



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (PIPGCF)
ASSOCIAÇÃO AMPLA - UFSCar/UNESP**



**ESTUDO DO EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO SOBRE A FUNÇÃO
CARDIOVASCULAR EM RATOS ADOLESCENTES E ADULTOS.**

JOSIANE DE OLIVEIRA DUARTE

Araraquara

2016

**ESTUDO DO EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO SOBRE A FUNÇÃO
CARDIOVASCULAR EM RATOS ADOLESCENTES E ADULTOS.**

JOSIANE DE OLIVEIRA DUARTE

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) UFSCar/UNESP Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Araraquara

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D812e Duarte, Josiane de Oliveira
Estudo do efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular em ratos adolescentes e adultos / Josiane de Oliveira Duarte. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
105 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Estresse repetido. 2. Estresse variável. 3. Balanço autônomo. 4. Barorreflexo. 5. Reatividade vascular. I. Título.



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 Tese de Doutorado da candidata Josiane de Oliveira Duarte, realizada em 11/03/2016:

Prof. Dr. Carlos César Crestani
UNESP

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Correa
USP

Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal
UNESP

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues
UFSCar

Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pingue
UEL

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho Arthur, meu companheiro desde o início dessa jornada na busca deste sonho. Minha imensa gratidão pelo incentivo quando tantas vezes pensei em desistir, por partilhar sua infância com a minha tribulada vida de pós-graduanda, meu eterno perdão pela ausência em tantos momentos. Não podemos voltar e recomeçar mas seguir adiante, erguidos e fortalecidos com tudo que somos hoje.

Eu sei e você sabe, já que a vida quis assim
Que nada nesse mundo levará você de mim
Eu sei e você sabe que a distância não existe
Que todo grande amor só é bem grande se for triste
Por isso, meu amor não tenha medo de sofrer
Que todos os caminhos me encaminham pra você

Assim como o oceano só é belo com luar
Assim como a canção só tem razão se se cantar
Assim como uma nuvem só acontece se chover
Assim como o poeta só é grande se sofrer
Assim como viver sem ter amor não é viver
Não há você sem mim e eu não existo sem você

(Antônio Carlos Jobim e Vinicius de Moraes)

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus a permissão de concluir essa etapa de aprendizado e o grande encontro com Meishu-Sama que transformou a minha vida.

Minha imensa gratidão ao amor singular e incondicional do meu companheiro Lucas, ao nosso amado filho Pedro por sua serenidade que fortalece nossa família.

Agradeço aos meus pais e irmãos que sempre me incentivaram nessa jornada.

Gratidão a Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta, exemplo de ética e profissionalismo que me proporcionou a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e conviver com pessoas inigualáveis das quais levo grande aprendizado profissional e pessoal.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani que com sua paciência e humildade me direcionou nessa caminhada e por muitas vezes “me levou pelas mãos” para que eu continuasse. Todas as broncas e “puxões de orelha” me transformaram em uma pessoa melhor. Minha admiração, respeito e imensa gratidão por partilhar sua sabedoria e conhecimentos para além da vida acadêmica nessa nossa trajetória.

As queridas Elisabete Zocal Paro Lepera e Rosana Finoti Pupim Silva, pessoas mais que especiais, essenciais na execução desse trabalho. Agradeço o apoio a minha família, as trocas de experiência materna e o grande aprendizado profissional que adquiri com vocês.

Agradeço a Tirene pelo apoio, pelas conversas sobre a vida, e pelo abraço quando não haviam palavras. Muito obrigada Ti, você mora no meu coração!

Aos meus amigos de laboratório, Ana Claudia, Tatiani, Paula, Ariela, Nathália, Paulão, Tarciso, Rodrigo, Fábio, Diego, Matheus, Gessynger, Ricardo, Leandro, Jeferson, pela troca de conhecimento e agradável convivência, vocês fazem parte da minha história. A aqueles que se tornaram mais que amigos, Lucas, Willian, Jonas, Lígia, Sheila e Karina dos quais possuo gratidão especial e guardo no relicário do coração.

Gratidão ao Prof. Dr. Javier Leonardo Rico pela amizade e por partilhar seus conhecimento, pela permissão de conviver e trabalhar com seus alunos Anderson Castañeda, Aura Rodriguez Fonseca e Marion Penagos que se tornaram amigos queridos.

Aos alunos da iniciação científica, Ivy Ishino, Renata Kurokawa, Taciana Pollo, Elinéia Rosa, Mariani Baldini, Flávia Santana e Lucas Barreto, pela confiança e permissão de participar de seu aprendizado e pela amizade adquirida.

Agradeço a Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP – Araraquara, ao laboratório de farmacologia pela estrutura para o desenvolvimento deste trabalho, ao programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade.

Aos sujeitos desta pesquisa, meu respeito e gratidão.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

“Cada escolha carrega consigo uma responsabilidade. Se escolho ir a algum lugar, falar alguma coisa, escrever um artigo, tenho que ter a consciência de que qualquer consequência desses atos terá sido resultado de minha própria escolha. E cada escolha ao ser posta em ação provoca mudanças no mundo que não podem ser desfeitas (...) Em cada momento, diante de cada escolha que faço, torno-me responsável não só por mim, mas por toda a humanidade”.

Jean Paul Sartre

(Pensador francês do século XX)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar as alterações fisiológicas e somáticas, com ênfase na análise dos efeitos sobre a função cardiovascular, induzidas pela exposição ao estresse crônico em ratos adolescentes e adultos. Nós também investigamos as consequências a longo prazo da exposição ao estresse durante a adolescência, além de analisar uma possível vulnerabilidade para os efeitos do estresse durante a vida adulta em animais pré-expostos a protocolos de estresse crônico durante a adolescência. Ratos machos foram expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (28 dias) e/ou a idade adulta (60 dias). Hipertrofia da adrenal, involução do timo e elevação nos níveis basais de corticosterona plasmática foram observados somente nos animais adolescentes. Por outro lado, redução do peso corporal foi causada por ambos os protocolos de estresse nos animais adultos. O ECV aumentou a pressão arterial e frequência cardíaca independentemente da idade, enquanto o ERR aumentou a pressão arterial seletivamente nos animais adultos. A taquicardia de repouso induzida pelo ECV foi associado com aumento da atividade simpática cardíaca nos animais adultos, ao passo que diminuição da atividade parassimpática cardíaca foi observada nos animais adolescentes. O ECV e o ERR alteraram a atividade do barorreflexo, porém esse efeito foi dependente da idade e do tipo de estresse. A resposta pressora decorrente da administração sistêmica de fenilefrina (agonista α_1 -adrenoceptor) foi aumentada por ambos os protocolos de estresse na adolescência. A resposta depressora da acetilcolina e do doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio foi alterada pelo ERR em ambas as idades. Exceto pelo aumento nos níveis de glicocorticoide circulante, todas as alterações causadas pelo estresse durante a adolescência foram revertidas na fase adulta. Entretanto, a exposição ao ERR ou ao ECV em animais adultos pré-expostos aos respectivos protocolos de estresse crônico durante a adolescência causaram efeitos não observados nos animais estressados somente na idade adulta, que incluíram: elevação da corticosterona pelo ECV, hipertrofia da adrenal, elevação da frequência cardíaca e da atividade simpática cardíaca pelo ERR, redução da frequência cardíaca intrínseca pelo ECV e alterações nas respostas do barorreflexo por ambos os estressores crônicos. Em suma, os resultados do presente estudo indicam uma vulnerabilidade ao estresse durante adolescência para os efeitos somáticos e neuroendócrinos. Os achados indicam que os efeitos sobre a função cardiovascular e atividade autônoma são dependentes do tipo de estresse e da idade. Por fim, os resultados indicam consequências mínimas na vida adulta da exposição ao estresse crônico durante a adolescência, porém sugerem que a exposição ao estresse durante a adolescência acarreta uma vulnerabilidade aos efeitos neuroendócrinos e cardiovasculares desencadeados pela exposição a estressores crônicos na vida adulta.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the physiological and somatic changes evoked by chronic stress regimens in adolescent and adult rats, with a focus on cardiovascular function. Additionally, we evaluated the long-term changes induced by stress exposure during adolescence, as well as a possible vulnerability to effects of stress in adult animals exposure to chronic stress during adolescence. Male rats were exposed to repeated restraint stress (RRS) or chronic variable stress (CVS) during adolescence (28 days) and/or adulthood (60 days). Adrenal hypertrophy, thymus involution, and elevated plasma glucocorticoid were observed only in adolescent rats, whereas reduction in body weight was caused by both stress regimens in adults. CVS increased blood pressure and heart rate regardless of the age, whereas RRS increased blood pressure selectively in adults. Resting tachycardia evoked by CVS was associated with increased cardiac sympathetic tone in adults while a decreased cardiac parasympathetic activity was observed in adolescents. Changes in baroreflex function were evoked by both RRS and CVS, but this effect was age- and type-stress specific. The pressor response to systemic administration of a α_1 -adrenoceptor agonist was increased by both stress regimens in adolescents. Depressor responses to acetylcholine and the nitric oxide donor sodium nitroprusside were affected by RRS in both ages. Except for the circulating glucocorticoid change, all alterations observed during adolescence were reversed in adulthood. However, the RRS or CVS in adult animals subjected to the respective chronic stressor during adolescence evoked responses that was not identified in animals exposure to the stressors only in adulthood, including: CVS-evoked increase in circulating corticosterone, adrenal hypertrophy, RRS-evoked increase in heart rate and cardiac sympathetic activity, reduction of intrinsic heart rate by CVS, and baroreflex changes evoked by both stressors. These findings suggest a stress vulnerability of adolescents to somatic and neuroendocrine effects regardless of stress regimen. Our results indicate an age- and stress type-specific influence in stress-evoked cardiovascular/autonomic changes. Data suggest minimal consequences in adulthood of stress during adolescence, but indicate that stress experience during adolescence causes a vulnerability to neuroendocrine and cardiovascular effects of stress in adulthood.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Protocolo experimental para estudo do efeito da exposição ao estresse por restrição repetida e ao estresse crônico variável sobre a função cardiovascular em ratos adolescentes. 32
- Figura 2** - Protocolo experimental para estudo do efeito da exposição ao estresse por restrição repetida e ao estresse crônico variável sobre a função cardiovascular em ratos adultos..... 33
- Figura 3** - Protocolo experimental para estudo do efeito a longo prazo da exposição ao estresse por restrição repetida e ao estresse crônico variável sobre a função cardiovascular em ratos adultos..... 34
- Figura 4** - Protocolo experimental para estudo do efeito da exposição ao estresse por restrição repetida e ao estresse crônico variável sobre a função cardiovascular em animais adultos que foram expostos ao estresse crônico durante a adolescência e fase adulta..... 36
- Figura 5** - Variação do peso corporal durante os protocolos de estresse crônico em animais adolescentes e adultos submetidos aos protocolos de estresse por restrição repetida (ERR) e ao estresse crônico variável (ECV) Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM) (n= 5-6 animais por grupo). * P<0.05 quando comparado com o grupo controle na mesma idade; # P<0.05, quando comparado com o respectivo grupo adolescente. ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni. 38
- Figura 6** - Valores basais de corticosterona plasmática em animais adolescentes e adultos após os 10 dias de exposição aos protocolos de estresse por restrição repetida (ERR) e ao protocolo de estresse crônico variável (ECV). Os dados são apresentados com média \pm EPM (N= 5-6 animais por grupo) * P<0.05, quando comparado com o grupo controle na mesma idade; # P<0.05, quando comparado com o respectivo grupo adolescente. ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni..... 42
- Figura 7** - Valores basais de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em animais adolescentes e adultos estressados após 10 dias de exposição aos protocolos de

estresse por restrição repetida (ERR) e estresse crônico variável (ECV). Os dados são apresentados com média \pm EPM (N= 5-6 animais por grupo) * P<0.05, quando comparado com o grupo controle na mesma idade; # P<0.05, quando comparado com o respectivo grupo adolescente. ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni.. 44

Figura 8 - Variação da frequência cardíaca (Δ FC) induzida pela administração intravenosa de propranolol (antagonista de adrenoceptores β) ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) e frequência cardíaca intrínseca (FC intrínseca) observada após a administração combinada de metilatropina e propranolol em animais adolescentes e adultos submetidos aos protocolos de estresse por restrição repetida (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Os dados são apresentados com média \pm EPM (N= 5-6 animais por grupo) *P<0.05 quando comparado o grupo controle na mesma idade; # P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo adolescente. ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni..... 46

Figura 9 - Análise de regressão não-linear (gráficos superiores) e linear (gráficos inferiores) do barorreflexo correlacionando variações de pressão arterial média (Δ PAM) e a resposta reflexa de frequência cardíaca (Δ FC) em animais adultos e adolescentes submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Símbolos nas curvas sigmoides indicam a PA₅₀. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média na curvas de regressão linear. 48

Figura 10 - Variações da pressão arterial média (Δ PAM) causada pela infusão intravenosa de doses crescentes de fenilefrina (Fenil, agonista seletivo de adrenoceptores α_1), acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS, doador de óxido nítrico) animais adolescentes e adultos submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV). Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média..... 51

Figura 11 - Variação do peso corporal durante os protocolos de estresse crônico em animais adultos estressados durante adolescência após os 10 dias do protocolo de estresse por restrição repetida (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM) (n= 5-6 animais por grupo). * P<0.05 quando comparado com o grupo controle na mesma idade. ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni. 54

Figura 12 - Valores basais de corticosterona plasmática em animais adultos estressados durante a adolescência após os 10 dias do protocolo de estresse por restrição repetida (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Os dados são apresentados com média \pm EPM (N= 5-6 animais por grupo) * P<0.05, quando comparado com o grupo controle; ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni..... 55

Figura 13 - Valores basais de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em animais adultos estressados durante a adolescência após os 10 dias do protocolo de estresse por restrição repetida (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Os dados são apresentados com média \pm EPM (N= 5-6 animais por grupo) * P<0.05, quando comparado com o grupo controle; ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni..... 56

Figura 14 - Variação da frequência cardíaca (Δ FC) induzida pela administração intravenosa de propranolol (antagonista de adrenoceptores β) ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) e frequência cardíaca intrínseca (FC intrínseca) observada após a administração combinada de metilatropina e propranolol em animais adultos estressados durante a adolescência submetidos aos protocolos de estresse por restrição repetida (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Os dados são apresentados com média \pm EPM (N= 5-6 animais por grupo) * P<0.05 quando comparado o grupo controle; # P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo adolescente. ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni..... 58

Figura 15 - Análise de regressão não-linear (gráfico superior) e linear (gráfico inferior) do barorreflexo correlacionando variações de pressão arterial média (Δ PAM) e a resposta reflexa de frequência cardíaca (Δ FC) em animais adultos que foram submetidos durante a adolescência ao estresse por restrição repetida (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV). Símbolos nas curvas sigmóides indicam a PA₅₀. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média nas curvas de regressão linear. 59

Figura 16 - Variações da pressão arterial média (Δ PAM) causada pela infusão intravenosa de doses crescentes de fenilefrina (Fenil, agonista seletivo de adrenoceptores α_1), acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS, doador de óxido nítrico) em animais adultos que foram submetidos durante a adolescência ao estresse de restrição repetido (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV). Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média. 62

Figura 17 - Peso corporal dos animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou a exposição ao estresse na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto). * $P < 0.05$ quando comparado com o grupo controle, # $P < 0.05$ quando comparado com o respectivo grupo estressado na fase adulta. ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni. 66

Figura 18- Valores basais de corticosterona plasmática de animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou a exposição repetida na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto). * $P < 0.05$ quando comparado com o grupo controle, # $P < 0.05$ quando comparado com o respectivo grupo estressado na fase adulta. ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni..... 68

Figura 19 - Valores basais de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou a exposição repetida na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto). * $P < 0.05$ quando comparado com o grupo controle. ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni. 70

Figura 20 - Variação da frequência cardíaca (ΔFC) induzida pela administração intravenosa de propranolol (antagonista de adrenoceptores β) ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) e valores de frequência cardíaca após a administração combinada de metilatropina e propranolol (FC intrínseca) em animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou expostos aos protocolos de estresse na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto). * $P < 0.05$ quando comparado com o grupo controle. ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni..... 72

Figura 21 - Análise de regressão não-linear (gráfico superior) e linear (gráfico inferior) do barorreflexo correlacionando variações de pressão arterial média (Δ PAM) e a resposta reflexa de frequência cardíaca (Δ FC) em animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou expostos aos protocolos de estresse na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto). Símbolos nas curvas sigmóides indicam a PA₅₀. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média nas curvas de regressão linear..... 74

Figura 22 - Variações da pressão arterial média (Δ PAM) causada pela infusão intravenosa de doses crescentes de fenilefrina (Fenil, agonista seletivo de adrenoreceptores α_1) e nitroprussiato de sódio (NPS, doador de óxido nítrico) em animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou expostos aos protocolos de estresse na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto). * $P < 0.05$ quando comparado com o grupo controle. ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni. 77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Protocolo de estresse crônico variável (ECV)..... 26
- Tabela 2** – Peso do coração, da adrenal e do timo em animais adolescentes e adultos após 10 dias dos protocolos de estresse por restrição repetida (ERR) e estresse crônico variável (ECV)..... 41
- Tabela 3** – Parâmetros derivados da análise de regressão não-linear (Ganho, P_1 , P_2 , variação da FC e PA_{50}) e linear (ganho bradicardia e ganho taquicardia) do barorreflexo em ratos adultos e adolescentes submetidos ao protocolo de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) por 10 dias consecutivos..... 49
- Tabela 4** – Resposta máxima da PAM (E_{max}) e dose que promove 50% da resposta máxima (ED_{50}) das curvas dose-resposta para fenilefrina (Fenil), acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS) em ratos adultos e adolescentes submetidos ao protocolo de estresse por restrição repetida (ERR) e estresse crônico variável (ECV) por 10 dias consecutivos. 52
- Tabela 5** – Peso do coração, da adrenal e do timo em animais adultos estressados durante adolescência após os 10 dias dos protocolos de estresse por exposição repetida (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV). 54
- Tabela 6** – Parâmetros derivados da análise de regressão não linear (Ganho, P_1 , P_2 , variação da FC e PA_{50}) e linear (ganho bradicardia e ganho taquicardia) do barorreflexo em ratos adultos que foram submetidos ao protocolo de estresse por restrição repetida (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) por 10 dias consecutivos durante a adolescência. 60
- Tabela 7** – Resposta máxima da PAM (E_{max}) e dose que promove 50% da resposta máxima (ED_{50}) das curvas dose-resposta para fenilefrina (Fenil), acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS) em ratos

adultos adultos que foram submetidos ao protocolo de estresse por restrição repetida (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV) por 10 dias consecutivos. 63

Tabela 8 – Peso do coração, das adrenais e do timo de animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou a exposição repetida na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto)..... 67

Tabela 9 – Parâmetros derivados da análise de regressão não-linear (Ganho, P_1 , P_2 , variação da FC e PA_{50}) e linear (ganho bradicardia e ganho taquicardia) do barorreflexo) em animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou expostos aos protocolos de estresse na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto)..... 75

Tabela 10 – Resposta máxima da PAM (E_{max}) e dose que promove 50% da resposta máxima (ED_{50}) das curvas dose-resposta para fenilefrina (Fenil) e nitroprussiato de sódio (NPS)) em animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou expostos aos protocolos de estresse na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto)..... 78

Tabela 11 – Resumo do efeito da exposição ao ERR ou ao ECV durante a adolescência e/ou na idade adulta. 80

SUMÁRIO

ABSTRACT.....	2
RESUMO.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Animais.....	25
3.2. Protocolos de estresse crônico.....	25
3.2.1. Estresse por restrição repetido - ERR.....	25
3.2.2. Estresse crônico variável - ECV.....	26
3.3. Canulação da artéria e veia femorais.....	26
3.4. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	27
3.5. Avaliação da atividade autonômica cardíaca e da frequência cardíaca intrínseca.....	27
3.6. Infusão intravenosa de agentes vasoativos.....	28
3.7. Avaliação da atividade barorreflexa.....	28
3.8. Análise da reatividade vascular.....	28
3.9. Medida de corticosterona plasmática.....	29
3.10. Soluções e drogas.....	29
3.11. Análise estatística.....	30
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	31
4.1. Experimento 1: Efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular de ratos adolescentes e adultos.....	31
4.2. Experimento 2: Efeitos a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência.....	34
4.3. Experimento 3: Efeitos do estresse crônico em ratos adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.....	35
5. RESULTADOS.....	37
5.1. Experimento 1: Efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular de ratos adolescentes e adultos.....	37

5.1.1. Efeito do estresse crônico sobre os parâmetros somáticos e níveis basais de corticosterona plasmática em animais adolescentes e adultos.	37
5.1.2. Efeito do estresse crônico sobre os níveis basais de pressão arterial e FC em animais adolescentes e adultos.	43
5.1.3. Efeito do estresse crônico sobre a atividade autônoma cardíaca e frequência cardíaca intrínseca (FCi) em animais adolescentes e adultos.....	40
5.1.4. Efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo em ratos adolescentes e adultos.	47
5.1.5 Efeito do estresse crônico sobre a reatividade vascular a agentes vasoativos em animais adolescentes e adultos.	50
5.2 Experimento 2: Efeito a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência.	53
5.2.1. Efeito a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência sobre os parâmetros somáticos e nível basal de corticosterona plasmática.....	53
5.2.2 Efeito a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência sobre os parâmetros cardiovasculares basais.....	56
5.2.3. Efeito a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência sobre a atividade autônoma cardíaca e FC intrínseca.....	57
5.2.4. Efeito a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência sobre a atividade do barorreflexo.	59
5.2.5. Efeito a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência sobre a reatividade vascular a agentes vasoativos.	61
5.3. Experimento 3: Efeitos do estresse crônico em ratos adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.	64

5.3.1 Efeitos do estresse crônico sobre os parâmetros somáticos e nível basal de corticosterona plasmática em ratos adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.....	64
5.3.2. Efeitos do estresse crônico sobre os parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.	69
5.3.3. Efeito do estresse crônico sobre a atividade autonôma cardíaca e a FC intrínseca (FCi) em animais adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.....	71
5.3.4. Efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo em animais adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.	73
5.3.5 Efeito do estresse crônico sobre a reatividade vascular a agentes vasoativos em animais adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.	76
6. DISCUSSÃO	79
6.1. Influência do tipo de estresse	81
6.2. Influência da ontogenia	82
6.3. Efeito a longo prazo da exposição ao estresse durante a adolescência	83
6.4. Mecanismo das alterações cardiovasculares provocadas pelo estresse	87
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
8. ANEXO.....	92

1. INTRODUÇÃO

Um coordenado e complexo conjunto de respostas fisiológicas e comportamentais são gerados durante situações aversivas (DAMPNEY et al., 2008; STERLING, 2012; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). A ação conjunta de vários circuitos neuronais fornecem a capacidade de gerar alterações comportamentais e fisiológicas precisas ao estímulo ameaçador (JOËLS e BARAM, 2009; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009), garantindo assim a manutenção do meio interno. No entanto, a ativação crônica ou repetida dessas respostas pode levar a desequilíbrios do meio interno, resultando no desenvolvimento de patologias (MCEWAN, 2006). Neste sentido, várias evidências correlacionam a exposição prolongada a eventos aversivos com a patogênese de problemas cardiovasculares (KNOX e UVNÄS-MOBERG, 1998; ROZANSKI et al, 1999). De fato, estudos epidemiológicos têm apontado correlação positiva entre o nível de estresse e a incidência de patologias cardiovasculares (HAINES et al, 1987; KAWACHI et al, 1994; FORD et al, 1998; KNOX e UVNÄS-MOBERG, 1998). Além disso, estudos em humanos e animais demonstram associação entre estresse e arritmias cardíacas, isquemia do miocárdio e hipertensão (PICKERING, 1990; ROZANSKI et al, 1999; GRIPPO e JOHNSON, 2002). Apesar da relevância do tema, os mecanismos envolvidos com as patologias cardiovasculares associadas ao estresse ainda são pouco compreendidos.

