresse x tempo x hora do dia ($F_{(28,644)}=1,3$, $P=0,1057$) (Figura 4).

A análise das respostas médias de PAM e da temperatura cutânea da cauda ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do tempo (PAM: $F_{(1,46)}=48$, $P<0,0001$; temperatura: $F_{(1,46)}=24$, $P<0,0001$), mas sem influência do estresse (PAM: $F_{(1,46)}=0,05$, $P=0,8197$; temperatura: $F_{(1,46)}=0,9$, $P=0,33381$) e hora do dia (MAP: $F_{(2,46)}=1,5$, $P=0,2263$; temperatura: $F_{(1,46)}=1,9$, $P=0,1188$) e interação estresse x tempo x hora do dia (MAP: $F_{(2,46)}=1,0$, $P=0,3655$; temperatura: $F_{(2,46)}=0,3$, $P=0,7005$) (Figura 4). A análise da resposta média da FC durante todo o período de restrição e recuperação indicou efeito do estresse ($F_{(1,46)}=5,5$, $P=0,0234$), hora do dia ($F_{(2,46)}=5,1$, $P=0,0107$) e tempo ($F_{(1,46)}=146$, $P<0,0001$); mas sem interação estresse x tempo x hora do dia ($F_{(2,46)}=0,08$, $P=0,9185$) (Figura 4). A análise *post-hoc* revelou que os valores de FC durante o período de recuperação dos grupos ERR manhã ($P<0,05$) e ERR noite ($P<0,05$) foram menores quando comparados aos respectivos grupos agudos (Figura 4). Além disso, os valores de FC durante o estresse de restrição do grupo ERR tarde foram maiores quando comparados aos grupos agudo manhã ($P<0,05$), ERR manhã ($P<0,05$) e ERR noite ($P<0,05$) (Figura 4).