Tem sido proposto que as alterações fisiológicas causadas pela exposição ao estresse dependem do tipo, da duração, da frequência e da intensidade do estímulo aversivo utilizado (NATELSON et al, 1988; MAGARINOS e MCEWEN, 1995; AGUILERA, 1998; JANKORD e HERMAN, 2008). Estudos em roedores tem utilizado protocolos de estresse crônico psicológico que envolvem a exposição diária ao mesmo tipo de estressor (estresse crônico repetido ou previsível) ou a diferentes estressores (estresse crônico variável-ECV ou imprevisível) (CHEN e HERBERT, 1994; MAGARINOS e MCEWEN, 1995; GRIPPO et al, 2002; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). Estudos em roedores reportaram que alterações em parâmetros como o ganho de peso corporal, a atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e a atividade comportamental foram mais pronunciadas após a exposição a protocolos de ECV do que após a exposição a modelos envolvendo a exposição repetida ao mesmo estressor (ORTIZ et al, 1996; MARIN et al, 2007; CRUZ et al, 2012), possivelmente devido a um processo de habituação durante a exposição repetida ao mesmo estressor (HERMAN, 2013). Apesar das evidências acima, em uma ampla busca na literatura nós não encontramos nenhum

estudo que tenha comparado, de maneira direta, os efeitos de diferentes protocolos de estresse crônico sobre a função cardiovascular.

A ontogenia é outro fator que pode influenciar as respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse (SPEAR, 2000; ROMEO, 2010). A adolescência é um período de contínuo desenvolvimento de circuitos neurais envolvidos nas respostas ao estresse (CASEY et al, 2008), o que pode afetar como adolescentes reagem a estímulos aversivos. De fato, estudos em animais sugerem que adolescentes são mais vulneráveis às consequências negativas do estresse (DAHL, 2004; ROMEO, 2010). Uma vulnerabilidade de animais adolescentes a estímulos aversivos foi evidenciada por uma resposta exacerbada de redução da ingestão alimentar, aumento na atividade do eixo HPA, alterações comportamentais e redução do timo induzidas pelo estresse em animais adolescentes, quando comparada com seus pares adultos (STONE e QUARTERMAIN, 1997; DOREMUS-FITZWATER et al, 2009; JANKORD et al, 2011). Apesar dessas evidências, não existem estudos na literatura que tenham comparado os efeitos de protocolos de estresse crônico sobre a função cardiovascular em animais adolescentes e adultos. Além disso, os poucos estudos que investigaram os efeitos de protocolos de estresse crônico sobre a função cardiovascular de animais adolescentes são controversos. Por exemplo, foi demonstrado que o isolamento social de ratos adolescentes aumentou os valores basais de pressão arterial (SHEN e INGENITO, 1999; MASLOVA et al, 2010). Entretanto, a exposição de animais adolescentes a um protocolo de estresse crônico variável (ECV) não causou alterações nos parâmetros basais de pressão arterial (MASLOVA et al, 2002). Um outro aspecto importante é que apesar de estudos anteriores em roedores evidenciarem que a exposição a estímulos aversivos durante a adolescência causam numerosas alterações comportamentais e neuroplasticidade no sistema nervoso central que persistem até a vida adulta (BUWALDA et al, 2011), não existem dados das consequências a longo prazo da exposição a estímulos aversivos durante a adolescência sobre os parâmetros cardiovasculares.

Em ratos, a adolescência tem sido definida como o período ontogenético entre os dias pós-natal 28 e 42 (SPEAR e BRAKE, 1983; SPEAR, 2000). Neste período, os animais apresentam características neuro-comportamentais típicas da adolescência (SPEAR e BRAKE, 1983; SPEAR, 2000; MCCORMICK et al, 2010). Este modelo animal de adolescência tem sido utilizado como uma ferramenta válida como proposta de comparação e extrapolação para a adolescência em humanos (LAVIOLA et al, 1999; SPEAR, 2000; MCCORMICK et al, 2010).

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas complicações cardiovasculares associadas ao estresse são pouco compreendidos. Estudos pré-clínicos tem sugerido que as alterações cardiovasculares desencadeadas pelo estresse podem estar associadas a disfunções autônomas e comprometimento na função vascular (CORDELLINI e VASSILIEFF, 1998; GRIPPO et al, 2002, 2008; ISINGRINI et al, 2011). A avaliação da atividade do barorreflexo e do balanço autônomo cardíaco são medidas importantes empregadas na literatura para o estudo da função autônoma (NEGRÃO et al, 1992; GRIPPO et al, 2008; SANCHEZ et al, 2009; FLUES et al, 2010; CRESTANI et al, 2011).

Alterações no balanço autônomo cardíaco como redução da atividade parassimpática e/ou aumento atividade simpática tem sido apontados como um fator de risco para o surgimento de patologias cardiovasculares como insuficiência cardíaca, isquemia do miocárdio e hipertensão (DYER et al, 1980; CARNEY et al, 1993; PALATINI e JULIUS, 1997; PALATINI et al, 1997). Nesse sentido, foi relatado que ratos expostos ao protocolo de ECV apresentaram taquicardia de repouso, a qual foi associada a um aumento no tônus simpático cardíaco (GRIPPO et al, 2002, 2003). Deste modo, alterações autônomas cardíacas parecem estar associadas às complicações cardiovasculares do estresse.

O barorreflexo é um mecanismo neural de controle momento a momento da pressão arterial (DAMPNEY, 1994). Barorreceptores são terminações nervosas localizadas nas paredes das artérias aorta e carótida, que respondem a alteração na pressão arterial (SVED e GORDON, 1994). Alterações na atividade dos barorreceptores fornecem informações ao sistema nervoso central acerca dos níveis sistêmicos de pressão arterial, o qual leva a respostas reflexas de frequência cardíaca e resistência periférica, com o objetivo de manutenção da pressão arterial em uma estreita faixa de variação (SVED e GORDON, 1994). Estudos demonstram que redução na atividade deste mecanismo reflexo é comum em indivíduos com hipertensão essencial, e também em modelos experimentais de hipertensão (BRISTOW et al, 1969; IRIGOYEN e KRIEGER, 1998). Além disso, diminuição na atividade do barorreflexo tem sido apontada como um fator de risco para o desenvolvimento de arritmias e morte súbita em diversas patologias cardiovasculares (FARRELL et al, 1991; TAKASE et al, 1992).

GRIPPO et al (2008) demonstraram que em ratos adultos expostos ao ECV ocorreu redução na resposta do barorreflexo induzida por diminuição da pressão arterial. Estudos indicam que a exposição repetida ao mesmo estressor também afeta a atividade barorreflexa em animais adultos (CONTI et al, 2001; PORTER et al, 2004). Entretanto, em uma ampla revisão da

literatura, nós não encontramos nenhum estudo que tenha investigado o efeito do estresse crônico sobre a atividade barorreflexa em animais adolescentes. Além disso, nenhum estudo comparou o efeito de diferentes paradigmas de estresse crônico sobre este mecanismo reflexo cardiovascular.

Comprometimento na resposta vascular a agentes vasodilatadores e vasoconstritores representa um indicador e um marcador de aterosclerose e de alterações na capacidade de contração e relaxamento da musculatura lisa vascular (HARRISON et al, 1987; RESSTEL et al, 2006). Além disso, alteração na reatividade vascular tem sido proposta como um dos mecanismos fisiopatológicos da hipertensão (CONWAY, 1958; RESSTEL et al, 2006; CRESTANI et al, 2011). Estudos *in vitro* demonstraram que o ECV reduziu a resposta de relaxamento vascular de agonistas colinérgicos em segmentos de aorta de camundongos, sem alterar a resposta contrátil da fenilefrina (agonista seletivo de adrenoreceptores α_1) (D'AUDIFFRET et al, 2010; ISINGRINI et al, 2011). Por outro lado, a exposição repetida ao mesmo estressor (ERR) reduziu a resposta contrátil da noradrenalina e aumentou a resposta vasodilatadora da acetilcolina em anéis de aorta isoladas de ratos (CORDELLINI e VASSILIEFF, 1998). Esses dados *in vitro* sugerem que a resposta vascular ao estresse depende do protocolo de estresse crônico ao qual os animais foram submetidos. Entretanto, não existem dados *in vivo* relatando o efeito do estresse crônico sobre a reatividade vascular. A reatividade vascular pode ser testada experimentalmente *in vivo* através da análise das alterações na pressão arterial decorrente da infusão intravenosa de agentes vasoconstritores e vasodilatadores (RESSTEL et al, 2006; CRESTANI et al, 2011; ENGI et al, 2012). Além disso, não existem evidências na literatura do efeito do estresse crônico sobre a reatividade vascular em animais adolescentes.

Assim, apesar de estudos epidemiológicos e evidências experimentais em humanos e animais fundamentar a hipótese de uma relação entre patologias cardiovasculares e estresse, os mecanismos fisiopatológicos e a influência de fatores como o tipo de estresse e ontogenia ainda precisam ser esclarecidos. Diante disso, nossa proposta no presente estudo foi testar as seguintes hipóteses: 1) os efeitos cardiovasculares desencadeados pela exposição a protocolos de estresse crônico estão relacionados com o paradigma de estresse, de modo que o ECV e a exposição repetida ao mesmo estressor influenciam de maneira diferente a função cardiovascular; 2) ratos adolescentes, quando comparados com ratos adultos, são mais vulneráveis aos efeitos do estresse crônico sobre a atividade cardiovascular, e as consequências

cardiovasculares do estresse durante a adolescência são de longa duração e perduram até a fase adulta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- 1) Comparar em ratos adultos e adolescentes os efeitos do ERR e do ECV.
- 2) Investigar se as alterações induzidas pela exposição ao ERR ou ao ECV durante a adolescência são duradouras e persistem até a fase adulta.
- 3) Avaliar os efeitos do ERR ou do ECV em animais adultos que foram expostos aos respectivos protocolos de estresse durante a adolescência.

2.2. Objetivos específicos

O objetivo específico do presente estudo foi investigar os efeitos do estresse por restrição repetido (ERR) e do estresse crônico variável (ECV) sobre o peso corporal e parâmetros somáticos como peso do coração, adrenais e timo; sobre os valores basais de corticosterona plasmática, pressão arterial, frequência cardíaca (FC); a atividade simpática e parassimpática cardíaca; a atividade cardíaca do barorreflexo; e a reatividade vascular em animais adultos e adolescentes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar com 28 dias (adolescentes) e 60 dias (adultos). 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 do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP) no mínimo sete dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 7h), com livre acesso a alimento e água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR/UNESP (protocolo: 02/2012).

3.2. Protocolos de estresse crônico

No presente estudo, grupos independentes de animais foram submetidos a dois protocolos de estresse crônico: o estresse por restrição repetido (ERR) e o estresse crônico variável (ECV). Ambos os protocolos tiveram início simultâneo. Os animais controle não foram manipulados, exceto no período de limpeza das caixas, sendo mantidos no biotério do laboratório de farmacologia da FCFAR/UNESP pelo mesmo período que os animais submetidos aos protocolos de estresse crônico. Todas as sessões de estresse foram realizadas em uma sala separada do biotério. Os animais foram acomodados em caixas coletivas, sendo 3 animais por caixa.

3.2.1. Estresse por restrição repetido - ERR

O estresse por restrição consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro=6,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preencham aproximadamente 20% do tubo para os animais adultos e diâmetro=4,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preencham aproximadamente 20% do tubo para os animais adolescentes) (BARRON e VAN LOON, 1989; MCDUGALL et al, 2005; CRESTANI et al, 2009, 2010^a, CRUZ et al, 2012). Cada animal foi submetido a sessões

diárias com duração de uma hora por 10 dias consecutivos (MARIN et al, 2007; CRUZ et al, 2012). Em todas as sessões o estresse foi iniciado às 9:00 horas.

3.2.2. Estresse crônico variável - ECV

O ECV, modificado de Ortiz e colaboradores (1996), foi realizado mediante a exposição diária a diferentes estressores durante 10 dias consecutivos (MARIN et al, 2007; CRUZ et al, 2012). A Tabela 1 apresenta o protocolo completo do ECV.

Tabela 1 - Protocolo de estresse crônico variável (ECV).

Dia	Tipo de estresse e cronograma
1	10:00h, restrição 60 min; 19:00h serragem úmida durante a noite
2	15:00h, frio (4 ° C) e isolamento por 60 min; 19:00h, as luzes acesas durante a noite
3	12:00h, luzes apagadas por 180 min; 15:00h, nado forçado por 4min
4	07:30h, serragem úmida durante todo o dia; 19:00h, privação de alimento/água durante a noite
5	13:00h, nado forçado por 3 min; 19:00h, isolamento durante a noite
6	14:00h, frio (4 ° C) e isolamento por 15 min; 15:00h, luzes apagadas por 120min
7	19:00h, serragem úmida e luz acesa durante a noite
8	19:00h, isolamento e privação de alimentos/água durante a noite
9	16:00h, estresse por restrição por 60min; 19:00h, as luzes acesas durante a noite
10	09:00h, nado forçado por 4 min; 10:00h, estresse por restrição por 60min

3.3. Canulação da artéria e veia femorais

Vinte e quatro horas antes do início dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol na dose de 250 mg/Kg (i.p.) e um cateter foi implantado na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares. Outro cateter foi implantado na veia femoral para infusão de fármacos. Após a implantação, os cateteres foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em câmara aquecida dentro de caixas individuais para prevenir hipotermia. Como medida profilática, os animais receberam 80.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fontoura-

Wyeth, Brasil) aplicados em 0,2 mL (i.m.) e 2,5 mg/kg (s.c.) do analgésico não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil)

3.4. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão. A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada utilizando um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Australia), conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (PowerLab 4/30, ML866, ADInstruments, Australia), usando um programa apropriado (Lab Chart PRO, ADInstruments, Australia). Os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD), bem como a FC, foram obtidos a partir dos sinais da PAP.

3.5. Avaliação da atividade autônoma cardíaca e da frequência cardíaca intrínseca.

A atividade parassimpática e simpática cardíaca, bem como a frequência cardíaca intrínseca, foram avaliadas através da análise do efeito sobre a frequência cardíaca da administração intravenosa de metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) (3 mg/ml/kg) e propranolol (antagonista de adrenoceptores β) (4 mg/ml/kg) (NEGRÃO et al, 1992; SOUZA et al, 2001; SANCHES et al, 2009). O protocolo foi realizado em dois dias, conforme descrito previamente (NEGRÃO et al, 1992; GRIPPO et al, 2002). No dia 1, metade dos animais em cada grupo experimental recebeu propranolol e 10 minutos após metilatropina. A outra metade dos animais recebeu o mesmo tratamento em ordem invertida (metilatropina depois propranolol). Vinte quatro horas após (dia 2), os animais receberam novamente o tratamento combinado com os bloqueadores autonômicos cardíacos, mas na ordem oposta ao tratamento recebido no dia 1.

A atividade simpática cardíaca foi determinada através da análise da diferença entre os valores de frequência cardíaca antes e após o tratamento com propranolol. A atividade parassimpática cardíaca foi determinada através da análise da diferença dos valores de frequência cardíaca antes e após o tratamento com metilatropina. A frequência cardíaca intrínseca foi mensurada nos dois dias do protocolo após o tratamento combinado com propranolol e metilatropina, e a média das duas medidas foi calculada para cada animal.

3.6. Infusão intravenosa de agentes vasoativos

Infusão intravenosa de fenilefrina (70µg/mL/kg a 0.4 mL/min) (agonista seletivo dos adrenocetores α_1), de nitroprussiato de sódio (NPS) (100µg/mL/kg a 0.8 mL/min) (doador de óxido nítrico) e de acetilcolina (10 µg/mL/kg a 1.2 mL/min) foi realizado utilizando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, EUA) (CRESTANI et al, 2006). Fenilefrina e NPS causaram aumento e redução na pressão arterial, respectivamente.

3.7. Avaliação da atividade barorreflexa

A análise foi feita relacionando a variação da pressão arterial média (PAM) com a variação reflexa correspondente da frequência cardíaca (FC) utilizando os pontos obtidos da correlação na variação da PAM e FC durante as infusões de fenilefrina e NPS foram traçadas curvas sigmóides, como descritas na literatura (KORNER et al, 1972; HEAD & MCCARTY, 1987; CRESTANI et al, 2010). A avaliação da curva sigmóide foi feita com base em cinco parâmetros: 1- platô mínimo da frequência cardíaca (P1, BPM); 2- platô máximo da frequência cardíaca (P2, BPM); 3- variação da FC (ΔP , BPM, diferença e P2); 4- pressão arterial média (PA50, mmHg, valor de PAM que promove 50% de variação na FC) E 5- ganho (G, BPM/mmHg, inclinação da porção linear da curva) HEAD & MCCARTY, 1987; CRESTANI et al, 2010). Além disso, partindo dos mesmos pontos obtidos da correlação dos valores de PAM e FC correspondente, foram traçadas curvas de regressão linear para análise individual da atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor da pressão arterial (CRESTANI et al, 2006, 2010).

3.8. Análise da reatividade vascular

As alterações na PAM causada pelas concentrações crescentes de fenilefrina (70 µg/mL/kg a 0.4 mL/min), NPS (100 µg/mL/kg a 0.8 mL/min) e acetilcolina (10 µg/mL/kg a 1.2 mL/min) produzida pela infusão intravenosa destes agentes foram utilizadas para gerar curvas dose-resposta (RESSTEL et al, 2006; CRESTANI et al, 2011; ENGI et al, 2012). As curvas dose-resposta foram geradas para cada agente vasoativo usando valores de PAM correspondente ao tempo de registro cumulativo após o início da infusão (a cada 2 s). Curvas de regressão não-linear foram utilizadas para análise das variações da PAM. A avaliação das curvas foram

realizada com base em dois parâmetros: 1- resposta máxima da PAM (Emax); 2- dose que promove 50% da resposta máxima (ED50) (RESSTEL et al, 2006; CRESTANI et al, 2011; ENGI et al, 2012).

3.9. Medida de corticosterona plasmática

A análise das concentrações plasmáticas de corticosterona foi realizada utilizando a técnica de radioimunoensaio, de acordo com protocolo descrito em CRUZ e colaboradores (2005). Brevemente, o sangue (200µL) foi colhido pela artéria femoral e armazenado em tubos plásticos com 5µL de heparina. As amostras foram centrifugadas a 2.000 x g durante 15 min a 4°C e o plasma foi separado para dosagem de corticosterona.

Para o ensaio de radioimunoensaio, o anticorpo para corticosterona liofilizado (Sigma®) foi ressuspensão em 5mL de Tampão Tris pH 8,0 (0,05M Tris-HCl; 0,1M NaCl; 0,1% de Azida Sódica) e separado em alíquotas (solução estoque) e conservado a -20° C. Durante a realização do ensaio a solução estoque foi diluída em tampão Tris na proporção de 1:2. Alíquotas de 20 µl de plasma foram adicionadas em 980 µl de tampão fosfato e incubadas em banho de água a 70oC durante 1 hora para deslocamento da corticosterona ligada à globulina plasmática. Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e alíquotas de 100 µl foram transferidas para tubos ependorff contendo 100 µl da solução 1:2 do anticorpo para corticosterona e 3H-corticosterona (10.000 – 20.000 cpm por tubo de ensaio). As amostras foram incubadas por 12-18 horas a 40oC. Após a incubação, a 3H-corticosterona não ligada foi removida adicionando-se 500 µl de solução de carvão ativado seguido de centrifugação, a 10 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a radioatividade no sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro de cintilação líquida.

3.10. Soluções e drogas

Tribroetanol, (SIGMA, EUA), fenilefrina (SIGMA), nitroprussiato de sódio (SIGMA), acetilcolina (SIGMA), uretana (SIGMA, EUA), propranolol (SIGMA) e metilatropina (SIGMA) foram dissolvidas em salina (NaCl 0,9%). O pentabiótico (Fontoura-Wyeth, Brasil) e o anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumine (Banamine®, Schering Plough, Brazil) foram utilizados como fornecido pelos fabricantes.

3.11. Análise estatística

Os dados foram expressos com média \pm EPM. As medidas de peso corporal no protocolo 1 foram analisadas usando ANOVA trifatorial considerando os fatores tempo, idade e estresse. Os demais parâmetros foram analisados usando a ANOVA bifatorial, considerando os fatores estresse (controle, ERR e ECV) e idade (adolescentes e adultos) como fatores independentes. Os protocolos 2 e 3 foram analisados usando ANOVA monofatorial. Para todas as análises, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni para identificação das diferenças entre os grupos experimentais. Os resultados do teste estatístico com $P < 0.05$ foram considerados significantes. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5 para realização das análises.

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Grupos independente de animais foram submetidos aos protocolos de 10 dias de ERR ou ECV. Os animais controle ficaram em repouso no biotério. Todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação de cateter na artéria e veia femoral no último dia dos protocolos de estresse crônico, após a última sessão de estresse. Os testes cardiovasculares foram realizados em dois dias, 24 h e 48 h após a cirurgia. Nos dias de avaliação cardiovascular, todos os animais foram levados em suas respectivas caixas para a sala de experimentação e mantidos por 60 minutos, para habituação às condições de som e iluminação da sala, antes do início dos experimentos. No primeiro dia de teste, após o período de habituação, amostras de sangue (200 µL) foram obtidas da cânula implantada na artéria femoral para dosagem dos níveis plasmáticos de corticosterona. Em seguida, cada animal foi conectado ao sistema de registro cardiovascular em sua respectiva caixa, e foi realizado um registro de pelo menos 30 minutos para determinação dos parâmetros cardiovasculares basais. Em seguida, os animais receberam infusões intravenosas de fenilefrina, NPS e acetilcolina de maneira randomizada. Após as avaliações das respostas aos agentes vasoativos, os animais foram submetidos ao tratamento randomizado com propranolol e metilatropina para análise da atividade simpática e parassimpática cardíaca. Vinte quatro horas após, os animais foram submetidos novamente ao tratamento com os bloqueadores autônomos na ordem inversa ao realizado no primeiro dia de experimento. Após o término dos experimentos, os animais foram sacrificados com overdose de anestésico (uretana, 1,2 mg/kg, i.p.) e o coração, adrenais e timo foram removidos e pesados.

4.1. Experimento 1: Efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular de ratos adolescentes e adultos.

Os animais adolescentes iniciaram o protocolo de estresse no dia pós-natal 28 (ver Fig. 1) e os animais adultos no dia pós-natal 60 (ver Fig. 2). Animais de ambas as idades foram divididos em três grupos experimentais:

- 1) controle
- 2) estresse por restrição repetido – ERR
- 3) estresse crônico variável – ECV

Desse modo, como representado nas Figuras 1 e 2, os animais adolescentes foram submetidos aos protocolos de estresse entre o dia pós-natal 28 e 37, e os testes cardiovasculares foram realizados nos dias pós-natal 38 e 39; ao passo que os animais adultos foram expostos aos protocolos de estresse entre o dia pós-natal 60 e 69, e os testes cardiovasculares foram realizados nos dias pós-natal 70 e 71.

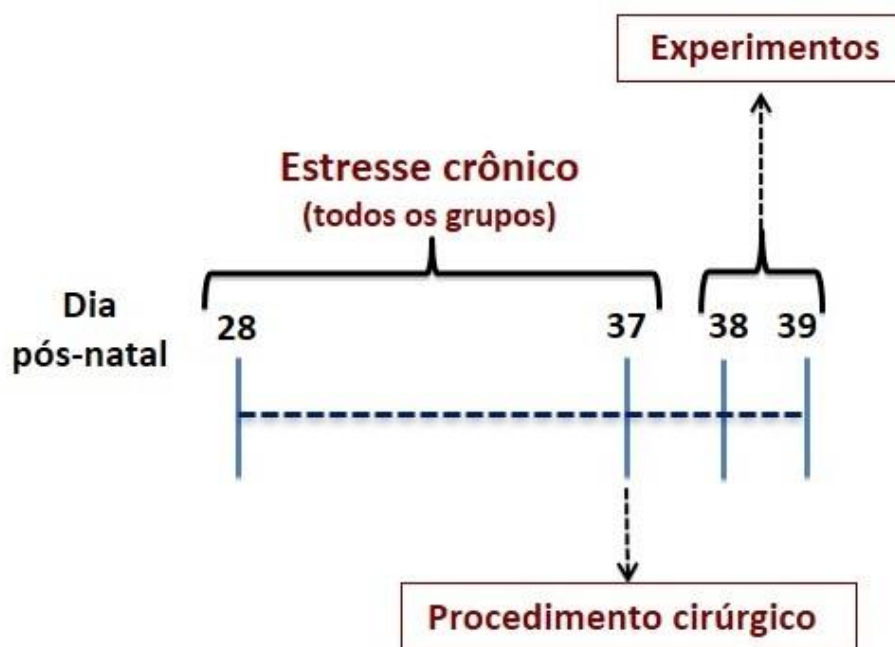


Figura 1 - Protocolo experimental para estudo do efeito da exposição ao estresse por restrição repetida e ao estresse crônico variável sobre a função cardiovascular em ratos adolescentes.

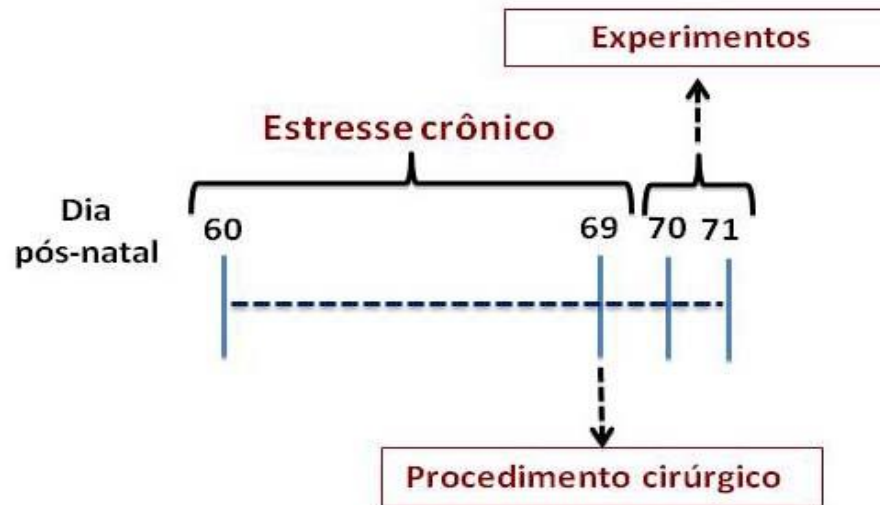


Figura 2 - Protocolo experimental para estudo do efeito da exposição ao estresse por restrição repetida e ao estresse crônico variável sobre a função cardiovascular em ratos adultos.

4.2. Experimento 2: Efeitos a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência.

O objetivo deste protocolo foi investigar as consequências na vida adulta da exposição ao estresse crônico na adolescência. Para tanto, animais no dia pós-natal 28 (adolescência) foram divididos em 3 grupos.

- 1) controle
- 2) estresse por restrição repetido – ERR
- 3) estresse crônico variável – ECV

Como representado na Figura 3, os animais foram expostos aos protocolos de estresse crônico entre o dia pós-natal 28 e 37. Após esse período, os animais foram mantidos em repouso no biotério por 3 semanas. No dia pós-natal 69, todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico, e os testes cardiovasculares foram realizados nos dias pós-natal 70 e 71.

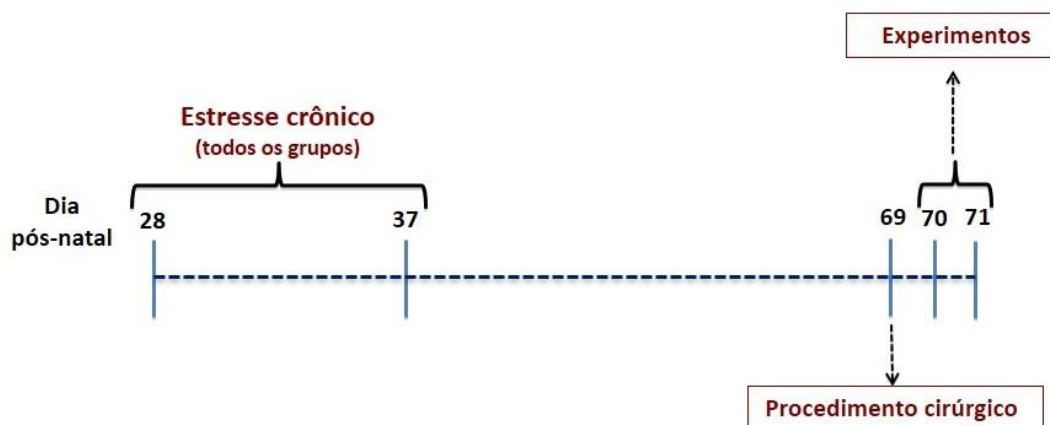


Figura 3 - Protocolo experimental para estudo do efeito a longo prazo da exposição ao estresse por restrição repetida e ao estresse crônico variável sobre a função cardiovascular em ratos adultos.

4.3. Experimento 3: Efeitos do estresse crônico em ratos adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.

Este protocolo objetivou investigar uma possível vulnerabilidade ao estresse durante a fase adulta em animais com histórico de exposição ao estresse durante a adolescência. Para tanto, os animais foram divididos em sete grupos experimentais:

1) Controle + controle (C+C): os animais foram mantidos no Biotério da adolescência até a fase adulta;

2) Estresse por restrição repetido + controle (R+C): os animais foram submetidos ao protocolo de ERR por 10 dias durante a adolescência (iniciado no dia pós-natal 28), e em seguida foram mantidos sem perturbação no Biotério por 31 dias (3 semanas sem perturbação de todos os grupos até atingirem a fase adulta, mais 10 dias correspondente ao período de estresse crônico dos animais submetidos ao estresse crônico na fase adulta).

3) Estresse crônico variável + controle (V+C): os animais foram submetidos ao protocolo de ECV durante a adolescência (iniciado no dia pós-natal 28), e em seguida foram mantidos sem perturbação no biotério por 31 dias (3 semanas sem perturbação de todos os grupos até atingirem a fase adulta, mais 10 dias correspondente ao período de estresse crônico nos animais submetidos ao estresse crônico na fase adulta);

4) Controle + estresse por restrição repetido (C+R): os animais foram mantidos sem perturbação no Biotério da adolescência até a fase adulta, e no dia pós-natal 59 foi iniciado o protocolo de ERR;

5) Controle + estresse crônico variável (C+V): os animais foram mantidos sem perturbação no Biotério da adolescência até a fase adulta, e no dia pós-natal 59 foi iniciado o protocolo de ECV.

Estresse
Adolescência

Estresse
Adulto

Adolescência
+
Adulto

6) *Estresse por restrição repetido + estresse por restrição repetido (R+R)*: os animais foram submetidos ao protocolo de ERR durante a adolescência (iniciado no dia pós-natal 28), e em seguida foram mantidos por três semanas sem perturbação no Biotério. Após esse período, foram novamente submetidos ao ERR durante a fase adulta (iniciado no dia pós-natal 60);

7) *Estresse crônico variável + estresse crônico variável (V+V)*: animais foram submetidos ao protocolo de estresse crônico variável durante a adolescência (iniciado no dia pós-natal 28); e após três semanas sem perturbação no Biotério foram novamente submetidos ao estresse crônico variável durante a fase adulta (iniciado no dia pós-natal 60).

Como representado na Figura 4, todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico no dia pós-natal 68, e os testes cardiovasculares foram realizados nos dias pós-natal 69 e 70 em todos os animais.

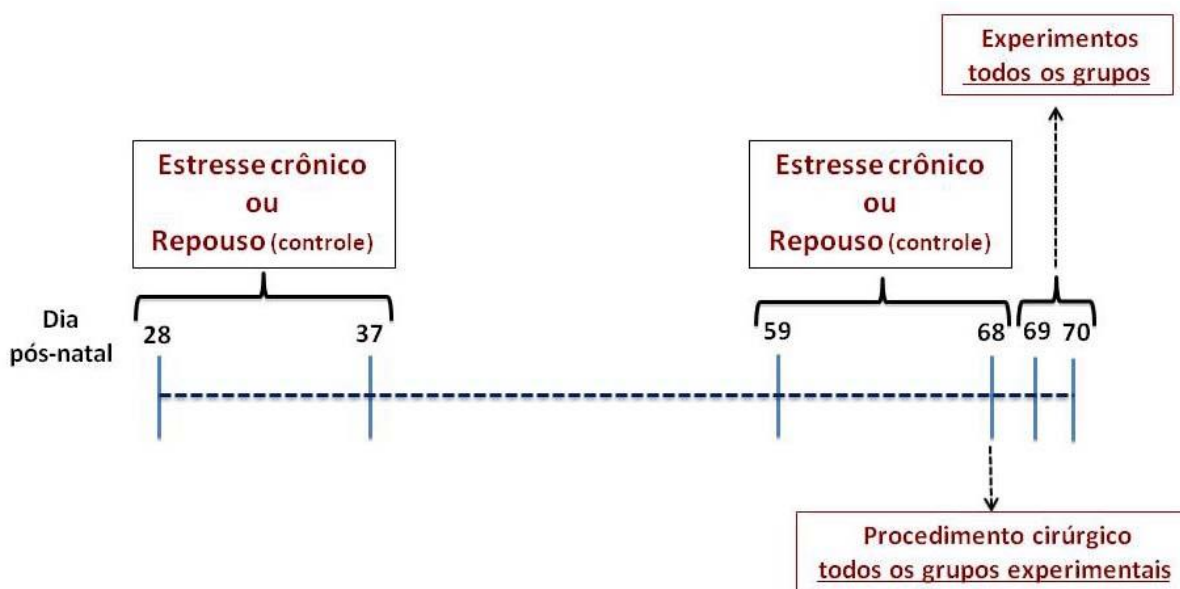


Figura 4 - Protocolo experimental para estudo do efeito da exposição ao estresse por restrição repetida e ao estresse crônico variável sobre a função cardiovascular em animais adultos que foram expostos ao estresse crônico durante a adolescência e fase adulta.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento 1: Efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular de ratos adolescentes e adultos.

5.1.1. Efeito do estresse crônico sobre os parâmetros somáticos e níveis basais de corticosterona plasmática em animais adolescentes e adultos.

Peso Corporal – Animais adultos apresentaram peso corporal maior, em todos os tempos, quando comparados com adolescentes ($P < 0.05$) (Figura 5). Além disso, o ERR ($P < 0.002$) e o ECV ($P < 0.001$) reduziram o ganho de peso corporal dos animais adultos nos dias 5 e 10 do protocolo de estresse. No entanto, nem o ERR ($P > 0.05$) nem o CVS ($P > 0.05$) alteraram o peso corporal dos animais adolescentes. Não houve diferença entre ERR e ECV em nenhum ponto em ambos animais, adolescentes ($P > 0.05$) (Figura 5) e adultos ($P > 0.05$) (Figura 5). A análise estatística do peso corporal indicou efeito da idade ($F_{(1,105)}=580$, $P < 0.0001$), estresse ($F_{(2,105)}=8$, $P < 0.003$), e tempo ($F_{(2,109)}=359$, $P < 0.0001$) (Figura 5). Além disso, houve interação entre os fatores estresse e idade ($F_{(2,105)}=7$, $P < 0.003$) e estresse e tempo ($F_{(4,102)}=9$, $P < 0.001$), sem interação dos fatores idade e tempo ($F_{(2,105)}=1$, $P > 0.05$).

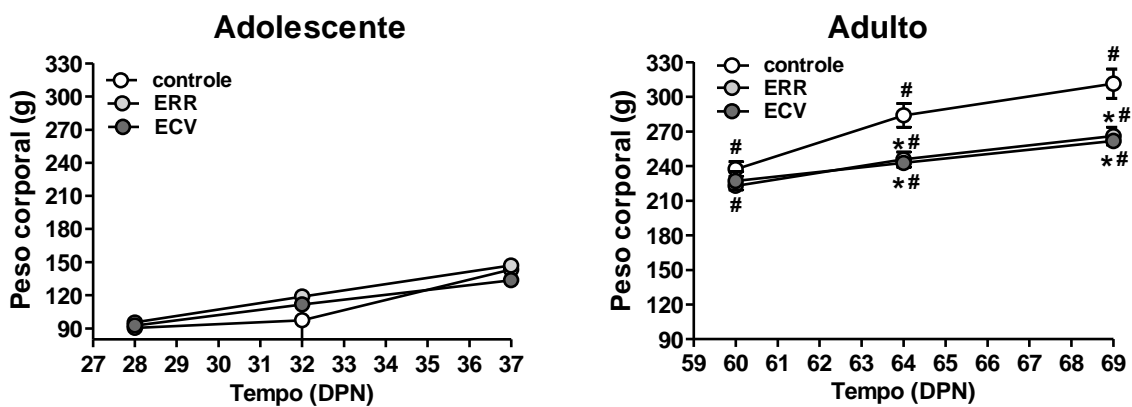


Figura 5 - Variação do peso corporal durante os protocolos de estresse crônico em animais adolescentes e adultos submetidos aos protocolos de estresse por restrição repetida (ERR) e ao estresse crônico variável (ECV). Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM) (n= 5-6 animais por grupo). * $P < 0.05$ quando comparado com o grupo controle na mesma idade; # $P < 0.05$, quando comparado com o respectivo grupo adolescente. ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

Peso do Coração - Animais adultos apresentaram peso do coração maior ($P<0.05$), quando comparados com grupos adolescentes (Tabela 2). Os protocolos de estresse crônico não afetaram o coração em nenhum grupo experimental ($P>0.05$). A análise indicou significativo efeito da idade ($F_{(1,30)}=130$, $P<0.0001$), mas sem efeito do estresse ($F_{(2,30)}=0,7$, $P>0.5$) e interação entre estresse e idade ($F_{(2,30)}=0,1$, $P>0.05$) (Tabela 2). A análise do peso relativo do coração indicou um aumento dos valores nos animais expostos tanto ao ERR ($P<0.05$) quanto ao ECV ($P<0.05$). A análise indicou efeito da idade ($F_{(1,30)}=59$, $P<0.0001$), porém sem efeito do estresse ($F_{(2,30)}=1$, $P>0.05$) e interação entre estresse e idade ($F_{(2,30)}=5$, $P<0.01$). (Tabela 2).

Peso das adrenais - Animais adultos apresentaram maior peso das adrenais ($P<0.05$), quando comparados com animais adolescentes (Tabela 2). O ECV aumentou o peso da adrenal em animais adolescentes ($P<0.02$), quando comparados com o respectivo grupo controle. A análise indicou efeito significativo da idade ($F_{(1,30)}=24$, $P<0.0001$) e do estresse ($F_{(2,30)}=5$, $P<0.01$), bem como interação entre estresse e idade ($F_{(2,30)}=9$, $P<0.001$) (Tabela 2). O ECV também aumentou o peso relativo das adrenais nos animais adolescentes ($P<0.0003$). A análise indicou efeito significativo da idade ($F_{(1,30)}=35$, $P<0.0001$) e do estresse ($F_{(2,30)}=37$, $P<0.0001$), bem como interação entre estresse e idade ($F_{(2,30)}=68$, $P<0.0001$) (Tabela 2).

Peso do Timo - Animais adultos apresentaram maior peso do timo ($P<0.05$), quando comparados com animais adolescentes, porém nenhum dos protocolos afetaram os valores absolutos do timo nos animais adolescentes e adultos (Tabela 2). A análise do peso absoluto do timo indicou efeito da idade ($F_{(1,30)}=18$, $P<0.0002$), porém sem efeito do estresse ($F_{(2,30)}=3$, $P>0.05$) e interação entre os fatores estresse e idade ($F_{(2,30)}=0,2$, $P>0.05$) (Tabela 2). A análise do peso relativo do timo indicou que os animais adultos controle tiveram valores menores quando comparados com o respectivo grupo adolescente. Além disso, a exposição ao ERR durante a adolescência reduziu o peso do timo ($P<0.05$) (Tabela 2). A análise do peso relativo indicou efeito da idade ($F_{(1,30)}=20$, $P<0.0001$), porém sem efeito do estresse ($F_{(2,30)}=3$, $P>0.05$) e interação entre estresse e idade ($F_{(2,30)}=1$, $P>0.05$) (Tabela 2).

Corticosterona plasmática - O protocolo de ERR aumentou os níveis de corticosterona plasmática nos animais adolescentes ($P<0.001$) (Figura 6). A análise indicou diferença entre

adolescentes e adultos somente entre os grupos ERR ($P < 0.05$) (Figura 6). A análise estatística do nível de corticosterona plasmática indicou efeito significativo da idade ($F_{(1,30)}=8$, $P < 0.008$) e do estresse ($F_{(2,30)}=9$, $P < 0.001$), bem como interação entre estresse e idade ($F_{(2,30)}=15$, $P < 0.0001$) (Figura 6).

Tabela 2 – Peso do coração, da adrenal e do timo em animais adolescentes e adultos após 10 dias dos protocolos de estresse por restrição repetida (ERR) e estresse crônico variável (ECV).

Grupos	n	Coração		Adrenal		Timo	
		Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo ^a	Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo ^a	Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo ^a
Adolescentes							
controle	6	730±40	5.1±0.2	50±0.1	0.35±0.01	300±39	2.2±0.2
ERR	7	686±18	4.7±0.1	50±0.1	0.34±0.01	236±18	1.6±0.1*
ECV	7	686±36	5.1±0.1	86±9*	0.65±0.03*	243±20	1.8±0.1
Adultos							
controle	6	1120±84 [#]	3.6±0.2 [#]	88±7 [#]	0.29±0.03	416±30 [#]	1.4±0.2 [#]
ERR	6	1098±38 [#]	4.2±0.1*	85±5 [#]	0.32±0.01	353±47 [#]	1.3±0.2
ECV	6	1060±31 [#]	4.1±0.1* [#]	82±4 [#]	0.31±0.02	328±28 [#]	1.2±0.1 [#]

Os dados são apresentados com média ± EPM (N= 5-6 animais por grupo)

^a Peso do órgão (mg) / peso corporal (g).

* P<0.05, quando comparado com o grupo controle na mesma idade.

[#] P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo adolescente.

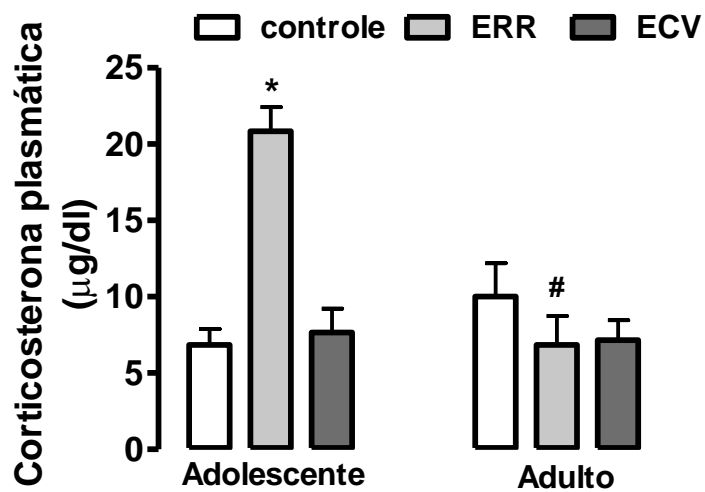


Figura 6 - Valores basais de corticosterona plasmática em animais adolescentes e adultos após os 10 dias de exposição aos protocolos de estresse por restrição repetida (ERR) e ao protocolo de estresse crônico variável (ECV). Os dados são apresentados com média \pm EPM (N= 5-6 animais por grupo) * $P < 0.05$, quando comparado com o grupo controle na mesma idade; # $P < 0.05$, quando comparado com o respectivo grupo adolescente. ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.1.2. Efeito do estresse crônico sobre os níveis basais de pressão arterial e FC em animais adolescentes e adultos.