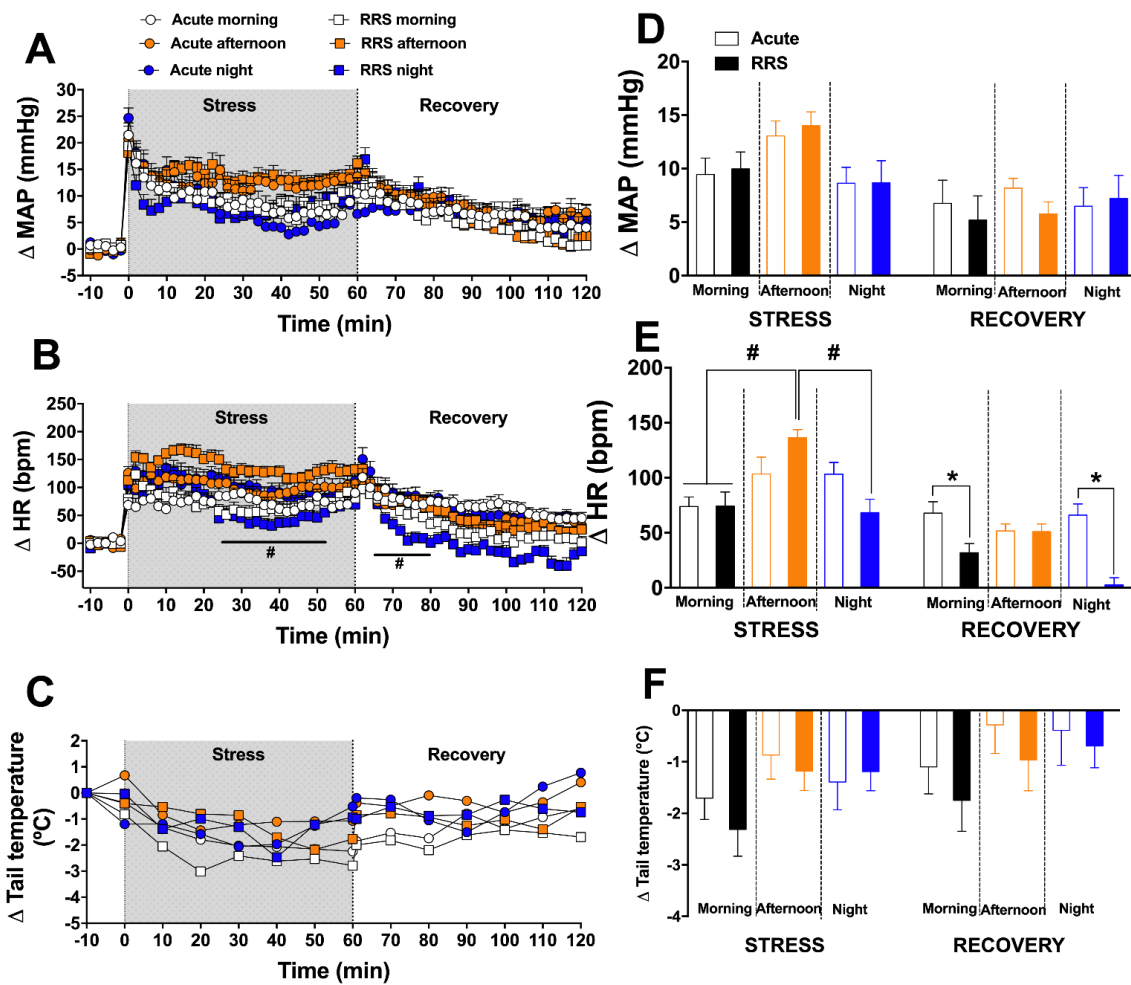


Figura 4: Influência do período do dia (manhã, tarde e noite) na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição agudo. (A – C) Curvas temporais de variação da pressão arterial média (Δ PAM), frequência cardíaca (Δ FC) e temperatura cutânea da cauda (Δ temperatura da cauda) na 1^a (agudo, símbolos abertos) ou na 10^a (ERR, símbolos preenchidos) de estresse de restrição, realizada durante o período da manhã (símbolos pretos), tarde (símbolos laranja) ou noite (símbolos azuis). A área sombreada indica o período de restrição. Os círculos representam a média e as barras o EPM. # P < 0,05, ERR noite vs agudo noite. ANOVA bifatorial acompanhado do teste *post-hoc* de Bonferroni. (D – F) Δ PAM, Δ FC e Δ temperatura da cauda ao longo do período de estresse e recuperação na 1^a (agudo, barras abertas) ou na 10^a (ERR, barras preenchidas) sessão de estresse de restrição realizada durante o período da manhã (símbolos pretos), tarde (símbolos laranja) ou noite (símbolos azuis). As barras representam a média \pm EPM. * P < 0,05 versus o grupo agudo no mesmo período, # P < 0,05, ERR tarde versus o respectivo grupo nos períodos da manhã e da noite; ANOVA bifatorial acompanhado do teste *post-hoc* de Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

Os resultados relatados no presente estudo sustentam nossa hipótese inicial de recuperação espontânea da habituação de respostas cardiovasculares após um período de interrupção da exposição ao estresse por restrição. Os nossos achados também fornecem evidências de que a diminuição das respostas cardiovasculares após a exposição repetida ao estresse de restrição depende do número de exposições e da hora do dia. A discussão de cada aspecto do processo de habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição investigado no presente estudo (ou seja, recuperação espontânea e influência do número de sessões de estresse e hora do dia) é discutida em detalhes abaixo.

A demonstração de habituação após exposição repetida ao mesmo estressor foi demonstrada principalmente em termos de redução das respostas de ativação simpática adrenomedular e do eixo HPA (Grissom e Bhatnagar, 2009; McCarty, 2016; Rabasa et al., 2015). Em relação a este último, a habituação foi documentada em roedores expostos repetidamente a vários estressores, incluindo o estresse de restrição (Grissom e Bhatnagar, 2009; McCarty, 2016). Assim como reportado no presente estudo, a habituação da resposta de aumento da corticosterona foi documentada como uma resposta reduzida durante a sessão de restrição, que por sua vez reduz os valores durante o período de recuperação, quando comparado aos animais estressados agudos (Grissom e Bhatnagar, 2009). Esse padrão de habituação é diferente dos identificados para as respostas cardiovasculares. Conforme documentado recentemente (Benini et al., 2019, 2020), observamos no presente estudo que a habituação das respostas cardiovasculares à restrição foi observada principalmente em termos de um retorno mais rápido da FC e da PAM aos valores basais durante o período de recuperação do estresse de restrição. No entanto, os valores durante a 10^a sessão de restrição foram semelhantes aos observados