O protocolo de ECV aumentou a pressão arterial média (PAM), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial sistólica (PAS) nos animais adolescentes (PAM: $P < 0.001$, PAD: $P < 0.05$, PAS: $P < 0.01$) e adultos (PAM: $P < 0.001$, PAD: $P < 0.05$, PAS: $P < 0.05$); ao passo que o ERR aumentou essas medidas somente nos animais adultos (PAM: $P < 0.001$, PAD: $P < 0.001$, PAS: $P < 0.01$) (Figura 7). A análise estatística da PAM e PAD indicou efeito significativo do estresse (PAM: $F_{(2,32)}=20$, $P < 0.0001$; PAD: $F_{(2,32)}=6$, $P < 0.006$) e idade (PAM: $F_{(1,32)}=21$, $P < 0.0001$; PAD: $F_{(1,32)}=11$, $P < 0.002$), bem como interação entre estresse e idade (PAM: $F_{(2,32)}=11$, $P < 0.0003$; PAD: $F_{(2,32)}=9$, $P < 0.0009$) (Figura 7). A análise estatística da PAS indicou efeito significativo do estresse ($F_{(2,32)}=10$, $P < 0.0006$), porém sem efeito da idade ($F_{(1,32)}=3$, $P > 0.05$) e interação entre estresse e idade ($F_{(2,32)}=3$, $P > 0.05$) (Figura 7).

Animais adultos apresentaram valores da FC basal menores quando comparados com respectivos grupos adolescentes (controle: $P < 0.05$, ERR: $P < 0.05$, ECV: $P < 0.05$) (Figura 7). Além disso, ECV aumentou a FC basal nos animais adolescentes ($P < 0.05$) e adultos ($P < 0.05$) (Figura 7). A análise estatística da FC indicou efeito significativo do estresse ($F_{(2,32)}=11$, $P < 0.0002$) e idade ($F_{(1,32)}=64$, $P < 0.001$) sem interação entre estresse e idade ($F_{(2,32)}=0,01$, $P > 0.05$) (Figura 7).

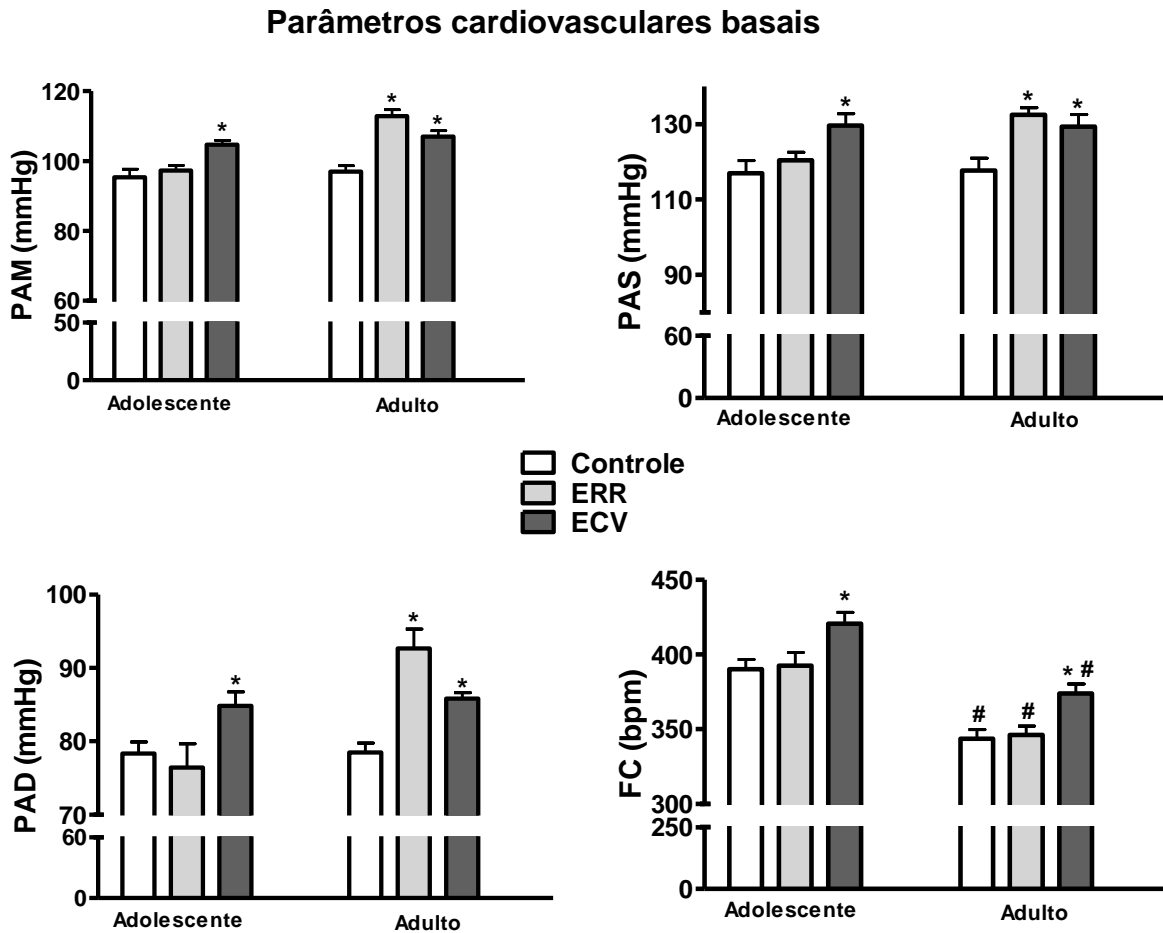


Figura 7 - Valores basais de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em animais adolescentes e adultos estressados após 10 dias de exposição aos protocolos de estresse por restrição repetida (ERR) e estresse crônico variável (ECV). Os dados são apresentados com média \pm EPM (N= 5-6 animais por grupo) * $P < 0.05$, quando comparado com o grupo controle na mesma idade; # $P < 0.05$, quando comparado com o respectivo grupo adolescente. ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.1.3 Efeito do estresse crônico sobre a atividade autônoma cardíaca e frequência cardíaca intrínseca (FCi) em animais adolescentes e adultos.

O efeito do tratamento intravenoso (i.v.) com propranolol (antagonista de adrenoceptores β) e/ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) sobre a FC é mostrado na Figura 8.

Atividade simpática- A variação da FC (Δ FC) induzida pela administração i.v de propranolol foi menor em animais adultos do grupos controle ($P<0.05$) e ERR ($P<0.05$) quando comparados com os respectivos animais adolescentes. Além disso, o ECV aumentou a Δ FC induzida pela administração i.v propranolol em animais adultos ($P<0.01$). A análise estatística indicou efeito significativo da idade ($F_{(1,30)}=5$, $P<0.03$) e interação entre estresse e idade ($F_{(2,30)}=5$, $P<0.01$), porém sem efeito do estresse ($F_{(2,30)}=3$, $P>0.05$).

Atividade Parassimpática- A variação da FC (Δ FC) induzida pela administração i.v de metilatropina foi menor no grupo ERR ($P<0.05$) e ECV ($P<0.05$) adolescente quando comparado com o respectivo grupo controle. A análise estatística não indicou efeito do estresse ($F_{(2,30)}=3$, $P>0.05$) e idade ($F_{(1,30)}=0.04$, $P>0.05$), nem interação entre estresse e idade ($F_{(2,30)}=2$, $P>0.05$).

FC intrínseca- A análise dos valores de FC após o tratamento combinado de metilatropina e propranolol indicou redução da FCi nos animais adultos do grupo controle ($P<0.05$), quando comparados com o respectivo grupo adolescente. Além disso, o ERR reduziu a FCi em animais adolescentes ($P<0.05$). A análise estatística indicou efeito significativo da idade ($F_{(1,30)}=26$, $P<0.0001$), sem efeito do estresse ($F_{(2,30)}=2$, $P>0.05$) e interação entre estresse e idade ($F_{(2,30)}=0.8$, $P>0.05$).

Balanco autônomo

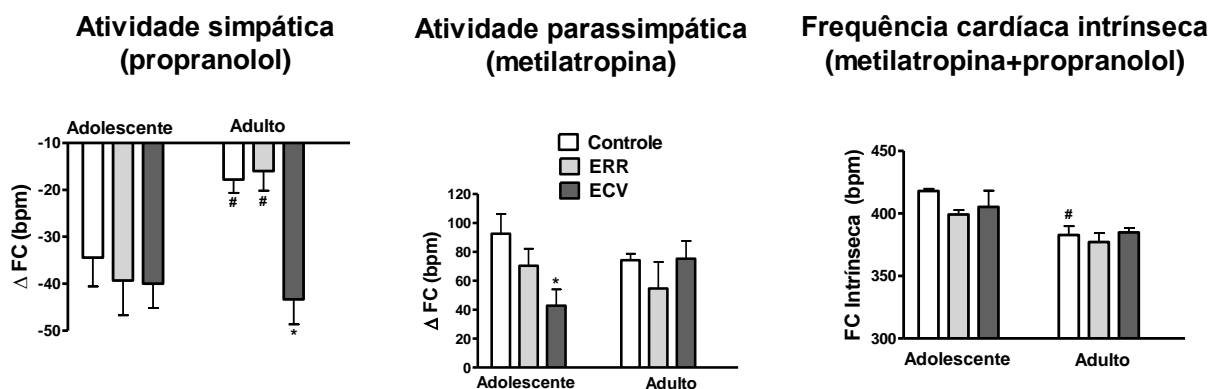


Figura 8 - Variação da frequência cardíaca (Δ FC) induzida pela administração intravenosa de propranolol (antagonista de adrenoceptores β) ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) e frequência cardíaca intrínseca (FC intrínseca) observada após a administração combinada de metilatropina e propranolol em animais adolescentes e adultos submetidos aos protocolos de estresse por restrição repetida (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Os dados são apresentados com média \pm EPM (N= 5-6 animais por grupo) *P<0.05 quando comparado o grupo controle na mesma idade; # P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo adolescente. ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.1.4. Efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo em ratos adolescentes e adultos.

A Figura 9 e a Tabela 3 apresentam os resultados das análises de regressão não-linear e linear do barorreflexo. A análise de regressão não-linear indicou que o ERR aumentou o P_1 ($P<0.001$), a variação da FC ($P<0.05$) e a PA_{50} ($P<0.05$) em animais adolescentes, ao passo que um aumento no P_2 ($P<0.01$) e na variação da FC ($P<0.05$) acompanhado por diminuição da PA_{50} ($P<0.05$) foi observado em animais adultos. O ECV aumentou o P_1 ($P<0.001$) e reduziu o P_2 ($P<0.01$) em animais adolescentes, ao passo que redução no P_1 ($P<0.05$) e na PA_{50} ($P<0.001$) e aumento no P_2 ($P<0.01$) foi observado em animais adultos. Animais adultos submetidos ao ERR apresentaram redução do P_1 ($P<0.05$) e da PA_{50} ($P<0.05$), quando comparados com o seu respectivo grupo adolescente. Animais adultos sujeitos ao ECV tiveram redução no ganho ($P<0.05$), P_1 ($P<0.05$) e PA_{50} ($P<0.05$), quando comparados com seus pares adolescentes. Nenhuma diferença foi identificada entre adolescentes e adultos dos grupos controle ($P>0.05$).

A análise de regressão linear foi utilizada para análise individual da atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor da pressão arterial. Esta análise indicou que os animais adolescentes submetidos ao ERR apresentaram aumento no ganho da resposta reflexa de bradicardia ($P<0.05$), ao passo que um aumento da resposta de taquicardia reflexa ($P<0.05$) foi observada em animais adultos. O ECV aumentou a resposta de bradicardia reflexa em adolescentes ($P<0.05$), ao passo que esta resposta foi reduzida ($P<0.05$) e a resposta taquicárdica do barorreflexo foi aumentada ($P<0.01$) em animais adultos. Quando comparado com o respectivo grupo adolescente, os animais adultos submetidos ao ECV apresentaram redução da resposta de bradicardia ($P<0.05$) e aumento da resposta taquicárdica ($P<0.05$). A resposta de bradicardia mostrou-se reduzida ($P<0.05$) em animais adultos sujeitos ao ERR, quando comparados com seu respectivo grupo adolescente. Nenhuma diferença foi identificada entre adolescentes e adultos dos grupos controle ($P>0.05$).

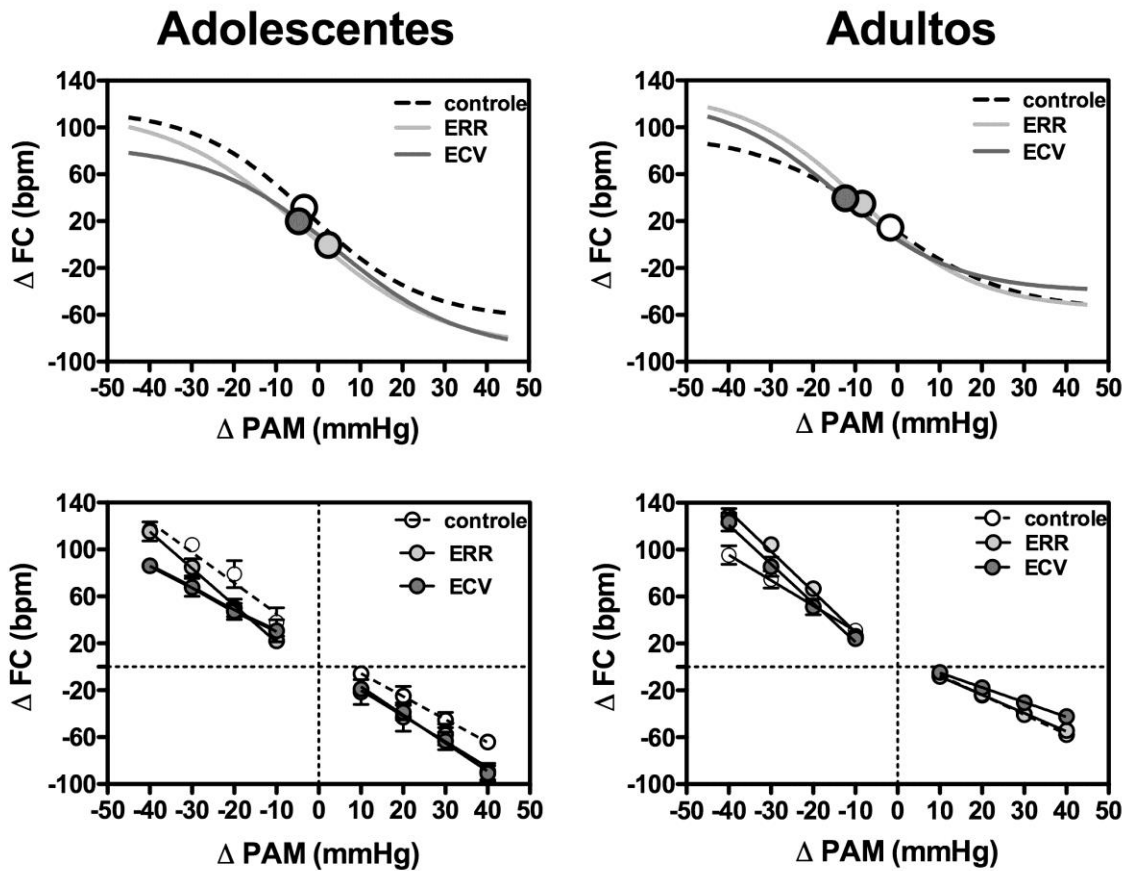


Figura 9 - Análise de regressão não-linear (gráficos superiores) e linear (gráficos inferiores) do barorreflexo correlacionando variações de pressão arterial média (Δ PAM) e a resposta reflexa de frequência cardíaca (Δ FC) em animais adultos e adolescentes submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Símbolos nas curvas sigmóides indicam a PA₅₀. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média na curvas de regressão linear.

Tabela 3 – Parâmetros derivados da análise de regressão não-linear (Ganho, P₁, P₂, variação da FC e PA₅₀) e linear (ganho bradicardia e ganho taquicardia) do barorreflexo em ratos adultos e adolescentes submetidos ao protocolo de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) por 10 dias consecutivos.

Grupo	n	Ganho (bpm/mmHg)	P ₁ (bpm)	P ₂ (bpm)	Variação da FC (bpm)	PA ₅₀ (mmHg)	Ganho bradicardia (bpm/mmHg)	Ganho taquicardia (bpm/mmHg)
Adolescente								
Controle	6	-2.4±0.2	-64±4	116±4	181±6	-4±2	-1.8±0.2	-2.6±0.2
ERR	6	-2.3±0.2	-90±6*	115±7	205±5*	2±2*	-2.3±0.1*	-3.2±0.3
ECV	5	-2.2±0.2	-91±5*	85±4*	177±5	-4±1	-2.4±0.2*	-1.8±0.3
Adulto								
Controle	6	-1.9±0.1	-58±2	98±6	155±8	-4±1	-1.7±0.1	-2.2±0.2
ERR	6	-2.1±0.1	-55±4 [#]	129±6*	184±10*	-11±2* [#]	-1.5±0.1 [#]	-3.5±0.2*
ECV	6	-1.5±0.08 [#]	-41±3* [#]	124±6*	165±7	-15±1* [#]	-1.1±0.1* [#]	-3.4±0.2* [#]
<i>Interação</i>		$F_{(2,32)}=1$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=12$ $P<0.0001$	$F_{(2,32)}=12$ $P<0.0001$	$F_{(2,32)}=6$ $P<0.007$	$F_{(2,32)}=9$ $P<0.0005$	$F_{(2,32)}=2$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=9$ $P<0.001$
<i>Estresse</i>		$F_{(2,32)}=2$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=3$ $P<0.05$	$F_{(2,32)}=6$ $P<0.009$	$F_{(2,32)}=6$ $P<0.005$	$F_{(2,32)}=11$ $P<0.0003$	$F_{(2,32)}=0.2$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=8$ $P<0.001$
<i>Idade</i>		$F_{(1,32)}=12$ $P<0.001$	$F_{(1,32)}=71$ $P<0.0001$	$F_{(1,32)}=6$ $P<0.02$	$F_{(1,32)}=65$ $P<0.0001$	$F_{(1,32)}=41$ $P<0.0001$	$F_{(1,32)}=8$ $P<0.005$	$F_{(1,32)}=6$ $P<0.01$

Valores expressos como média ± EPM

* $P<0.05$ vs grupo controle na mesma idade. [#] $P<0.05$ vs respectivo grupo adolescente.

ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de *Bonferroni*.

5.1.5 Efeito do estresse crônico sobre a reatividade vascular a agentes vasoativos em animais adolescentes e adultos.

Os resultados de reatividade vascular à fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio são apresentados na Figura 10 e na Tabela 4.

Fenilefrina – A análise da resposta pressora causada pela infusão intravenosa de fenilefrina (agonista seletivo de adrenoceptores α_1) indicou que o ERR ($P<0.01$) e o ECV ($P<0.001$) causaram aumento do E_{max} da curva dose-resposta em animais adolescentes, porém sem afetar a ED_{50} ($P>0.05$). Os protocolos de estresse crônico não afetaram a resposta da fenilefrina em animais adultos ($P>0.05$). Animais adultos do grupo CVS apresentaram resposta reduzida quando comparados com o seu respectivo grupo adolescente ($P<0.05$), porém a análise não identificou diferenças entre os animais adolescentes e adultos dos grupos controle ($P>0.05$).

Acetilcolina – A análise da resposta depressora causada pela infusão intravenosa de acetilcolina indicou que o ERR diminuiu o E_{max} ($P<0.05$) da curva dose-resposta em animais adolescentes, porém sem afetar a ED_{50} ($P>0.05$). Além disso, o ERR aumentou a ED_{50} ($P<0.01$), sem afetar o E_{max} ($P>0.05$), em animais adultos. O ECV não afetou a resposta da acetilcolina tanto em animais adolescentes ($P>0.05$) quanto em adultos ($P>0.05$). A análise não identificou diferenças entre adolescentes e adultos dos grupos controle ($P>0.05$).

Nitroprussiato de sódio – A análise da resposta depressora induzida pela infusão intravenosa de NPS (doador de óxido nítrico) indicou que o ERR diminuiu o E_{max} ($P<0.001$) e a ED_{50} ($P<0.05$) da curva dose-resposta em animais adultos. O ECV não afetou a resposta do NPS tanto em animais adultos ($P>0.05$) quanto em adolescentes ($P>0.05$). Animais adultos do grupo ERR apresentaram redução do E_{max} ($P<0.05$) e da ED_{50} ($P<0.05$) quando comparados com o respectivo grupo adolescente, porém comparações entre adolescentes e adultos dos grupos controle não indicou diferenças ($P>0.05$).

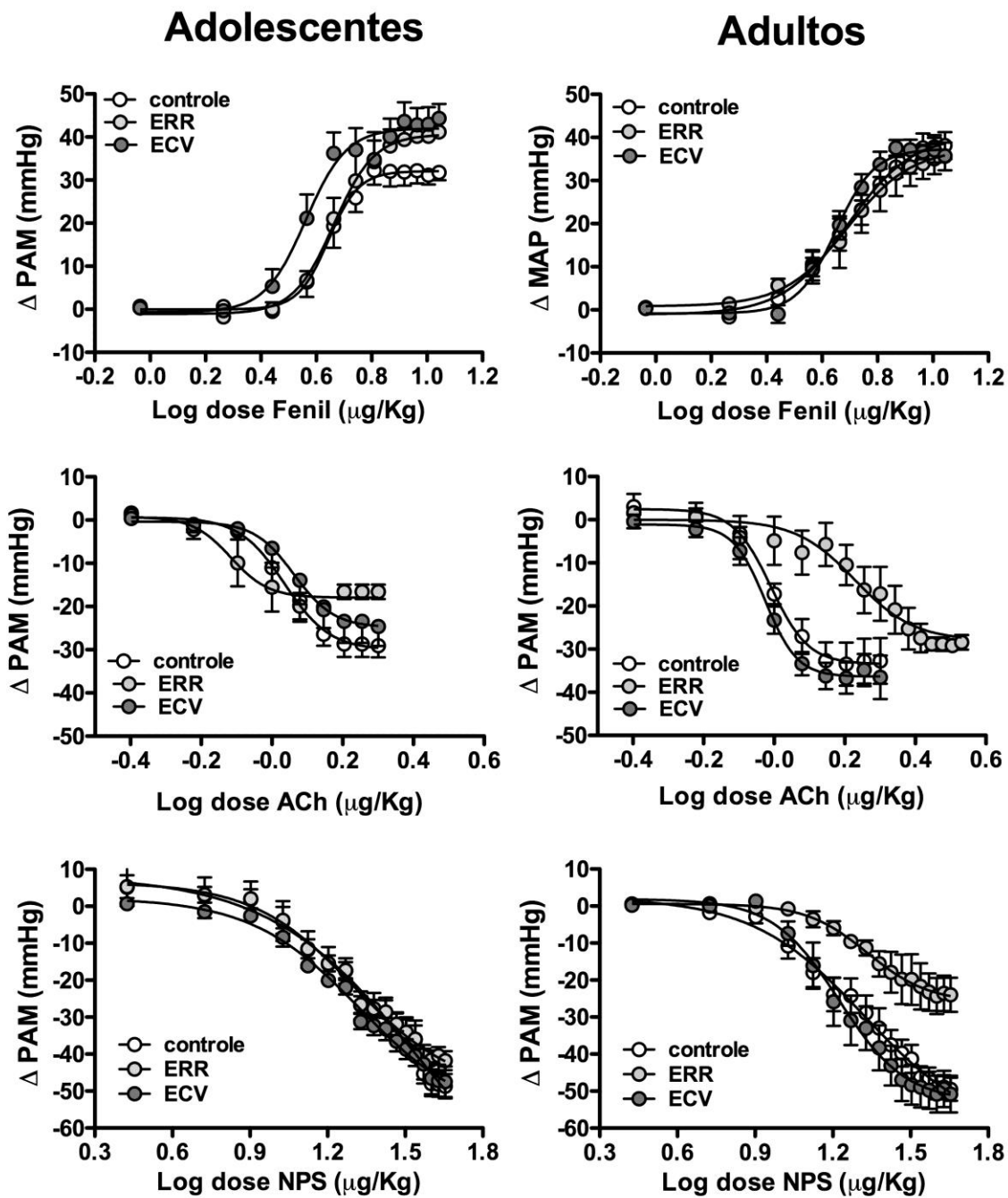


Figura 10 - Variações da pressão arterial média (Δ PAM) causada pela infusão intravenosa de doses crescentes de fenilefrina (Fenil, agonista seletivo de adrenoceptores α_1), acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS, doador de óxido nítrico) animais adolescentes e adultos submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV). Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média.