durante a sessão de restrição aguda. Tomadas em conjunto, as respostas de corticosterona e cardiovasculares ao estresse indicam que a habituação é específica para cada sistema biológico, não sendo assim caracterizada com uma resposta corporal generalizada.

5.1 Recuperação espontânea

Identificamos uma diminuição semelhante das respostas de PAM e FC 10 dias após a interrupção do protocolo de ERR em relação à variação observada na última sessão do protocolo ERR (ou seja, 10^a sessão). Essa persistência da habituação é descrita há muitos anos e é denominada habituação a longo prazo (Cyr e Romero, 2009; Rankin et al., 2009). Em relação às respostas fisiológicas ao estresse, até onde sabemos, os dados aqui relatados fornecem a primeira evidência de habituação a longo prazo das respostas cardiovasculares ao estresse. No entanto, nossos dados são suportados por estudos anteriores que avaliaram a resposta do eixo HPA. Por exemplo, foi relatada habituação persistente da resposta do eixo HPA após exposição repetida a vários estressores (por exemplo, restrição, imobilização e ruído alto) em protocolos que variaram de 8 a 12 sessões diárias de estresse (Bhatnagar et al., 2002; Nyhuis et al., 2010; Rabasa et al., 2015). Esses estudos identificaram diminuição da ativação do eixo HPA 20, 28 e 60 dias após a última exposição à restrição, estresse de ruído alto e estresse de imobilização, respectivamente (Bhatnagar et al., 2002; Nyhuis et al., 2010; Rabasa et al., 2015).

Como mencionado na Introdução, foi proposto que a habituação pode ser diferenciada de diminuições não-específicas das respostas ao estresse por sua reversibilidade. Estudos que avaliaram a ativação do eixo HPA não identificaram uma recuperação completa da habituação nem 60 dias após a última sessão de estresse

(Bhatnagar et al., 2002; Nyhuis et al., 2010; Rabasa et al., 2015). Com base nesses achados, foi proposto que a recuperação espontânea de uma resposta habituada pode levar meses (McCarty, 2016). Nesse sentido, o presente estudo fornece a primeira evidência de recuperação espontânea da habituação de uma resposta fisiológica. De fato, observamos que a habituação das respostas de PAM e FC identificadas na 10^a sessão de restrição não foi observada 20 dias após a última sessão de estresse. Apesar de algumas diferenças no protocolo, tomado em conjunto com evidências anteriores de que a diminuição das respostas de aumento dos níveis circulantes dos hormônios adrenocorticotrópico (ACTH) e corticosterona ainda era observada 20 dias após a última sessão de restrição de 30 minutos (Bhatnagar et al., 2002), nossos resultados sugerem um *time course* específico do sistema de recuperação espontânea do eixo HPA e das respostas cardiovasculares. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar a recuperação espontânea da habituação do eixo HPA.

5.2 Influência do número de sessões

Thompson e Spencer (1966) propuseram que a habituação ocorre progressivamente a cada exposição ao estímulo aversivo. Portanto, estudos anteriores relataram habituação progressiva da resposta do eixo HPA durante a exposição repetida a estressores como restrição, imobilização e ambiente novo (Keim e Sigg, 1976; Lachuer et al., 1994; Pfister, 1979; Rabasa et al., 2013). Também foi relatada uma diminuição progressiva da resposta do sistema simpático adrenomedular após exposição repetida a estresse de ruído alto ou estresse por imersão em água (De Boer et al., 1988; S.F. De Boer et al., 1990). Nossos resultados de habituação de FC já identificado na 3^a sessão, porém sem redução adicional com a exposição adicional, de alguma forma contrasta com essas evidências. No entanto, uma diminuição progressiva da resposta do