Tabela 4 – Resposta máxima da PAM (E_{max}) e dose que promove 50% da resposta máxima (ED_{50}) das curvas dose-resposta para fenilefrina (Fenil), acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS) em ratos adultos e adolescentes submetidos ao protocolo de estresse por restrição repetida (ERR) e estresse crônico variável (ECV) por 10 dias consecutivos.

Grupo	n	Fenil		Ach		NPS	
		ED_{50}	E_{max}	ED_{50}	E_{max}	ED_{50}	E_{max}
Adolescente							
Controle	5	0.63±0.03	32±2	0.06±0.04	-30±3	1.25±0.05	-48±3
ERR	6	0.67±0.04	42±1*	-0.08±0.05	-16±1*	1.23±0.01	-42±2
ECV	5	0.57±0.04	45±3*	0.07±0.02	-24±4	1.19±0.02	-47±4
Adulto							
Controle	6	0.67±0.02	38±3	-0.001±0.02	-32±5	1.25±0.03	-50±3
ERR	6	0.66±0.05	36±3	0.20±0.08*	-27±2 [#]	1.39±0.05 [#]	-23±4 [#]
ECV	5	0.65±0.02	35±1 [#]	-0.03±0.02	-36±4	1.23±0.03	-51±4
<i>Interação</i>		$F_{(2,32)}=0.5$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=6$ $P<0.005$	$F_{(2,32)}=9$ $P<0.0008$	$F_{(2,32)}=1$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=2$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=6$ $P>0.05$
<i>Idade</i>		$F_{(2,32)}=2$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=2$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=0.5$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=5$ $P<0.01$	$F_{(2,32)}=2$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=15$ $P<0.0001$
<i>Estresse</i>		$F_{(1,32)}=1$ $P>0.05$	$F_{(1,32)}=3$ $P>0.05$	$F_{(1,32)}=0.9$ $P>0.05$	$F_{(1,32)}=9$ $P<0.005$	$F_{(1,32)}=3$ $P>0.05$	$F_{(1,32)}=2$ $P>0.05$

Valores expressos como média ± EPM

* $P<0.05$ vs grupo controle na mesma idade. [#] $P<0.05$ vs respectivo grupo adolescente.
ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de *Bonferroni*.

5.2 Experimento 2: Efeito a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência.

5.2.1. Efeito a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência sobre os parâmetros somáticos e nível basal de corticosterona plasmática.

Peso corporal - A análise do peso corporal de animais adultos que foram estressados durante a adolescência indicou efeito significativo do tempo ($F_{(1,68)}=347, P<0.0001$), porém sem efeito do estresse ($F_{(2,68)}=1, P>0.05$) ou interação entre tempo e estresse ($F_{(2,68)}=0,5, P>0.05$) (Figura 11).

Peso do Coração – A exposição aos protocolos de estresse crônico durante a adolescência não afetou o peso coração na idade adulta ($P>0.05$) (Tabela 5).

Peso das adrenais - A exposição aos protocolos de estresse crônico durante a adolescência não afetou o peso das adrenais na idade adulta ($P>0.05$) (Tabela 5).

Peso do timo - A exposição aos protocolos de estresse crônico durante a adolescência não afetou o peso do timo na idade adulta ($P>0.05$) (Tabela 5).

Corticosterona plasmática - A Figura 12 mostra o efeito do estresse crônico sobre os níveis basais de corticosterona plasmática. A análise estatística indicou que a exposição ao estresse crônico durante a adolescência afeta os níveis basais de corticosterona plasmática nos animais adultos ($F_{(2,19)}=9, P<0.003$). Teste post-hoc revelou que a exposição ao ERR durante a adolescência aumentou os níveis basais de corticosterona plasmática durante a fase adulta ($P<0.0002$).

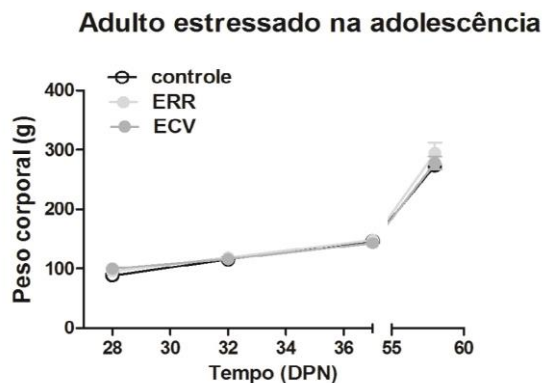


Figura 11 - Variação do peso corporal durante os protocolos de estresse crônico em animais adultos estressados durante adolescência após os 10 dias do protocolo de estresse por restrição repetida (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM) (n= 5-6 animais por grupo). * P<0.05 quando comparado com o grupo controle na mesma idade. ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

Tabela 5 – Peso do coração, da adrenal e do timo em animais adultos estressados durante adolescência após os 10 dias dos protocolos de estresse por exposição repetida (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV).

Grupos	n	Coração		Adrenal		Timo	
		Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo ^a	Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo ^a	Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo ^a
Controle	6	1100±43	4.0±0.2	92±8	0.34±0.03	425±31	1.5±0.1
ERR	7	1036±59	3.5±0.1	107±7	0.37±0.03	450±43	1.5±0.1
ECV	7	1100±53	4.0±0.1	107±7	0.39±0.03	557±56	2.0±0.1
		$F_{(2,19)}=0.5$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=3$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=1$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=0.5$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=2$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=3$ $P>0.05$

Os dados são apresentados com média ± EPM (N= 5-6 animais por grupo)

^a Peso do órgão (mg) / peso corporal (g).

*P<0.05, quando comparado com o grupo controle.

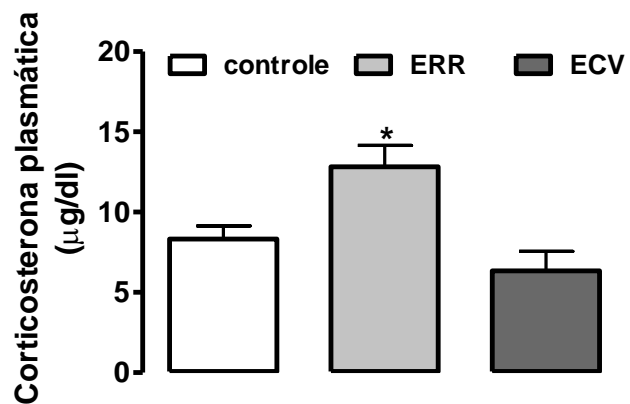


Figura 12 - Valores basais de corticosterona plasmática em animais adultos estressados durante a adolescência após os 10 dias do protocolo de estresse por restrição repetida (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Os dados são apresentados com média \pm EPM (N= 5-6 animais por grupo) * $P < 0.05$, quando comparado com o grupo controle; ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.2.2 Efeito a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência sobre os parâmetros cardiovasculares basais.

A exposição ao ERR ou ao ECV durante a adolescência não afetou os parâmetros basais de PAM ($F_{(2,19)}=2, P>0.05$), PAD ($F_{(2,19)}=4, P>0.05$), PAS ($F_{(2,19)}=0.3, P>0.05$) ou FC ($F_{(2,19)}=0.5, P>0.05$). (Figura 13) na idade adulta.

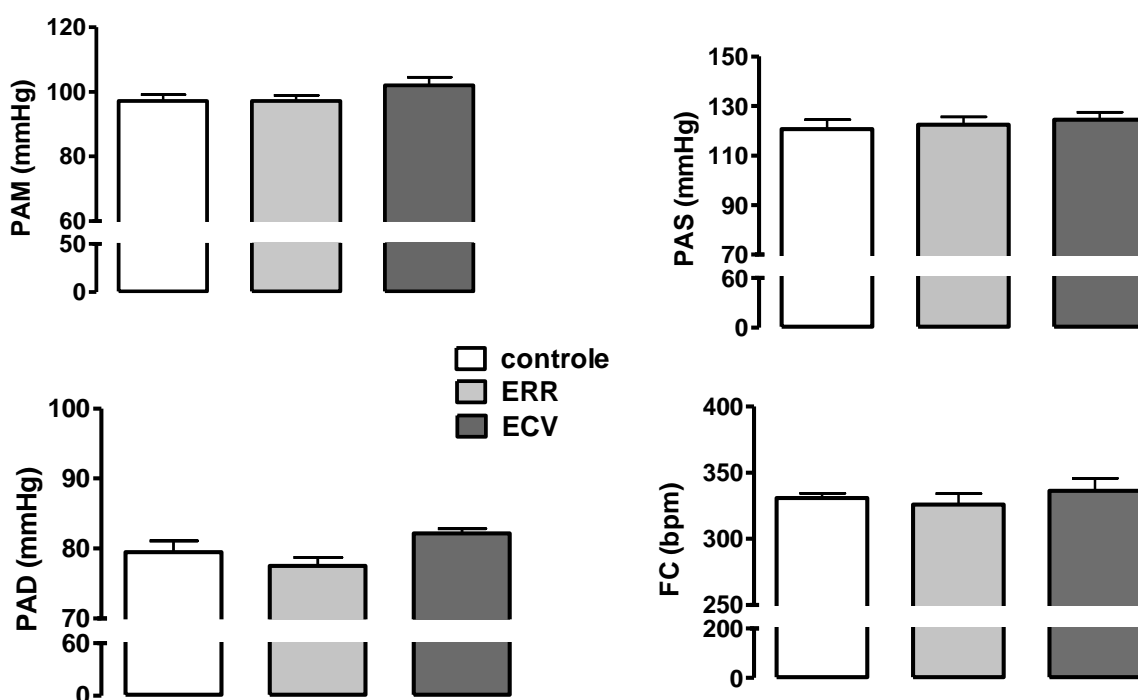


Figura 13 - Valores basais de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em animais adultos estressados durante a adolescência após os 10 dias do protocolo de estresse por restrição repetida (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Os dados são apresentados com média \pm EPM (N= 5-6 animais por grupo) * $P<0.05$, quando comparado com o grupo controle; ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.2.3. Efeito a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência sobre a atividade autônoma cardíaca e FC intrínseca.

O efeito do tratamento intravenoso (i.v.) com propranolol (antagonista de adrenoceptores β) e/ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) sobre a FC é mostrado na Figura 14.

Atividade simpática- A exposição ao estresse crônico durante a adolescência não afetou a ΔFC induzidos pela administração de propranolol na idade adulta ($F_{(2,19)}=3, P>0.05$).

Atividade parassimpática- A exposição ao estresse crônico durante a adolescência não afetou a ΔFC induzidos pela administração metilatropina na idade adulta ($F_{(2,19)}=1, P>0.05$).

FC intrínseca- A análise dos valores de FC após o tratamento combinado de metilatropina e propranolol indicou que nem a exposição ao ERR nem ao ECV afetaram a FCi na idade adulta ($F_{(2,19)}=1, P>0.05$).

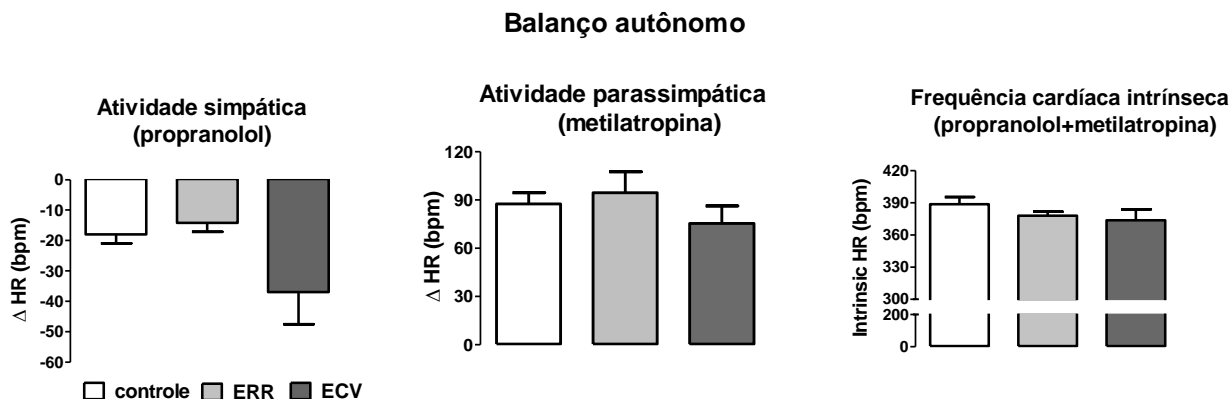


Figura 14 - Variação da frequência cardíaca (Δ FC) induzida pela administração intravenosa de propranolol (antagonista de adrenoceptores β) ou metilotropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) e frequência cardíaca intrínseca (FC intrínseca) observada após a administração combinada de metilotropina e propranolol em animais adultos estressados durante a adolescência submetidos aos protocolos de estresse por restrição repetida (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Os dados são apresentados com média \pm EPM (N= 5-6 animais por grupo) * $P < 0.05$ quando comparado o grupo controle; # $P < 0.05$ quando comparado com o respectivo grupo adolescente. ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.2.4. Efeito a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência sobre a atividade do barorreflexo.

A exposição ao ERR ou ECV durante a adolescência não afetou nenhum dos parâmetros das análises de regressão não-linear e linear do barorreflexo ($P>0.05$) avaliada na idade adulta (Figura 15, Tabela 6).

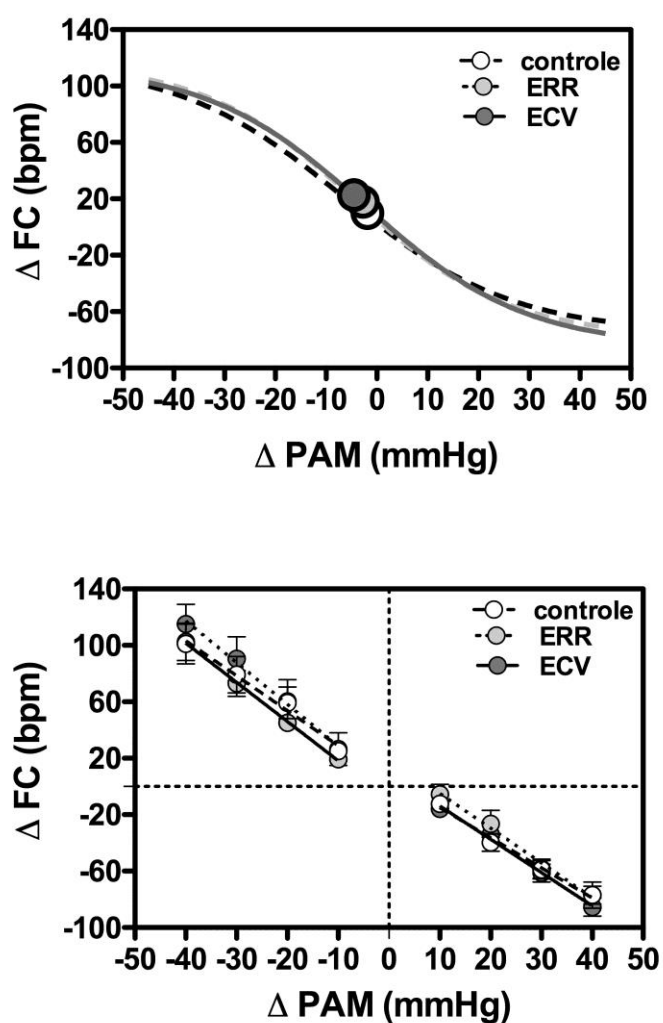


Figura 15 - Análise de regressão não-linear (gráfico superior) e linear (gráfico inferior) do barorreflexo correlacionando variações de pressão arterial média (ΔPAM) e a resposta reflexa de frequência cardíaca (ΔFC) em animais adultos que foram submetidos durante a adolescência ao estresse por restrição repetida (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV). Símbolos nas curvas sigmoides indicam a PA_{50} . Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média nas curvas de regressão linear.

Tabela 6 – Parâmetros derivados da análise de regressão não linear (Ganho, P₁, P₂, variação da FC e PA₅₀) e linear (ganho bradicardia e ganho taquicardia) do barorreflexo em ratos adultos que foram submetidos ao protocolo de estresse por restrição repetida (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) por 10 dias consecutivos durante a adolescência.

Grupo	n	Ganho (bpm/mmHg)	P ₁ (bpm)	P ₂ (bpm)	Varição da FC (bpm)	PA ₅₀ (mmHg)	Ganho bradicardia (bpm/mmHg)	Ganho taquicardia (bpm/mmHg)
Adulto estressado durante a adolescência								
Controle	5	-2.7±0.3	-75±8	101±9	178±17	-3±2	-2.0±0.3	-2.6±0.4
ERR	6	-2.3±0.2	-75±6	102±12	179±12	-4,±2	-2.4±0.3	-2.8±0.3
ECV	6	-2.1±0.3	-85±6	115±12	199±14	-5±4	-2.2±0.2	-2.9±0.6
		$F_{(2,19)}=0.3$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=0.6$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=0.5$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=0.6$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=0.2$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=0.5$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=0.2$ $P>0.05$

Valores expressos com media ± EPM

ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de *Bonferroni*.

*P<0.05, quando comparado com o grupo controle.

5.2.5. Efeito a longo prazo do estresse crônico durante a adolescência sobre a reatividade vascular a agentes vasoativos.

A análise do E_{max} e da ED_{50} das curvas dose-resposta do agente vasoconstritor fenilefrina, bem como dos agentes vasodilatadores acetilcolina e NPS não indicou efeito durante a fase adulta da exposição ao ERR e ECV durante a adolescência (Figura 16 e Tabela 7).

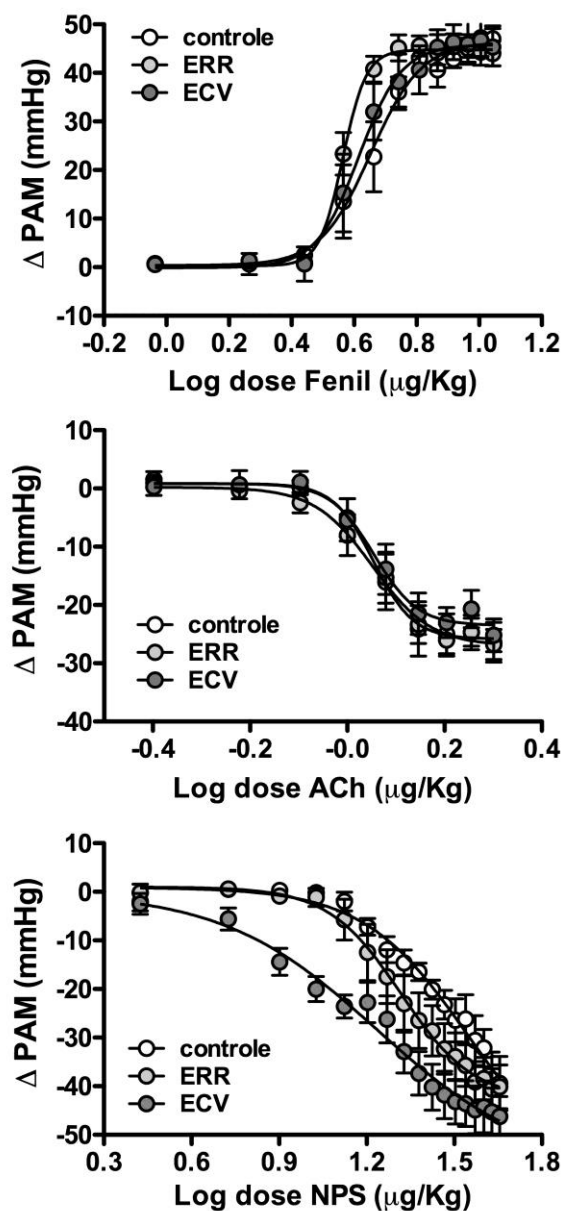


Figura 16 - Variações da pressão arterial média (Δ PAM) causada pela infusão intravenosa de doses crescentes de fenilefrina (Fenil, agonista seletivo de adrenoreceptores α_1), acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS, doador de óxido nítrico) em animais adultos que foram submetidos durante a adolescência ao estresse de restrição repetido (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV). Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média.

Tabela 7 – Resposta máxima da PAM (E_{max}) e dose que promove 50% da resposta máxima (ED_{50}) das curvas dose-resposta para fenilefrina (Fenil), acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS) em ratos adultos que foram submetidos ao protocolo de estresse por restrição repetida (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV) por 10 dias consecutivos.

Grupo	n	Fenil		Ach		SNP	
		ED_{50}	E_{max}	ED_{50}	E_{max}	ED_{50}	E_{max}
Adulto estressado durante a adolescência							
Controle	5	0.66±0.05	47±4	0.06±0.02	-27±3	1.39±0.04	-40±5
ERR	6	0.54±0.02	43±2	0.05±0.03	-27±3	1.30±0.04	-41±4
ECV	6	0.62±0.04	45±3	0.06±0.02	-26±3	1.01±0.1	-47±4
		$F_{(2,19)}=0.6$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=0.5$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=0.1$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=0.1$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=2$ $P>0.05$	$F_{(2,19)}=0.7$ $P>0.05$

Valores expressos com media ± EPM

ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de *Bonferroni*

* $P<0.05$, quando comparado com o grupo controle.