eixo HPA nem sempre foi identificada. De fato, nossos resultados corroboram com evidências anteriores de que a habituação da resposta do eixo HPA ao estresse de imobilização foi identificada na segunda sessão, mas sem redução adicional na 7ª sessão (Rabasa et al., 2015). Outro estudo do mesmo grupo identificou diminuição semelhante da resposta circulante de corticosterona na 4ª, 7ª e 13ª sessão de estresse de imobilização (Rabasa et al., 2013, 2011). Portanto, parece que a habituação de respostas fisiológicas ao estresse pode, em algumas circunstâncias, apresentar um efeito do tipo teto, que já é atingido no início do protocolo, de forma a evitar uma redução adicional com maior exposição ao estímulo aversivo.

Foi observada uma diminuição da resposta de PAM na 3ª e 7ª sessões de restrição, enquanto a habituação da resposta da temperatura cutânea da cauda foi identificada na 5ª e 7ª de restrição. No entanto, as respostas de PAM e da temperatura cutânea da cauda na 10ª sessão de restrição foram semelhantes às identificadas em animais estressados agudos. Esses achados também contrastam a proposição de que a resposta diminui progressivamente com a exposição repetida ao estímulo (Rankin et al., 2009; Thompson e Spencer, 1966). No entanto, os critérios de habituação também incluem a suposição de recuperação espontânea somente quando o estressor é interrompido (Rankin et al., 2009; Thompson e Spencer, 1966). Portanto, a recuperação espontânea das respostas de PAM e a temperatura cutânea da cauda identificadas no presente estudo fornecem evidências de uma nova perspectiva em relação às características do processo de habituação. Nesse sentido, relatamos recentemente um efeito semelhante na exposição de ratos a sessões de 60 minutos diárias de estresse de restrição. De fato, observamos que a habituação da resposta de FC identificada na 10ª sessão estava ausente em animais submetidos a 20 sessões (Benini et al., 2019). Também foi relatada uma recuperação espontânea da habituação do eixo HPA ao

estresse de restrição. Por exemplo, Lachuer et al (1994) relataram uma diminuição da resposta circulante à corticosterona na 5ª sessão de restrição, um efeito que não foi observado em animais submetidos a 10 sessões de restrição. Gomez et al (2002) relataram diminuição da resposta de corticosterona na 2ª, mas não na 3ª sessão de restrição. Portanto, os resultados relatados aqui fornecem evidências adicionais de que a habituação de respostas fisiológicas pode se recuperar espontaneamente, mesmo durante a exposição ao protocolo homotípico. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer os fatores e mecanismos relacionados a esse fenômeno.

A mudança da diminuição da temperatura cutânea da cauda para um aumento durante o período de recuperação da 5ª e 7ª sessão de restrição corrobora a proposição de que a habituação pode estar além do nível basal (Rankin et al., 2009; Thompson e Spencer, 1966). McCarty (2016) relatou recentemente ausência de estudos que identificaram esse efeito nas respostas neuroendócrinas e autonômicas ao estresse. Portanto, até onde sabemos, nossos resultados fornecem a primeira evidência de que o efeito da habituação pode prosseguir além do nível zero. Além disso, é importante mencionar que Thompson e Spencer (1966) também propuseram que a habituação além do nível basal pode dificultar o processo de recuperação espontânea. Com base nessa proposição, poderíamos supor que a recuperação espontânea da habituação da resposta da temperatura cutânea da cauda evocada por 5 e 7 sessões diárias de restrição poderia levar mais tempo do que a obtida para as respostas da PAM e da FC em animais submetidos a 10 sessões. No entanto, mais estudos são necessários para testar essa hipótese.

5.3 Influência da hora do dia

Quando se trata de humanos em condições saudáveis de vida, dados indicaram que ocorre uma elevação da PAM no meio da manhã, e posteriormente reduz até atingir picos mais baixos durante a noite, porém esses valores se elevam novamente antes de acordar (manhã) (Millar-Craig et al., 1978). A PAM como parâmetro cardiovascular, varia constantemente durante o ciclo dia-noite, onde diversos fatores interagem nessa modulação, como consumo alimentar e de bebidas, atividades física e mental, obesidade, hábito de fumar, entre vários outros estímulos (Kawano, 2011). Verdadeiramente, uma PAM elevada durante a noite, sem sua redução habitual, torna-se um fator de risco potencial para o desenvolvimento de hipertrofia do ventrículo esquerdo, doença isquêmica cerebral, microalbuminúria, desordem vascular, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva (Hermida et al., 2007; Peixoto & White, 2007). Os ritmos circadianos pela ação endógena gerada nas 24 horas ajudam no sincronismo de processos fisiológicos internos, e sobre os estados comportamentais relacionados com o ciclo claro-escuro do ambiente externo (Karatsoreos, 2019). É bem conhecido que os ritmos circadianos sofrem influência do sistema nervoso autônomo, onde o tônus simpático predomina na fase diurna, enquanto que a noite predomina o tônus vagal (COWLEY et al., 1973; Van de Borne et al., 1994). Estudos mostram que os picos plasmáticos de norepinefrina e epinefrina ocorrem no período da manhã, durante as horas iniciais de suas atividades, fornecendo suporte adequado para adaptações fisiológicas, enquanto que o nível desses hormônios são reduzidos na fase de sono (Lakotua et al., 1986).

Evidências indicam que em ratos a PAM é mais alta durante a noite, que está de acordo com o fato de roedores terem hábitos noturnos (Basset et al., 2004; Sueta et al., 2013). A ausência de identificação nos valores basais de PAM e FC no presente estudo

nos diferentes períodos do dia pode decorrer do fato de termos avaliado os animais nas primeiras horas da fase escura do ciclo (início do ciclo escuro às 19h, avaliação às 20h). Desse modo, estudos futuros utilizando métodos que permitam o registro por períodos longos (por exemplo, telemetria) serão necessários para uma melhor avaliação da influência circadiana nos níveis cardiovasculares basais.

Com relação às respostas cardiovasculares ao estresse, não identificamos nenhuma influência do ritmo circadiano nas alterações cardiovasculares evocadas durante a sessão aguda de estresse de restrição. Esse achado está de alguma forma em contradição com evidências anteriores de influência da hora do dia nas respostas fisiológicas e comportamentais evocadas pelo estresse. Por exemplo, foi relatado que a resposta do eixo HPA ao estresse é mais alta na fase inativa (ou seja, fase clara, menor atividade basal do eixo HPA) do que a fase ativa (ou seja, fase escura, maior atividade basal do eixo HPA) (Dunn et al, 1972; Kant et al., 1986; Torrellas et al., 1981). No entanto, os autores propuseram que essa diferença reflete um efeito do tipo teto na fase ativa do animal, devido a atividade basal elevada (Dunn et al., 1972; Kant et al., 1986; Torrellas et al., 1981). De fato, alguns dados não indicaram diferença nos valores absolutos de corticosterona durante a exposição ao estresse no período ativo versus inativo (Torrellas et al., 1981). Outras respostas que não foram influenciadas pelo ritmo circadiano incluíram analgesia evocada por estresse e exploração e busca no teste de campo aberto (Kräuchi et al., 1983; Miller, 1988). Por outro lado, foi relatado que o estresse de imobilização durante o período da manhã, mas não à tarde, diminuiu a resposta de adrenalina circulante (Torrellas et al., 1981). Além disso, também foi relatado um papel do ciclo circadiano nos efeitos da restrição sobre o sono (Koehl et al., 2002). Tomados em conjunto, esses resultados indicam que as respostas ao estresse são afetadas diferentemente pelo ritmo circadiano. Logo, o presente estudo fornece

evidências de que as alterações cardiovasculares durante situações agudas de estresse não são influenciadas pela hora do dia.