5.3. Experimento 3: Efeitos do estresse crônico em ratos adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.

5.3.1 Efeitos do estresse crônico sobre os parâmetros somáticos e nível basal de corticosterona plasmática em ratos adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.

A Figura 17 mostra os efeitos sobre o peso corporal da exposição ao ERR ou ao ECV durante a adolescência e/ou a fase adulta. A Tabela 8 mostra os efeitos sobre o peso do coração, das adrenais e do timo.

Peso Corporal – A análise estatística indicou efeito significativo do estresse ($F_{(6,46)}=13$, $P<0.0001$). Análise *post-hoc* revelou que a exposição ao ERR ($P<0.05$) ou ao ECV ($P<0.05$) durante a idade adulta reduziu o peso corporal. Entretanto, a exposição tanto ao ERR quanto ao ECV durante a adolescência (ERR: $P>0.05$, ECV: $P>0.05$) ou a exposição repetida aos protocolos de estresse durante a adolescência e a fase adulta (ERR: $P>0.05$, ECV: $P>0.05$) não afetaram o peso corporal.

Peso do Coração - A análise estatística do peso absoluto do coração não indicou efeito significativo dos protocolos de estresse ($F_{(6,46)}=2$, $P>0.05$). Entretanto, os protocolos de estresse afetaram o peso relativo do coração ($F_{(6,46)}=9$, $P<0.0001$). A análise *post-hoc* revelou que a exposição ao ERR ($P<0.05$) ou ao ECV ($P<0.01$) durante a fase adulta aumentou o peso relativo do coração. Entretanto, a exposição aos protocolos de estresse durante a adolescência (ERR: $P>0.05$, ECV: $P>0.05$) ou a exposição repetida durante a adolescência e a fase adulta não afetaram o peso do coração (ERR: $P>0.05$, ECV: $P>0.05$).

Peso das adrenais – A análise estatística do peso absoluto das adrenais indicou efeito significativo do estresse ($F_{(6,46)}=11$, $P<0.0001$). Análise *post-hoc* revelou que a exposição ao ERR ou ao ECV durante a adolescência (ERR: $P<0.05$, ECV: $P<0.05$), bem como a exposição durante a adolescência + fase adulta (ERR: $P<0.001$, ECV: $P<0.001$), aumentaram o peso das adrenais. A análise do peso relativo das adrenais não indicou efeito significativo dos protocolos de estresse crônico ($F_{(6,46)}=2$, $P>0.05$).

Peso do Timo – A análise do peso absoluto ($F_{(6,46)}=2$, $P>0.05$) e relativo ($F_{(6,46)}=1$, $P>0.05$) do timo não indicou efeito significativo dos protocolos de estresse em nenhuma idade.

Corticosterona plasmática – A Figura 18 mostra os efeitos sobre os níveis basais de corticosterona plasmática após a exposição ao ERR ou ao ECV durante a adolescência e/ou a fase adulta. A análise estatística indicou efeito significativo dos protocolos de estresse ($F_{(6,46)}=5$, $P<0.0005$). A análise *post-hoc* revelou que a exposição ao ECV durante a adolescência + fase adulta elevou os níveis plasmáticos de corticosterona.

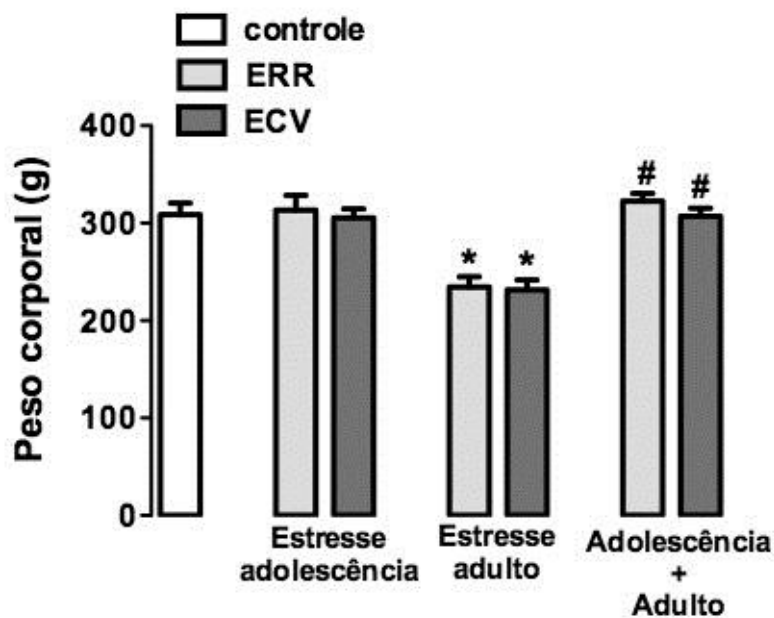


Figura 17 - Peso corporal dos animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou a exposição ao estresse na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto). * $P < 0.05$ quando comparado com o grupo controle, # $P < 0.05$ quando comparado com o respectivo grupo estressado na fase adulta. ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

Tabela 8 – Peso do coração, das adrenais e do timo de animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou a exposição repetida na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto).

Grupos	n	Coração		Adrenal		Timo	
		Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo ^a	Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo ^a	Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo ^a
Controle	7	1002±54	3.4±0.2	86±5.0	0.29±0.02	433±33	1.6±0.06
Estresse na adolescência							
ERR	7	997±31	3.3±0.1	104±3.0*	0.36±0.01	389±34	1.5±0.06
ECV	7	1129±44	3.6±0.1	105±2.0*	0.35±0.01	465±40	1.6±0.1
Estresse na fase adulta							
ERR	7	1062±48	4.4±0.2*	84±3.0	0.35±0.02	359±36	1.5±0.2
ECV	7	1037±35	4.6±0.3*	90±5.0	0.35±0.02	336±21	1.5±0.1
Adolescência + adulto							
ERR	6	965±38	3.1±0.2 [#]	117±3.0* ^{&#}	0.40±0.03*	405±22	1.3±0.05
ECV	6	988±17	3.2±0.1 [#]	114±3.0*	0.38±0.01	380±15	1.2±0.08

Os dados são apresentados com média ± EPM (n= 6-7 animais por grupo)

^a Peso do órgão (mg) / peso corporal (g).

* P<0.05, quando comparado com o grupo controle, [#] P<0.05, quando comparado com o respectivo grupo estressado na fase adulta, & P<0.05, quando comparado com o respectivo grupo estressado na adolescência. ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

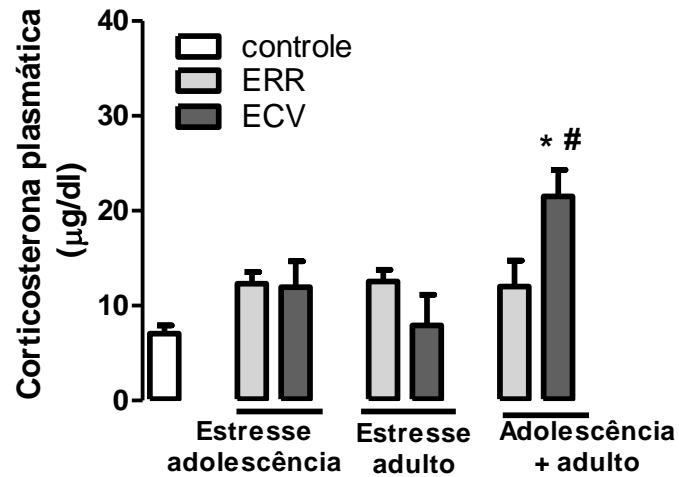


Figura 18- Valores basais de corticosterona plasmática de animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou a exposição repetida na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto). * $P < 0.05$ quando comparado com o grupo controle, # $P < 0.05$ quando comparado com o respectivo grupo estressado na fase adulta. ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.3.2. Efeitos do estresse crônico sobre os parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.

A Figura 19 mostra os efeitos sobre os parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) da exposição ao ERR ou ao ECV durante a adolescência e/ou a fase adulta.

A exposição ao ERR (PAM: $P < 0.001$, PAS: $P < 0.05$, PAD: $P < 0.001$) ou ao ECV (PAM: $P < 0.05$, PAS: $P < 0.05$, PAD: $P < 0.05$) durante a fase adulta elevaram os valores de pressão arterial. A exposição ao ERR (PAM: $P < 0.001$, PAS: $P < 0.001$, PAD: $P < 0.01$) e ao ECV (PAM: $P < 0.05$, PAS: $P < 0.05$, PAD: $P < 0.05$) durante a adolescência + fase adulta também elevaram os valores basais de pressão arterial, porém os valores não foram diferentes daqueles observados nos respectivos grupos estressados somente na fase adulta (PAM: $P > 0.05$, PAS: $P > 0.05$, PAD: $P > 0.05$). A análise estatística da PAM ($F_{(6,46)}=8$, $P < 0.0001$), PAS ($F_{(6,46)}=4$, $P < 0.002$) e PAD ($F_{(6,46)}=7$, $P < 0.0001$) indicou efeito significativo dos protocolos de estresse.

A exposição ao ECV durante a fase adulta ($P < 0.05$) e a exposição repetida ao ERR na adolescência + fase adulta ($P < 0.01$) elevaram os valores basais de FC. A análise estatística dos valores basais de FC também indicou efeito significativo dos protocolos de estresse ($F_{(6,46)}=4$, $P < 0.002$).

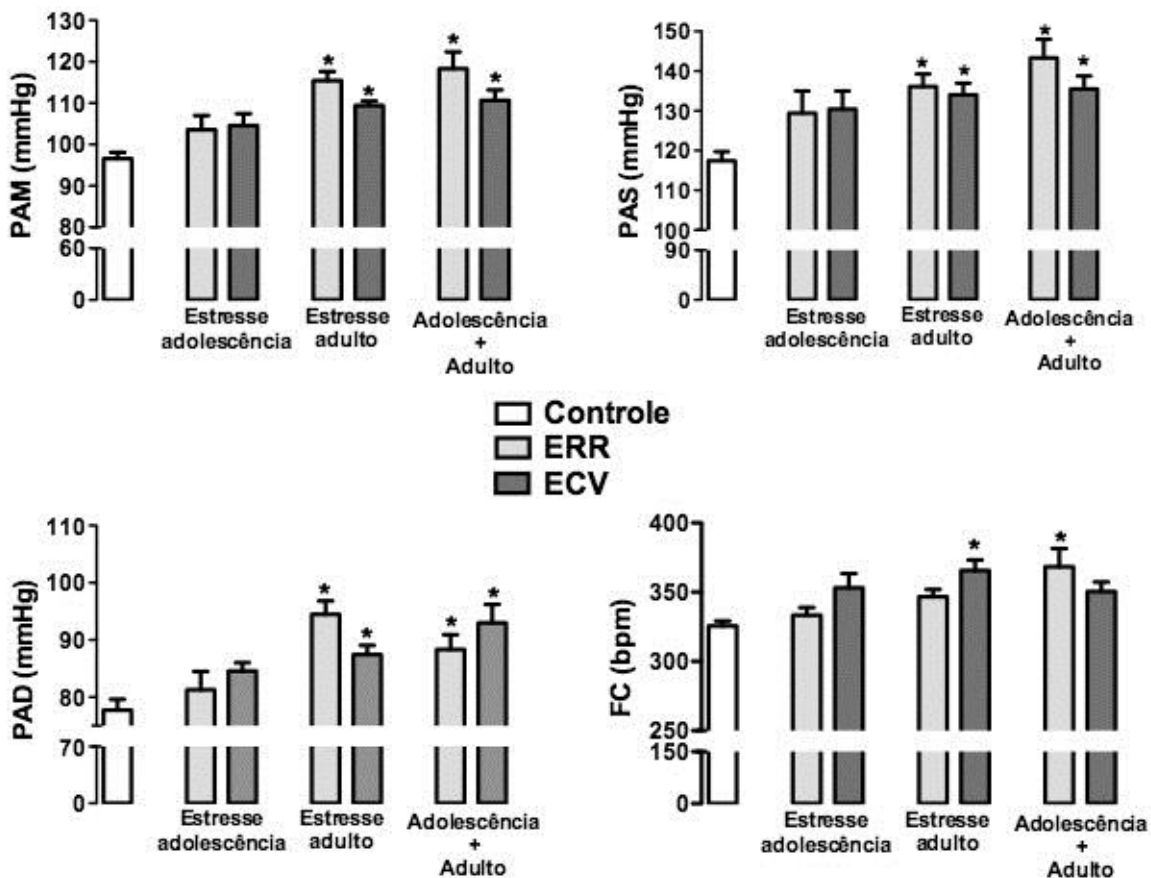


Figura 19 - Valores basais de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou a exposição repetida na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto). * $P < 0.05$ quando comparado com o grupo controle. ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.3.3. Efeito do estresse crônico sobre a atividade autonôma cardíaca e a FC intrínseca (FCi) em animais adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.

O efeito do tratamento intravenoso (i.v.) com propranolol (antagonista de adrenoceptores β) e/ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) sobre a FC é mostrado na Figura 20.

Atividade simpática- A exposição ao ECV durante a fase adulta ($P<0.01$) e a exposição ao ERR ($P<0.05$) ou ao ECV ($P<0.05$) durante a adolescência + fase adulta aumentaram a resposta de redução da ΔFC induzida pela administração i.v de propranolol. A análise estatística indicou efeito significativo dos protocolos de estresse ($F_{(6,45)}=4$, $P<0.002$).

Atividade Parassimpática- A variação da FC (ΔFC) induzida pela administração i.v de metilatropina não indicou efeito significativo dos protocolos de estresse crônico ($F_{(6,45)}=0.8$, $P>0.05$).

FC intrínseca- A análise dos valores de FCi após o tratamento combinado de metilatropina e propranolol indicou que animais expostos ao ECV na adolescência + fase adulta apresentaram valores reduzidos de FC intrínseca ($P<0.05$). A análise estatística indicou efeito significativo dos protocolos de estresse ($F_{(6,45)}=3$, $P<0.004$).

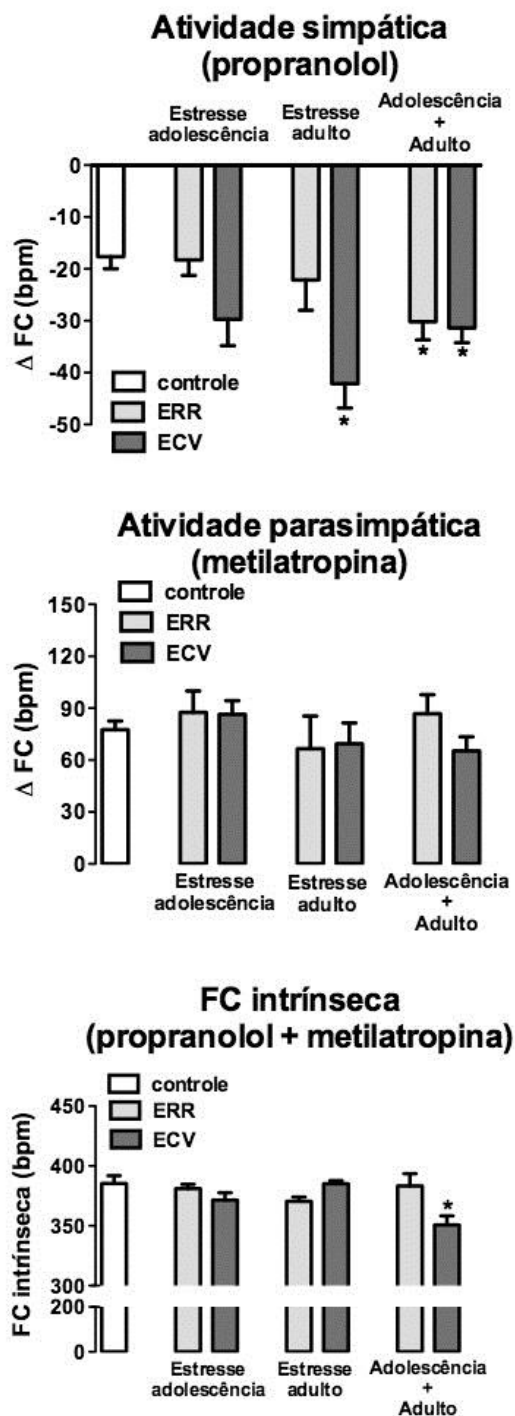


Figura 20 - Variação da frequência cardíaca (ΔFC) induzida pela administração intravenosa de propranolol (antagonista de adrenoceptores β) ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) e valores de frequência cardíaca após a administração combinada de metilatropina e propranolol (FC intrínseca) em animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou expostos aos protocolos de estresse na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto). * $P < 0.05$ quando comparado com o grupo controle. ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.3.4. Efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo em animais adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.

A Figura 21 e a Tabela 9 apresentam os resultados das análises de regressão não-linear e linear do barorreflexo. A análise de regressão não-linear do barorreflexo indicou que a exposição ao ERR ou ao ECV na adolescência e na fase adulta elevaram os valores obtidos nos parâmetros G ($P < 0.05$) e P_2 ($P < 0.05$), ao passo que somente o ERR ($P < 0.05$) afetou esses parâmetros nos animais re-expostos ao protocolo de estresse na adolescência e na fase adulta. Além disso, os valores de P_1 foram menores nos animais expostos ao ERR ou ao ECV durante a adolescência ($P < 0.05$) e durante adolescência + fase adulta ($P < 0.05$), ao passo que os valores foram maiores nos animais expostos ao ECV na fase adulta ($P < 0.05$). A variação de FC foi elevado pelo ERR independente da idade dos animais ($P < 0.05$), ao passo que o ECV elevou esse parâmetro somente nos animais adolescentes ($P < 0.05$). Nenhum dos protocolos de estresse afetaram o parâmetro PA50 em nenhuma das idades ($P > 0.05$).

A avaliação individual da função barorreflexa durante o efeito pressor e depressor da pressão arterial através da análise de regressão linear indicou que a resposta de bradicardia reflexa foi aumentada por ambos os protocolos de estresse crônico nos animais adolescentes ($P < 0.05$) e naqueles sujeitos a exposição repetida durante adolescência + fase adulta ($P < 0.05$), ao passo que somente o ECV reduziu essa resposta nos animais adultos ($P < 0.05$). A resposta de taquicardia reflexa foi facilitada pelo ECV nos animais adolescentes ($P < 0.05$) e por ambos os protocolos de estresse nos animais adultos ($P < 0.05$).

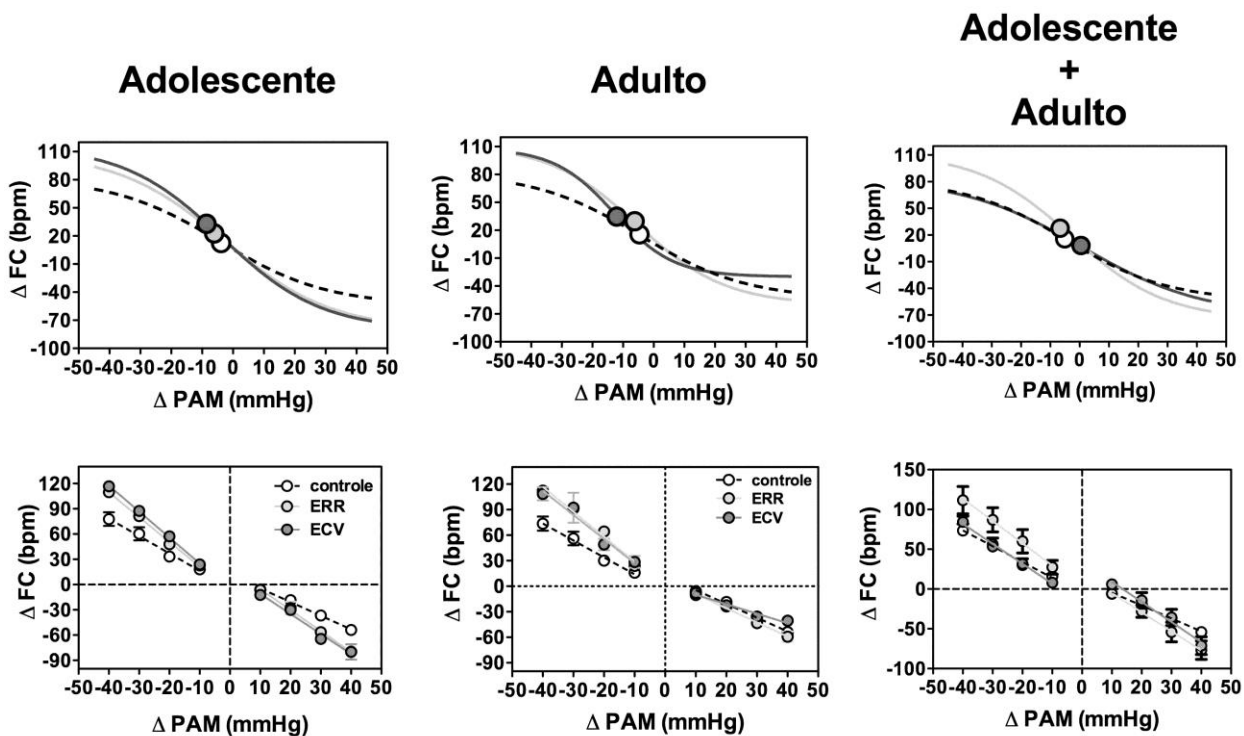


Figura 21 - Análise de regressão não-linear (gráfico superior) e linear (gráfico inferior) do barorreflexo correlacionando variações de pressão arterial média (Δ PAM) e a resposta reflexa de frequência cardíaca (Δ FC) em animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou expostos aos protocolos de estresse na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto). Símbolos nas curvas sigmóides indicam a PA_{50} . Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média nas curvas de regressão linear.

Tabela 9 – Parâmetros derivados da análise de regressão não-linear (Ganho, P₁, P₂, variação da FC e PA₅₀) e linear (ganho bradicardia e ganho taquicardia) do barorreflexo) em animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou expostos aos protocolos de estresse na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto).

Grupo	n	Ganho (bpm/mmHg)	P ₁ (bpm)	P ₂ (bpm)	Variação da FC (bpm)	PA ₅₀ (mmHg)	Ganho bradicardia (bpm/mmHg)	Ganho taquicardia (bpm/mmHg)
Controle	7	-0.9±0.1	-54±3	81±9	129±10	-5±2	-1.7±0.1	-2.1±0.3
Estresse adolescência								
ERR	7	-1.7±0.1*	-79±5*	110±11*	199±14*	-6±2	-2.3±0.3*	-2.8±0.4
ECV	7	-2.2±0.2*	-80±9*	116±11*	210±22*	-8±2	-2.3±0.3*	-3.0±0.4*
Estresse fase adulta								
ERR	7	-2.0±0.1*	-59±6 ^{&}	114±4*	171±8*	-6±1	-1.7±0.2 ^{&}	-3.0±0.2*
ECV	7	-1.8±0.1*	-40±2* ^{&}	110±6*	149±8	-12±2	-1.1±0.1* ^{&}	-2.9±0.3*
Estresse adolescência e fase adulta								
ERR	6	-2.0±0.2*	-77±9*	111±15*	188±21*	-6±3	-2.4±0.3* [#]	-2.8±0.5
ECV	6	-1.2±0.3 ^{&}	-71±7* [#]	89±5 ^{&} [#]	156±12	-0.5±3	-2.6±0.3* [#]	-2.4±0.2
		<i>F</i> _(6,52) =65 <i>P</i> <0.0001	<i>F</i> _(6,52) =36 <i>P</i> <0.0001	<i>F</i> _(6,52) =19 <i>P</i> <0.0001	<i>F</i> _(6,52) =4 <i>P</i> <0.003	<i>F</i> _(6,52) =2 <i>P</i> >0.05	<i>F</i> _(6,52) =34 <i>P</i> <0.0001	<i>F</i> _(6,52) =8 <i>P</i> <0.0001

Valores expressos como média ± EPM

* *P*<0.05, quando comparado com o grupo controle, [#] *P*<0.05, quando comparado com o respectivo grupo estressado na fase adulta, [&] *P*<0.05, quando comparado com o respectivo grupo estressado na adolescência. ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de *Bonferroni*.

5.3.5 Efeito do estresse crônico sobre a reatividade vascular a agentes vasoativos em animais adultos pré-expostos ao estresse durante a adolescência.

Os resultados de reatividade vascular à fenilefrina e ao nitroprussiato de sódio são apresentados na Figura 22 e na Tabela 10.

Fenilefrina – A análise da resposta pressora causada pela infusão intravenosa de fenilefrina (agonista seletivo de adrenoreceptores α_1) indicou que nenhum dos protocolos afetaram a ED₅₀ em nenhuma das condições. O ECV ($P < 0.05$) durante a fase adulta reduziu o E_{max}, porém esse efeito não foi observado nos animais pré-expostos a esse estressor durante a adolescência (grupo adolescente+adulto) ($P > 0.05$).

Nitroprussiato de sódio – A análise da resposta depressora induzida pela infusão intravenosa de NPS (doador de óxido nítrico) indicou que nenhum dos protocolos de estresse afetaram a ED₅₀ em nenhuma das condições. Entretanto, o ERR na fase adulta diminuiu o E_{max} da curva dose-resposta ($P < 0.05$), porém esse efeito não foi identificado nos animais pré-expostos a esse estressor durante a adolescência (grupo adolescente + adulto).

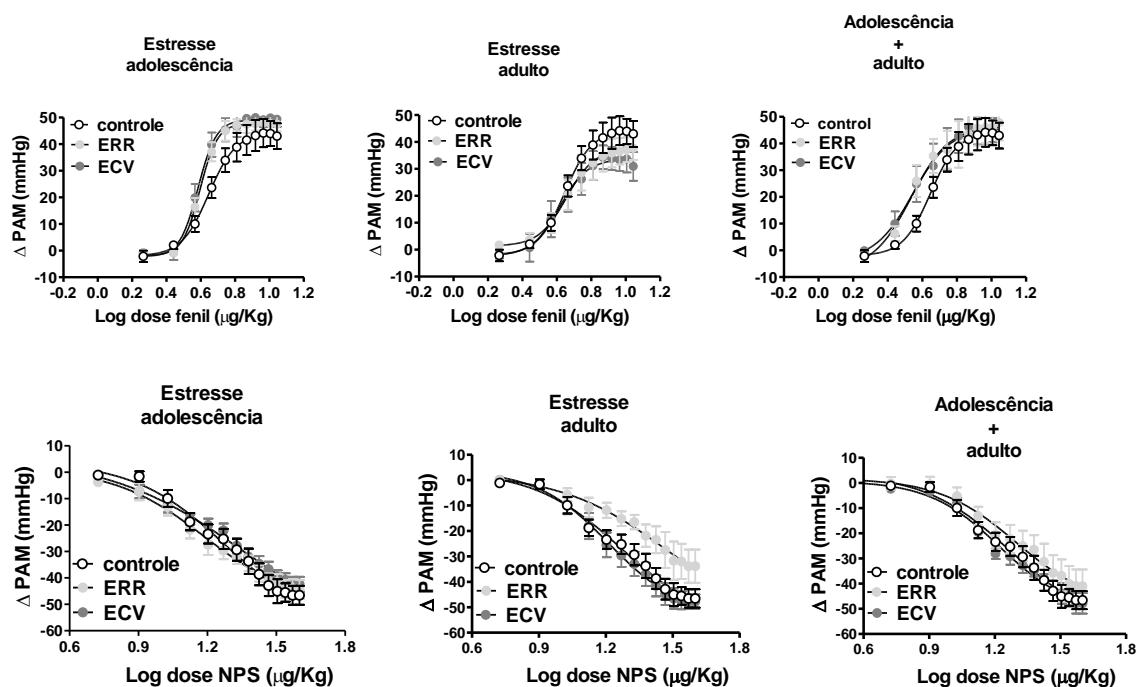


Figura 22 - Variações da pressão arterial média (Δ PAM) causada pela infusão intravenosa de doses crescentes de fenilefrina (Fenil, agonista seletivo de adrenoceptores α_1) e nitroprussiato de sódio (NPS, doador de óxido nítrico) em animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou expostos aos protocolos de estresse na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto). * $P < 0.05$ quando comparado com o grupo controle. ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

Tabela 10 – Resposta máxima da PAM (E_{max}) e dose que promove 50% da resposta máxima (ED_{50}) das curvas dose-resposta para fenilefrina (Fenil) e nitroprussiato de sódio (NPS) em animais adultos expostos aos protocolos de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV) durante a adolescência (estresse entre os dias pós-natal 28-37), durante a fase adulta (estresse entre os dias pós-natal 59-68) ou expostos aos protocolos de estresse na adolescência e na fase adulta (adolescência+adulto).

Grupos	n	Fenil		NPS	
		ED_{50}	E_{max}	ED_{50}	E_{max}
Controle	7	0.66±0.03	43±4	1.21±0.04	-47±3
Estresse na adolescência					
ERR	7	0.61±0.02	47±2	1.12±0.05	-44±3
ECV	7	0.57±0.01	49±2	1.22±0.03	-42±2
Estresse na fase adulta					
ERR	7	0.66±0.04	38±4	1.31±0.03	-32±4*
ECV	7	0.61±0.04	31±5*	1.23±0.04	-48±2
Estresse na adolescência e na fase adulta					
ERR	6	0.63±0.05	47±5 [#]	1.26±0.02	-41±6
ECV	6	0.60±0.04	42±4 ^{#&}	1.20±0.02	-48±4
		$F_{(6,50)}=1.2$ $P>0.05$	$F_{(6,50)}=20$ $P<0.0001$	$F_{(6,53)}=2.0$ $P>0.05$	$F_{(6,53)}=3$ $P<0.02$

Valores expressos como média ± EPM

* $P<0.05$, quando comparado com o grupo controle, [#] $P<0.05$, quando comparado com o respectivo grupo estressado na fase adulta, [&] $P<0.05$, quando comparado com o respectivo grupo estressado na adolescência.

ANOVA monofatorial acompanhado do pós-teste de *Bonferroni*.

6. DISCUSSÃO

Os resultados referentes a comparação dos efeitos do ERR e do ECV em animais adolescentes e adultos (experimento 1), bem como os efeitos a longo prazo do estresse durante a adolescência (experimento 2) são sumarizados na Tabela 11. A Tabela 11 também sumariza os achados dos efeitos do ERR e do ECV em animais adultos pré-expostos aos respectivos protocolos de estresse durante a adolescência (experimento 3).

Tabela 11 – Resumo do efeito da exposição ao ERR ou ao ECV durante a adolescência e/ou na idade adulta.

Período de exposição ao estresse	Adolescência (Revertido na fase adulta?)		Fase adulta		Adolescência + fase adulta (vulnerabilidade?)	
	ERR	ECV	ERR	ECV	ERR	ECV
Parâmetros somáticos						
<i>Peso corporal</i> #	--	--	↓	↓	--	--
<i>Peso coração</i> #	--	--	↑	↑	--	--
<i>Peso adrenal</i>	--	↑(sim)	--	--	↑(sim)	↑(sim)
<i>Peso timo</i> #	↓(sim)	↓*(sim)	--	--	--	--
Eixo HPA						
<i>Corticosterona</i>	↑(não)	--	--	--	--	↑(sim)
Cardiovascular basal						
<i>Pressão arterial</i>	--	↑(sim)	↑	↑	↑(não)	↑(não)
<i>FC</i> #	--	↑(sim)	--	↑	↑(sim)	--
Atividade autônoma						
<i>Atividade simpática</i> #	--	--	--	↑	↑(sim)	↑(não)
<i>Atividade parassimpática</i>	↓(sim)	↓(sim)	--	--	--	--
<i>FC intrínseca</i> #	↓(sim)	--	--	--	--	↓(sim)
<i>Bradycardia reflexa</i>	↑(sim)	↑(sim)	--	↓	↑(sim)	↑(sim)
<i>Taquicardia reflexa</i>	--	↓(sim)	↑	↑	↑(não)	--
Função vascular						
<i>Resposta pressora da fenilefrina</i>	↑(sim)	↑(sim)	--	--	--	--
<i>Resposta depressora da acetilcolina</i>	↓(sim)	--	↓	--	--	--
<i>Efeito depressor do Nitroprussiato de sódio</i>	--	--	↓	--	--	--

Setas para cima e para baixo indicam significativo aumento ou diminuição, respectivamente.

* Estatisticamente não significativo, porém relevante (diminuição de 20%).

diferença adolescente vs adulto no grupo controle.

“Sim” e “Não” entre parênteses nos “grupos adolescência” indica se os efeitos foram revertidos na vida adulta (experimento 2). As designações entre parênteses nos “grupos adolescência + fase adulta” indicam uma vulnerabilidade, na qual foi identificada quando a resposta observada nesses animais foi maior ou diferente daquela identificada nos animais submetidos aos protocolos de estresse somente na idade adulta (grupo fase adulta).

6.1. Influência do tipo de estresse

Estudos em roedores tem demonstrado que alterações nos parâmetros somáticos (e.g., hipertrofia da glândula adrenal, involução do timo e redução do peso corporal) e neuroendócrinos (aumento do nível basal de corticosterona plasmática) são principalmente observados após a exposição a estressores crônicos heterotípicos (e.g., ECV), ao passo que esses parâmetros são minimamente afetados pela exposição a estressores crônicos homotípicos (e.g., ERR) (KOOP et al, 2013; MARGARINOS e MCEWEN 1995; MARIN et al, 2007), possivelmente devido a habituação decorrente da exposição repetida ao mesmo estímulo aversivo (HERMAN, 2013). Entretanto, no presente estudo nenhum dos protocolos de estresse crônico alteraram o peso das adrenais e do timo e o nível basal de corticosterona plasmática nos animais adultos. Nossos resultados corroboram com achados anteriores que demonstraram ausência de alterações no nível de corticosterona em animais adultos expostos ao ECV (JANKORD et al, 2011; FLAK et al, 2011; GRIPPO et al, 2005). Além disso, tem sido demonstrado que os efeitos somáticos são mais pronunciados após a exposição a estressores físicos do que a estímulos aversivos psicológicos (ISGOR et al, 2004), o que pode explicar a ausência de alterações no peso das adrenais e do timo observados no presente estudo após a exposição ao ECV e ao ERR. Entretanto, nós observamos que tanto o ERR quanto o ECV reduziram o ganho de peso corporal. Redução no peso corporal causado pela exposição a estressores homotípico e heterotípicos é bem descrito na literatura (FLAK et al, 2001; KRUGEL et al, 2013; WILLNER, 1997). Neste sentido, nossos resultados indicam um perfil similar de efeito do ERR e do ECV sobre os parâmetros somáticos e neuroendócrinos.

Estudos anteriores em animais adultos demonstraram que a exposição ao ECV promove elevação da pressão arterial e da FC (GRIPPO et al, 2002; 2008). Por outro lado, alguns estudos tem demonstrado que a exposição repetida ao mesmo estressor parece não alterar a pressão arterial e a FC basal (CHEN e HERBERT, 1995; McDougall et al, 2000), possivelmente devido a habituação das respostas cardiovasculares (CHEN e HERBERT, 1995; MCDUGALL et al, 2005). No entanto, nossos resultados mostram que o ERR e o ECV elevaram a pressão arterial basal nos animais adultos, o que contrasta com a ideia de habituação durante a exposição repetida ao mesmo estressor. Nossos resultados são suportados pelos achados de um estudo recente que reportou elevação da pressão arterial basal em ratos adultos expostos a um protocolo de ERR (DAUBERT et al, 2012). Foi demonstrado também no mesmo estudo que a variação da

pressão arterial e FC durante o estresse foi similar na primeira e na quinta sessão (DAUBERT et al, 2012), o que reforça a ideia de ausência de habituação das respostas cardiovasculares.

6.2. Influência da ontogenia

O período da adolescência apresenta uma janela de vulnerabilidade para os efeitos do estresse crônico (DAHL, 2004; ROMEO, 2010). Nós observamos que os animais adolescentes apresentaram valores de FC elevada, quando comparado com os adultos. Estes dados corroboram com dados anteriores indicando que animais adolescentes são “taquicárdicos” quando comparados com seus pares adultos (POTER et al, 2004; RISTUCCIA e SPEAR, 2008; CANESE et al, 2009). Entretanto, nenhum estudo anterior investigou os mecanismos envolvidos na diferença entre os parâmetros basais de FC entre animais adultos e adolescentes. Diante disso, os nossos dados são os primeiros a evidenciar que a FC basal elevada em animais adolescentes é mediada por um tônus simpático aumentado para o coração associado a valores maiores de FC intrínseca. Aumento na frequência cardíaca basal e na atividade simpática cardíaca são fatores de risco para o surgimento de patologias cardiovasculares como insuficiência cardíaca, isquemia do miocárdio e hipertensão (DYER et al, 1980; CARNEY et al, 1993; PALATINI e JULIUS, 1997). Deste modo, diferenças ontogenéticas na função cardiovascular pode indicar vulnerabilidade para os efeitos do estresse durante a adolescência.

Tem sido mostrado que os efeitos somáticos e o aumento do nível basal de corticosterona induzido pelo estresse crônico são exacerbados em animais adolescentes, quando comparados com seus pares adultos (DOREMUS-FITZWATER et al, 2009; STONE e QUARTERMAIN, 1997). Essas evidências apoiam os achados do presente estudo em que adolescentes submetidos ao estresse crônico foram seletivamente mais vulneráveis para os efeitos de hipertrofia da adrenais, involução do timo e aumento do nível basal de corticosterona plasmática. A ausência de alterações nos níveis basais de corticosterona plasmática nos animais submetidos ao ECV corroboram com estudos anteriores que demonstraram que esse paradigma de estresse crônico não afeta os níveis de corticosterona plasmática nem a expressão de RNAm do fator liberador de corticotrofina no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (MASLOVA et al, 2002; JANKORD et al, 2011; Cruz et al, 2012). Além disso, a facilitação da resposta de corticosterona plasmática a um estressor novo (isto é, diferente dos estímulos aversivos utilizados durante o estresse crônico) desencadeada pelo ECV é mais pronunciada em animais

adultos do que nos adolescentes (JANKORD et al, 2011), o que reforça a ideia de uma resistência dos animais adolescentes para os efeitos neuroendócrinos do ECV. Por outro lado, a elevação dos níveis de corticosterona induzido pelo protocolo de ERR na adolescência corroboram com resultados de DOREMUS-FITZWATER e colaboradores (2009), que relataram que animais adolescentes parecem ter uma menor habituação das respostas da corticosterona durante a exposição repetida ao estresse por restrição.

Nossos resultados são os primeiros a evidenciar alterações cardiovasculares após exposição a protocolos de estresse crônico em animais adolescentes. A elevação da pressão arterial e da FC induzida pelo ECV opõe-se a estudos anteriores que demonstram que o ECV não alterou a PAS basal em ratos adolescentes (MASLOVA et al, 2002). As razões para a discrepância não são claras, mas podem decorrer de diferenças metodológicas. Por exemplo, as medidas cardiovasculares desse estudo anterior foram obtidas através da aferição indireta da pressão arterial pelo método de pletismografia de cauda (MASLOVA et al, 2002). De fato, do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a investigar o impacto do estresse crônico psicológico na função cardiovascular de animais adolescentes através da mensuração direta da pressão arterial. Em relação ao ERR, apesar de termos observado uma elevação na pressão arterial dos animais adultos expostos a esse estressor, o ERR não afetou os valores basais de pressão arterial nos animais adolescentes, o que indica uma resistência dos animais adolescentes aos efeitos de estressores homotípicos sobre a pressão arterial. Além disso, nossos resultados fornecem evidência de que estressores homotípicos e heterotípicos promovem diferentes impactos na função cardiovascular de animais adolescentes.

6.3. Efeito a longo prazo da exposição ao estresse durante a adolescência

Exceto pela elevação no nível basal de corticosterona plasmática, observou-se que todas as alterações promovidas pela exposição ao estresse crônico durante a adolescência foram revertidas na idade adulta. Do nosso conhecimento, essas são as primeiras evidências de que alterações cardiovasculares induzidas por estresse psicológicos durante a adolescência são revertidas na idade adulta. No entanto, estudos anteriores em ratos demonstraram que a exposição ao estresse crônico durante a adolescência provocam numerosas mudanças comportamentais na vida adulta (BUWALDA et al, 2011; ISGOR et al, 2004; MASLOVA et al, 2002; CHABY et al, 2013; TSOORY et al, 2007). Além disso, apesar dos níveis basais de

glicocorticoides não diferirem entre os animais controle e estressados, foram observados impactos na vida adulta do estresse crônico durante a adolescência sobre a ativação do eixo HPA em resposta a um estressor novo (ISGOR et al, 2004; MCCORMICK et al, 2008). Alterações morfológicas e neuroquímicas também tem sido relatadas no encéfalo de animais adultos submetidos a estímulos aversivos durante a adolescência (BUWALDA et al, 2011; ISGOR et al, 2004; BAZAK et al, 2009). Portanto, os resultados do presente estudo em conjunto com as evidências mencionadas acima sugerem que o estresse nas fases iniciais da vida afetam de maneira diferente os parâmetros fisiológicos, comportamentais e morfológicos/neuroquímicos encefálicos na idade adulta.

Os resultados do experimento 2 claramente demonstraram que os efeitos somáticos e cardiovasculares (e parcialmente a elevação da corticosterona plasmática) foram completamente revertidos na fase adulta. Entretanto, uma importante questão que surge a partir desses resultados é *“a exposição ao estresse durante a adolescência causaria uma vulnerabilidade a eventos estressores durante a vida adulta?”*. Para responder essa questão nós realizamos o experimento 3, no qual nós avaliamos os efeitos do ERR e do ECV em animais adultos que haviam sido expostos ao respectivo protocolo de estresse crônico durante a adolescência.

Nós observamos que a exposição repetida durante a adolescência e fase adulta ao ECV, porém não ao ERR, aumentou o nível basal de corticosterona plasmática. Esse achado fornece evidência de uma vulnerabilidade para os efeitos neuroendócrinos desencadeados por estressores heterotípicos em animais com histórico de exposição a eventos estressores durante a adolescência. Esses achados estão de acordo com evidências já discutidas acima de que alterações na atividade do eixo HPA são observados principalmente após a exposição a protocolos de estresse heterotípicos, ao passo que protocolos que envolvem a exposição repetida ao mesmo estressor afetam minimamente a atividade do eixo HPA (MAGARINOS e MCEWEN, 1995; MARIN et al, 2007; KOPP et al, 2013). A elevação dos níveis basais de corticosterona em animais pré-expostos ao ECV durante a adolescência pode estar relacionado com alterações em mecanismos encefálicos de retroalimentação negativa do eixo HPA. Por exemplo, foi demonstrado que a exposição a protocolos de estresse crônico durante a adolescência reduziu a expressão de receptores de glicocorticóides (GR) e mineralocorticoides (MR) no hipocampo durante a vida adulta (MCCORMICK et al, 2010). Vários estudos tem demonstrado que a lesão do hipocampo aumenta os níveis basais de glicocorticóides (para revisão ver HERMAN et al,

2003; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009), possivelmente devido à perda de MR (HERMAN et al, 2003). Além disso, a deleção de GR em estruturas prosencefálicas, incluindo o hipocampo, também elevou os níveis basais de corticosterona (BOELY et al, 2005; FURAY et al, 2008). A lesão do hipocampo ou a deleção de receptores de glicocorticóides em regiões prosencefálicas, incluindo o hipocampo, também facilita a resposta de ativação do eixo HPA durante sessões agudas de estresse, sendo essas alterações mais evidentes no período de recuperação após a conclusão da sessão de estresse (HERMAN et al, 2003; BOYLE et al., 2005; FURAY et al., 2008; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). Além de alterações centrais, outro estudo demonstrou que o ECV causa hiperplasia e hipertrofia da glândula adrenal, ocasionando aumento na resposta de secreção de corticosterona pela glândula (ULRICH-LAI et al, 2006). Nós identificamos um aumento no peso das adrenais dos animais expostos ao ECV na adolescência + fase adulta, assim indicando que alterações periféricas também podem contribuir para o aumento nos níveis basais de corticosterona nestes animais.

De maneira interessante, nós observamos que a exposição ao estresse crônico na adolescência protegeu os animais dos efeitos do ERR e do ECV sobre o peso corporal na vida adulta. Tem sido demonstrado que a exposição a eventos estressantes durante a adolescência causa importantes alterações morfológicas e funcionais no sistema nervoso central na vida adulta (MCCORMICK e GREEN, 2013). Apesar dessas mudanças estarem principalmente relacionadas com alterações de comportamentos relacionados à ansiedade e depressão na vida adulta (MCCORMICK e GREEN, 2013), elas também podem proteger os animais dos efeitos do estresse sobre o peso corporal na vida adulta. Os resultados de peso corporal do presente estudo também corroboram com outro estudo que reportou uma menor resposta de ulceração gástrica em animais expostos ao estresse de choque nas patas na adolescência + fase adulta, quando comparado com animais estressados somente na vida adulta (OVERMIER e MURISON, 1991), assim reforçando a ideia de que a exposição a eventos estressores na adolescência parece modular a sensibilidade para o desenvolvimento de patologias relacionadas ao estresse na vida adulta. De qualquer maneira, experimentos futuros serão necessários para elucidar os mecanismos relacionados com o efeito protetor do estresse na adolescência sobre o impacto do estresse crônico sobre o peso corporal na vida adulta.