Apesar da ausência de influência do ritmo circadiano em animais estressados agudamente, a habituação das respostas cardiovasculares foi dependente da hora do dia. De fato, a habituação da resposta da FC identificada nos períodos da manhã e da noite não foi observada nos animais submetidos ao protocolo ERR à tarde. Até onde sabemos, os dados relatados aqui fornecem a primeira evidência de uma influência do ritmo circadiano no processo de habituação. No entanto, nossos resultados são corroborados por evidências anteriores da influência da hora do dia na diminuição progressiva das respostas durante situações aversivas agudas. Por exemplo, a diminuição da atividade motora durante uma situação aguda de mudança de gaiola foi mais lenta na fase escura do que na fase clara (Kräuchi et al., 1983). Além disso, a diminuição da resposta analgésica durante uma sessão aguda de restrição foi mais rápida no período escuro (Miller, 1988). Portanto, mais estudos são necessários para investigar a influência do ritmo circadiano na habituação de outras respostas fisiológicas, incluindo a ativação do eixo HPA. Esta é uma questão relevante, uma vez que o eixo HPA é submetido a um ritmo circadiano proeminente em condições basais.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo fornece evidências de habituação a longo prazo das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição, que duram pelo menos 10 dias após a última sessão de estresse. No entanto, nossos dados também indicam uma recuperação espontânea dessa habituação após um período de 20 dias de interrupção da exposição repetida ao estresse de restrição. Além disso, os resultados relatados aqui indicam que a habituação das respostas cardiovasculares, bem como a habituação além do nível basal, depende do número de exposições ao estímulo aversivo. Finalmente, nossos dados fornecem evidências de que o ritmo circadiano é um fator importante a ser considerado na avaliação da habituação de respostas fisiológicas.

REFERÊNCIAS

- Ahmed, S., Wallace, K. M., & Blessing, L. T. (2003). Understanding the differences between how novice and experienced designers approach design tasks. *Research in Engineering Design, 14*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00163-002-0023-z>
- Barron, B. A., & Van Loon, G. R. (1989). Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. *Journal of the Autonomic Nervous System, 28*(2), 179–187. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(89\)90090-8](https://doi.org/10.1016/0165-1838(89)90090-8)
- Basset, A., Laude, D., Laurent, S., & Elghozi, J.-L. (2004). Contrasting circadian rhythms of blood pressure among inbred rat strains. *Journal of Hypertension, 22*(4), 727–737. <https://doi.org/10.1097/00004872-200404000-00015>
- Busnardo, C., Alves, F. H. F., Crestani, C. C., Scopinho, A. A., Resstel, L. B. M., & Correa, F. M. A. (2013). Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. *European Neuropsychopharmacology, 23*(11), 1611–1622. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2012.11.002>
- Carnevali, L., Trombini, M., Porta, A., Montano, N., de Boer, S. F., & Sgoifo, A. (2013). Vagal Withdrawal and Susceptibility to Cardiac Arrhythmias in Rats with High Trait Aggressiveness. *PLoS ONE, 8*(7), e68316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068316>
- COWLEY, A. W., LIARD, J. F., & GUYTON, A. C. (1973). Role of the Baroreceptor Reflex in Daily Control of Arterial Blood Pressure and Other Variables in Dogs. *Circulation Research, 32*(5), 564–576. <https://doi.org/10.1161/01.RES.32.5.564>
- Crestani, C. C., Alves, F. H. F., Tavares, R. F., & Corrêa, F. M. A. (2009). Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Stress, 12*(3), 268–278. <https://doi.org/10.1080/10253890802331477>
- Crestani, Carlos C. (2016). Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. *Frontiers in Physiology, 7*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00251>
- Crestani, Carlos C., Tavares, R. F., Alves, F. H. F., Resstel, L. B. M., & Correa, F. M. A. (2010). Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. *Stress, 13*(1), 61–72. <https://doi.org/10.3109/10253890902927950>
- Dampney, R. A. L., Horiuchi, J., & McDowall, L. M. (2008). Hypothalamic

- mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. *Autonomic Neuroscience*, 142(1–2), 3–10.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2008.07.005>
- Dinel, A., Guinobert, I., Lucas, C., Blondeau, C., Bardot, V., Ripoche, I., Berthomier, L., Pallet, V., Layé, S., & Joffre, C. (2019). Reduction of acute mild stress corticosterone response and changes in stress-responsive gene expression in male Balb/c mice after repeated administration of a *Rhodiola rosea* L. root extract. *Food Science & Nutrition*, 7(11), 3827–3841. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1249>
- Friedman, M. (1959). ASSOCIATION OF SPECIFIC OVERT BEHAVIOR PATTERN WITH BLOOD AND CARDIOVASCULAR FINDINGS. *Journal of the American Medical Association*, 169(12), 1286.
<https://doi.org/10.1001/jama.1959.03000290012005>
- Grippe, A. J., & Johnson, A. K. (2009). Stress, depression and cardiovascular dysregulation: A review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress*, 12(1), 1–21.
<https://doi.org/10.1080/10253890802046281>
- Grissom, N., & Bhatnagar, S. (2009). Habituation to repeated stress: Get used to it. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(2), 215–224.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2008.07.001>
- Hermida, R. C., Ayala, D. E., & Portaluppi, F. (2007). Circadian variation of blood pressure: The basis for the chronotherapy of hypertension. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(9–10), 904–922. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.08.003>
- Inoue, N. (2014). Stress and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 21(5), 391–401. <https://doi.org/10.5551/jat.21709>
- Karatsoreos, I. N. (2019). *Circadian Regulation of the Brain and Behavior: A Neuroendocrine Perspective*. https://doi.org/10.1007/7854_2019_115
- Kawano, Y. (2011). Diurnal blood pressure variation and related behavioral factors. *Hypertension Research*, 34(3), 281–285. <https://doi.org/10.1038/hr.2010.241>
- Kivimäki, M., Virtanen, M., Elovainio, M., Kouvonen, A., Väänänen, A., & Vahtera, J. (2006). Work stress in the etiology of coronary heart disease—a meta-analysis. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 32(6), 431–442.
<https://doi.org/10.5271/sjweh.1049>
- Lakata, D. J., Haus, E., Halberg, F., Halberg, E., Wendt, H. W., Sackett-Lundeen, L. L., Berg, H. G., Kawasaki, T., Ueno, M., Uezono, K., Matsuoka, M., & Omae, T.

- (1986). Circadian Characteristics of Urinary Epinephrine and Norepinephrine from Healthy Young Women in Japan and USA. *Chronobiology International*, 3(3), 189–195. <https://doi.org/10.3109/07420528609066366>
- McCarty, R. (2016). Learning about stress: neural, endocrine and behavioral adaptations. *Stress*, 19(5), 449–475. <https://doi.org/10.1080/10253890.2016.1192120>
- McDougall, D. (2005). The range-bound changing criterion design. *Behavioral Interventions*, 20(2), 129–137. <https://doi.org/10.1002/bin.189>
- McEwen, B S, & Stellar, E. (1993). Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Archives of Internal Medicine*, 153(18), 2093–2101. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8379800>
- McEwen, Bruce S. (1998). Protective and Damaging Effects of Stress Mediators. *New England Journal of Medicine*, 338(3), 171–179. <https://doi.org/10.1056/NEJM199801153380307>
- Millar-Craig, M., Bishop, C., & Raftery, E. . (1978). CIRCADIAN VARIATION OF BLOOD-PRESSURE. *The Lancet*, 311(8068), 795–797. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)92998-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)92998-7)
- Peixoto, A. J., & White, W. B. (2007). Circadian blood pressure: Clinical implications based on the pathophysiology of its variability. *Kidney International*, 71(9), 855–860. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002130>
- Rabasa, C., Gagliano, H., Pastor-Ciurana, J., Fuentes, S., Belda, X., Nadal, R., & Armario, A. (2015). Adaptation of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis to daily repeated stress does not follow the rules of habituation: A new perspective. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 56, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.06.013>
- Roest, A. M., Martens, E. J., de Jonge, P., & Denollet, J. (2010). Anxiety and Risk of Incident Coronary Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 56(1), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.03.034>
- Rosengren, A., Hawken, S., Ôunpuu, S., Sliwa, K., Zubaid, M., Almahmeed, W. A., Blackett, K. N., Sitthi-amorn, C., Sato, H., & Yusuf, S. (2004). Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11 119 cases and 13 648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet*, 364(9438), 953–962. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17019-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17019-0)

- Rozanski, A., Blumenthal, J. A., & Kaplan, J. (1999). Impact of Psychological Factors on the Pathogenesis of Cardiovascular Disease and Implications for Therapy. *Circulation*, *99*(16), 2192–2217. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.16.2192>
- Rugulies, R. (2002). Depression as a predictor for coronary heart disease. *American Journal of Preventive Medicine*, *23*(1), 51–61. [https://doi.org/10.1016/S0749-3797\(02\)00439-7](https://doi.org/10.1016/S0749-3797(02)00439-7)
- Selye, H. (1970). The evolution of the stress concept. *The American Journal of Cardiology*, *26*(3), 289–299. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(70\)90796-4](https://doi.org/10.1016/0002-9149(70)90796-4)
- Sgoifo, A., Carnevali, L., & Grippo, A. J. (2014). The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *39*, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.12.005>
- Sikora, M., Konopelski, P., Pham, K., Wyczalkowska-Tomasik, A., & Ufnal, M. (2016). Repeated restraint stress produces acute and chronic changes in hemodynamic parameters in rats. *Stress*, *19*(6), 621–629. <https://doi.org/10.1080/10253890.2016.1244667>
- Smith, T. W., Glazer, K., Ruiz, J. M., & Gallo, L. C. (2004). Hostility, Anger, Aggressiveness, and Coronary Heart Disease: An Interpersonal Perspective on Personality, Emotion, and Health. *Journal of Personality*, *72*(6), 1217–1270. <https://doi.org/10.1111/j.1467-6494.2004.00296.x>
- Sousa, M. B. C. de, Silva, H. P. A., & Galvão-Coelho, N. L. (2015). Resposta ao estresse: I. Homeostase e teoria da alostase. *Estudos de Psicologia*, *20*(1), 1–10. <https://doi.org/10.5935/1678-4669.20150002>
- Stephens, A., & Kivimäki, M. (2012). Stress and cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, *9*(6), 360–370. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.45>
- Stephens, A., & Kivimäki, M. (2013). Stress and Cardiovascular Disease: An Update on Current Knowledge. *Annual Review of Public Health*, *34*(1), 337–354. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031912-114452>
- Sueta, D., Kataoka, K., Koibuchi, N., Toyama, K., Uekawa, K., Katayama, T., Mingjie, M., Nakagawa, T., Waki, H., Maeda, M., Yasuda, O., Matsui, K., Ogawa, H., & Kim-Mitsuyama, S. (2013). Novel Mechanism for Disrupted Circadian Blood Pressure Rhythm in a Rat Model of Metabolic Syndrome—The Critical Role of Angiotensin II. *Journal of the American Heart Association*, *2*(3). <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000035>
- Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and

autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 397–409.

<https://doi.org/10.1038/nrn2647>

Van de Borne, P., Nguyen, H., Biston, P., Linkowski, P., & Degaute, J. P. (1994).

Effects of wake and sleep stages on the 24-h autonomic control of blood pressure and heart rate in recumbent men. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 266(2), H548–H554.

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.2.H548>

Vianna, D. M. L., & Carrive, P. (2005). Changes in cutaneous and body temperature

during and after conditioned fear to context in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 21(9), 2505–2512. [https://doi.org/10.1111/j.1460-](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04073.x)

[9568.2005.04073.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04073.x)

von, K. (2012). Psychosocial stress and cardiovascular risk - current opinion. *Swiss*

Medical Weekly. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13502>