Com relação aos efeitos cardiovasculares e sobre a atividade autônoma, nós observamos elevação da pressão arterial nos animais expostos tanto ao ERR quanto ao ECV na adolescência + fase adulta, porém esses efeitos não foram significativamente diferentes daqueles

observados nos animais sujeitos ao estresse crônico somente na vida adulta. No entanto, o histórico de estresse durante adolescência afetou os efeitos do ERR e do ECV sobre a FC basal e a atividade autônoma cardíaca na vida adulta. De fato, nós observamos que a exposição na adolescência + idade adulta ao ERR elevou a FC basal através de um aumento na atividade simpática cardíaca, um efeito não observado nos animais sujeitos a este estressor somente na vida adulta. Além disso, apesar do ECV na fase adulta causar taquicardia de repouso, este efeito não foi observado nos animais expostos repetidamente a este estressor na adolescência e na fase adulta. Entretanto, o ECV na adolescência e na fase adulta elevou a atividade simpática cardíaca e reduziu a FC intrínseca. Como já mencionado acima, aumento na frequência cardíaca basal e na atividade simpática cardíaca são fatores de risco para o surgimento de patologias cardiovasculares como insuficiência cardíaca, isquemia do miocárdio e hipertensão (DYER et al, 1980; CARNEY et al, 1993; PALATINI e JULIUS, 1997). Além disso, alterações no balanço autônomo cardíaco no sentido de uma redução da contribuição parassimpática tem sido considerado um fator de risco para morbidade e mortalidade cardiovascular (CARNEVALI e SGOIFO, 2014).

Em conjunto, os nossos resultados indicam que a exposição a eventos estressores crônicos durante a adolescência acarreta uma vulnerabilidade para os efeitos neuroendócrinos, cardíacos e autônomos do estresse na vida adulta. Os efeitos neuroendócrinos parecem ser principalmente associados com estressores heterotípicos, ao passo que os efeitos sobre a função cardiovascular são independentes do paradigma de estresse. Esses achados estão de acordo com evidências de que animais expostos ao estresse na adolescência tornaram-se mais propensos a responder excessivamente ao estresse na vida adulta. Por exemplo, estudos prévios demonstraram que animais expostos repetidamente ao estresse na adolescência e na fase adulta apresentaram respostas comportamentais ao estresse mais pronunciadas do que os animais expostos a eventos estressores somente na vida adulta (TSOORY et al, 2006; AVITAL e RICHTER-LEVIN, 2005). Os resultados do presente estudo complementam esses achados ao fornecerem a primeira evidência de que eventos aversivos durante a adolescência também acarretam uma vulnerabilidade durante a vida adulta aos efeitos cardiovasculares e neuroendócrinos ao estresse, o que sugere que adversidades durante a adolescência podem alterar permanentemente os mecanismos de resposta ao estresse.

6.4. Mecanismo das alterações cardiovasculares provocadas pelo estresse

O mecanismo pelo qual o estresse crônico provoca alterações cardiovasculares são pouco compreendidos. Nós observamos que a taquicardia de repouso induzida pelo ECV nos animais adultos foi mediada por um aumento no tônus simpático para o coração, o que corrobora com estudos anteriores (GRIPPO et al, 2002; 2004). Interessantemente, nós observamos que a elevação da FC induzida pelo ECV nos animais adolescentes foi mediado pela diminuição da atividade parassimpática cardíaca, sem alteração do tônus simpático cardíaco. A razão para diferença entre animais adolescentes e adultos não está completamente elucidada, mas pode ser resultado do elevado tônus simpático basal para o coração observado nos animais adolescentes. É importante notar que, apesar do tônus simpático cardíaco basal aumentado e da FC elevada nos adolescentes comparado com os adultos, o ECV causou um aumento adicional na FC dos animais adolescentes através da modulação da atividade vagal, o que pode indicar uma vulnerabilidade dos adolescentes para o impacto do estresse crônico na atividade do sistema nervoso autônomo.

Apesar do comprometimento na função autônoma cardíaca dos animais adolescentes terem sido revertidos na fase adulta (ou seja, animais adultos expostos aos protocolos de estresse somente na adolescência não apresentaram prejuízo na função autônoma cardíaca), o histórico de estresse durante adolescência afetou os efeitos da re-exposição ao ERR e ao ECV sobre a FC basal e a atividade autônoma cardíaca na vida adulta. De fato, nós observamos que o ERR em animais adultos expostos a esse protocolo de estresse durante a adolescência elevou a FC basal através de um aumento na atividade simpática cardíaca, um efeito não observado nos animais sujeitos a este estressor somente na vida adulta. Além disso, apesar do ECV na fase adulta causar taquicardia de repouso, este efeito não foi observado nos animais expostos repetidamente a esse estressor na adolescência e fase adulta. Entretanto, o ECV na adolescência + fase adulta elevou a atividade simpática cardíaca e reduziu a FC intrínseca. Aumento na frequência cardíaca basal e na atividade simpática cardíaca são fatores de risco para o surgimento de patologias cardiovasculares como insuficiência cardíaca, isquemia do miocárdio e hipertensão (DYER et al, 1980; CARNEY et al, 1993; PALATINI e JULIUS, 1997). Além disso, alterações no balanço autonômico cardíaco no sentido de uma redução da contribuição parassimpática tem sido considerado um fator de risco para morbidade e mortalidade cardiovascular (CARNEVALI e SGOIFO, 2014). Deste modo, nossos resultados indicam que, independentemente do tipo de estresse, a exposição a eventos estressores crônicos durante a

adolescência acarreta uma vulnerabilidade para os efeitos cardíacos e autônomos do estresse na vida adulta.

Tem sido proposto que prejuízo da atividade barorreflexa é um importante mecanismo fisiopatológico envolvido no desenvolvimento e progressão da hipertensão arterial (GRASSI et al, 2006; HONZIKOVA et al, 2009). Deste modo, a redução na resposta taquicárdica reflexa em animais adolescentes e na resposta bradicárdica do barorreflexo em animais adultos indica que comprometimento na atividade barorreflexa pode estar envolvido no aumento da pressão arterial causado pelo ECV. Comprometimento da atividade barorreflexa também está associado a hiperatividade do tônus simpático e redução da atividade parassimpática (GRASSI et al, 2006), o que sugere que alterações na atividade do barorreflexo também podem explicar a elevação da FC basal observada nos animais submetidos ao ECV.

Nós observamos uma facilitação das respostas de FC do barorreflexo nos animais adultos e adolescentes expostos ao ERR. A facilitação da atividade barorreflexa observada nos animais adultos submetidos ao ERR corrobora com resultados anteriores (CONTI et al, 2001; PORTER et al, 2004). A exposição repetida durante a adolescência + a fase adulta tanto ao ERR quanto ao ECV também aumentaram a atividade do barorreflexo. Facilitação da atividade barorreflexa pode constituir um importante mecanismo contrapondo-se, ou inibindo, as alterações cardiovasculares e autônomas induzidas pelos protocolos de estresse crônico. Entretanto, resposta taquicárdica exacerbada compreende um fator de risco para o desenvolvimento de isquemia do miocárdio e morte súbita (DYER et al, 1980; PALATINI et al, 1997). Deste modo, o aumento na resposta taquicárdica do barorreflexo em animais adultos submetidos ao ERR ou ao ECV e nos ratos expostos ao ERR durante a adolescência + fase adulta pode constituir um fator de risco para o desenvolvimento de patologias cardiovasculares.

Os nossos achados fornecem evidências de que, independentemente da idade, um possível envolvimento de alterações na atividade do barorreflexo nas respostas cardiovasculares/autônomas parecem depender do paradigma de estresse. Assim, alterações na atividade barorreflexa pode constituir um mecanismo envolvido nas respostas desencadeadas por estressores heterotípicos, ao passo que as alterações nesse mecanismo reflexo parece constituir uma importante resposta adaptativa inibindo (ou se opondo) as alterações cardiovasculares induzidas por estressores homotípicos. Outro aspecto relevante é que a pré-exposição aos protocolos de estresse durante a adolescência afetaram as alterações na atividade do barorreflexo induzidas pelos dois protocolos de estresse crônico na vida adulta. De maneira importante, o

comprometimento na resposta bradicárdica reflexa induzida pelo ECV foi revertido para uma facilitação, o que pode constituir uma importante resposta adaptativa em animais com histórico de estresse durante a adolescência.

Hipertensão é associada com disfunções vasculares, nas quais são principalmente caracterizadas por comprometimento na função endotelial e na dilatação anormal dos vasos (TANG et al, 2010). Assim, a resposta reduzida dos agentes depressores acetilcolina e NPS em animais adultos submetidos ao ERR sugere que prejuízo no relaxamento vascular pode explicar, ao menos em parte, a elevação da pressão arterial observada nesses animais. Aumento na resposta vascular de agentes vasoconstritores também tem sido associado com a hipertensão arterial (LAURENT et al, 1987; CHANG et al, 2002). Deste modo, o aumento da resposta pressora da fenilefrina observada nos animais adolescentes submetidos ao ECV pode estar relacionado com o aumento da pressão arterial observado nesses animais. De maneira interessante, a pré-exposição ao ERR durante a adolescência inibiu os efeitos desse estressor sobre a resposta depressora do NPS na vida adulta, o que pode constituir outra resposta adaptativa.

Os nossos resultados são os primeiros a evidenciar alterações na reatividade vascular a agentes vasoativos após a exposição crônica a estímulos aversivos utilizando uma abordagem *in vivo*. Entretanto, estudos anteriores demonstraram alterações na reatividade vascular em vasos isolados de animais adultos submetidos a protocolos de estresse crônico. Neste sentido, foi demonstrado que o ECV reduziu a resposta de relaxamento vascular a agentes vasodilatadores em anéis de aorta *in vitro* (D'AUDIFFRET et al, 2010; ISINGRINI et al, 2011; ISINGRINI et al, 2012), porém não afetou a resposta ao agente vasoconstritor fenilefrina (D'AUDIFFRET et al, 2010; ISINGRINI et al, 2011). Nossos resultados contrastam com estes resultados ao não evidenciar alterações na resposta depressora da acetilcolina e do NPS em animais adultos submetidos ao ECV. Entretanto, é importante ressaltar que as alterações na pressão arterial decorrem principalmente da ação dos agentes vasoativos em vasos de resistência. Em uma ampla busca na literatura nós só encontramos um estudo que investigou o efeito do ECV na reatividade vascular em vasos de resistência, no qual não encontrou efeito do ECV na resposta de vasoconstrição da noradrenalina nas artérias safena e mesentérica (BOUZINOVA et al, 2012). Entretanto, apesar da sensibilidade à noradrenalina não ser afetada pelo ECV, este estudo prévio encontrou importantes efeitos do ECV em mecanismos neuronal e extra neuronal de captação de noradrenalina (BOUZINOVA et al, 2012). Deste modo, a ausência de efeito do

ECV na reatividade vascular a agentes vasoativos observados no presente estudo não exclui a possibilidade de que mecanismos controlando o efeito da atividade nervosa simpática vascular e da função endotelial sejam alteradas pelo ECV. Os efeitos da exposição repetida ao mesmo estressor sobre a reatividade vascular são menos compreendidos. Entretanto, foi reportado que a exposição ao ERR afetou a resposta a agentes vasoconstrictor e vasodilatador em anéis de aorta isolada (CORDELLINI e VASSILIEFF, 1998). Estes resultados suportam os nossos resultados em que o ERR afetou a resposta ao agentes vasoativos em animais adolescentes e adultos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados sugerem que o período da adolescência representa uma janela de vulnerabilidade para os efeitos somáticos e neuroendócrino de estressores crônicos homotípicos e heterotípicos. Os resultados também indicam uma influência da exposição ao estresse crônico sobre o sistema nervoso autônomo, a atividade do barorreflexo e função vascular, nas quais são dependentes da idade e do tipo de estresse. Alterações nessas funções parecem constituir mecanismos importantes na etiologia das alterações de pressão arterial e FC induzidos pelo estresse crônico.

Os achados do presente estudo indicam consequências mínimas na vida adulta da exposição ao estresse crônico durante a adolescência. No entanto, os resultados sugerem que a exposição ao estresse durante a adolescência acarreta uma vulnerabilidade aos efeitos neuroendócrinos, autônomos e cardiovasculares desencadeados pela exposição a estressores crônicos na vida adulta. A vulnerabilidade para os efeitos neuroendócrinos parecem ser principalmente associados com estressores heterotípicos, ao passo que os efeitos sobre a função cardiovascular/autônoma são independentes do paradigma de estresse.

8. ANEXO

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA G. Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. **Trends Endocrinol Metab.**, v.9, n.8, p.329-36, 1998.

BARRON, B.A; VAN LOON, G.R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. **J Auton Nerv Syst**, v.28, n.2, p.179-187. 1989.

BAZAK N, KOZLOVSKY N, KAPLAN Z, MATAR M, GOLAN H, ZOHAR J, RICHTER-LEVIN G, COHEN H. Pre-pubertal stress exposure affects adult behavioral response in association with changes in circulating corticosterone and brain-derived neurotrophic factor. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n.6, p. 844-858, 2009.

BHATNAGAR S, VINING C. Facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. **Horm Behav.**, v. 43, n.1, p.158-65, 2003.

BOUZINOVA, E.V; MOLLER-NIELSEN, N.; BOEDTKJER, D.B.; BROEGGER, T.; WIBORG, O.; AALKJAER, C. MATCHKOV V.V. Chronic mild stress-induced depression-like symptoms in rats and abnormalities in catecholamine uptake in small arteries. **Psychosom Med.**, v.74, n.3, p. 278-287, 2012.

BOYLE M.P, BREWER J.A, FUNATSU M, WOZNIAK D.F, TSIEN J.Z, IZUMI Y, MUGLIA L.J. Acquired deficit of forebrain glucocorticoid receptor produces depression-like changes in adrenal axis regulation and behavior. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.102, n.2, p.473-478, 2005.

BOWMAN, R.E.; FERGUSON, D., LUINE, V.N. Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. **Neuroscience**, v.113, p.401-410, 2002.

BRISTOW, J.D.; HONOUR, A.J.; PICKERING, G.W.; SLEIGHT, P. e SMYTH, H.S. Diminished baroreflex sensitivity in high blood pressure. **Circulation**, v.39, n.1, Jan, p.48-54, 1969.

BUWALDA B, GEERDINK M, VIDAL J, KOOLHAAS JM. Social behavior and social stress in adolescence: a focus on animal models. **Neurosci Biobehav Rev**, v.35, n.8, p. 1713-1721, 2011.

CANESE R., ADRIANI W., MARCO E.M., DE PASQUALE F., LORENZINI P., DE LUCA N., FABI F., PODO F., LAVIOLA G. Peculiar response to methylphenidate in adolescent compared to adult rats: a pHMRI study. **Psychopharmacology** (Berl), v.203, n.1, p.143-153, 2009.

CARNEY, R.M.; FREEDLAND, K.E; RICH, M.W.; SMITH, L.J.; JAFFE, A.S. Ventricular tachycardia and psychiatric depression in patients with coronary artery disease. **Am J Med.**, v.95, n.1, p.23-28, 1993.

CARNEVALI L, SGOIFO A. Vagal modulation of resting heart rate in rats: the role of stress, psychosocial factors, and physical exercise. **Front Physiol.**, v.5, p. 118, 2014.

CASEY B.J., GETZ S., GALVAN A. The adolescent brain. **Dev Rev.**, n.1, p.62-77, 2008.

CHABY L.E., CAVIGELLI S.A., WHITE A., WANG K., BRAITHWAITE V.A. Long-term changes in cognitive bias and coping response as a result of chronic unpredictable stress during adolescence. **Front Hum Neurosci**, v 7, p. 328, 2013.

CHANG H.R., LEE R.P., WU C.Y, CHEN H.I. Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: a comparison between rats with normotension and hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 29, n.4, p. 275-280, 2002.

CHEN X., HERBERT J. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. **Neuroscience**, v. 64, n.3, p.675-85, 1995.

CHOI D.C., FURAY A.R., EVANSON N.K., ULRICH-LAI Y.M., NGUYEN M.M., OSTRANDER MM, HERMAN JP. The role of the posterior medial bed nucleus of the stria terminalis in modulating hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responsiveness to acute and chronic stress. **Psychoneuroendocrinology**, v.33, n.5, p.659-669, 2008.

CHROUSOS G.P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**, v.5, p.374-381, 2009.

CONRAD, C.D; LEDOUX, J.E; MAGARINOS, A.M.; McEWEN, B.S. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. **Behav Neurosci**, v.113, p.902- 913, 1999.

CONTI, L.H; SHANNON, M.H; MURRY, J.D; PRINTZ, M.P. Repeated restraint stress-induced increase in baroreceptor reflex sensitivity: role of corticotropin-releasing factor. **Neuropeptides**, v.35, n.2, p.71-81, 2001.

CONWAY, J. Vascular reactivity in experimental hypertension measured after hexamethonium. **Circulation**, v.17, n.4, part 2, p. 807-810, 1958.

CORDELLINI, S; VASSILIEFF, V.S. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. **Gen Pharmacol**, v. 30, n.1, p. 79-83, 1998.

CRESTANI, C.C.; ALVES, F.H.; TAVARES, R.F. ; CORREA, F.M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress**, v.12, n.3, p.268-278. 2009.

CRESTANI, C.C.; TAVARES, R.F.; ALVES, F.H.; RESSTEL, L.B.; CORREA, F.M. Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. **Stress**, v.13, n.1, p.61-72, 2010a.

CRESTANI, C.C.; TAVARES, R.F.; GUIMARÃES, F.S.; CORREA, F.M.; JOCA, S.R., RESSTEL LB. Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. **Eur J Pharmacol.**, v.670, n.2-3, p.527-533, 2011.

CRUZ, F.C.; MARIN, M.T.; LEÃO, R.M; PLANETA, C.S. Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. **Int J Dev Neurosci.** , v.30, n.1, p.19-23, 2012.

CRUZ, F.C.; DELUCIA, R. e PLANETA, C.S. Differential behavioral and neuroendocrine effects of repeated nicotine in adolescent and adult rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v.80, n.3, p.411-417, 2005.

DAMPNEY, R. A., HORIUCHI, J., MCDOWALL, L. M. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. **Auton Neurosci** , v.142, p.3-10, 2008.

DAHL R.E. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. **Ann N Y Acad Sci. Jun**; v.1021, p.1-22, 2004.

DAUBERT DL, MCCOWAN M, ERDOS B, SCHEUER DA. Nucleus of the solitary tract catecholaminergic neurons modulate the cardiovascular response to psychological stress in rats. **J Physiol**, v. 95, p.590-4881, 2012.

D'AUDIFFRET, A.C; FRISBEE, S.J, STAPLETON, P.A, GOODWILL, A.G, ISINGRINI, E.; FRISBEE, JC. Depressive behavior and vascular dysfunction: a link between clinical depression and vascular disease? **J Appl Physiol**, v. 108, n.5, p.1041-1051, 2010.

DOREMUS-FITZWATER, T.L; VARLINSKAYA, E.I; SPEAR, L.P. Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. **Physiol Behav.** v.97, n.3-4, p. 484-494, 2009.

DYER, A.R; PERSKY, V.; STAMLER, J., PAULO, O.; SHEKELLE, R.B; BERKSON, D.M; LEPPER, M; SCHOENBERGER, J.A; LINDBERG, H.A. Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies. **Am J Epidemiol**, v. 112, p. 736-749, 1980.

EILAND, L., ROMEO, R.D. Stress and the developing adolescent brain. **Neuroscience**, v. 249, p.62-171, 2013.

ENGI, A.S., CRUZ, F.C., LEÃO, R.M., CORRÊA, F.M., PLANETA, C.S., CRESTANI, C.C. Effect of the single or combined administration of cocaine and testosterone on cardiovascular function and baroreflex activity in unanesthetized rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v.59, n.3, p.231-40, 2012.

FARRELL, T.G.; PAUL, V.; CRIPPS, T.R.; MALIK, M.; BENNETT, E.D.; WARD, D. ; CAMM, A.J. Baroreflex sensitivity and electrophysiological correlates in patients after acute myocardial infarction. **Circulation**, v.83, n.3, p.945-952, 1991.

FLAK JN, JANKORD R, SOLOMON MB, KRAUSE EG, HERMAN JP. Opposing effects of chronic stress and weight restriction on cardiovascular, neuroendocrine and metabolic function. **Physiol Behav.**, v. 34, p.104-228, 2011.

FORD, D.E; MEAD, L.A; CHANG, P.P; COOPER-PATRICK, L.; WANG NY, KLAG, M.J. Depression is a risk factor for coronary artery disease in men: the precursors study. **Arch Intern Med.**, v.158, n.13, p.1422-1426, 1998.

FURAY, A.R; BRUESTLE, A.E; HERMAN, J.P. The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress. **Endocrinology** , v.149, n.11, p.5482-5490, 2008.

GADEK-MICHALSKA, A; BUGAJSKI, J. Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress. **J Physiol Pharmacol** , v.54, n.3, p.449-459, 2003.

GRASSI, G., TREVANO, F.Q; SERAVALLE, G; SCOPELLITI, F; MANCIA G. Baroreflex function in hypertension: consequences for antihypertensive therapy. **Prog. Cardiovasc. Dis**, v. 48, p.407-415, 2006.

GRASSI, G. Sympathetic and baroreflex function in hypertension: implications for current and new drugs. **Curr Pharm Des** , v.10, n.29, p.3579-389, 2004.

GRIPPO, A.J; BELTZ, T.G; JOHNSON, A.K. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. **Physiol Behav** , v.78, n.4-5, p.703-710, 2004.

GRIPPO, A.J; MOFFITT, J.A; JOHNSON, A.K. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.282, n.5, R1333-1341, 2002.

GRIPPO, A.J; MOFFITT JA, JOHNSON, A.K. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. **Psychosom Med**., v.70, n.4, p.435-443, 2008.

HAINES, A.P; IMESON, J.D; MEADE, T.W. Phobic anxiety and ischemic heart disease. **Br Med J Clin Res**., v. 295, n.6593, p.297-299, 1987.

HARRISON, D.G.; FREIMAN, P.C.; ARMSTRONG, M.L.; MARCUS, M.L. ; HEISTAD, D.D. Alterations of vascular reactivity in atherosclerosis. **Circ Res**, v.61, n.5, pt 2, p.1174-1180, 1987.

HAUGER, R.L. CRF receptor regulation and sensitization of ACTH responses to acute ether stress during chronic intermittent immobilization stress. **Brain Research**, v.532, p. 34-40, 1990.

HERMAN, J.P.; FIGUEIREDO, H.; MUELLER, N.K; ULRICH-LAI, Y., OSTRANDER MM, CHOI DC, CULLINAN WE. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. **Front Neuroendocrinol.** , v.24, n.3, p.151-180, 2003.

HERMAN, J.P. Neural control of chronic stress adaptation. **Front Behav Neurosci.** v.8, n.7, p.61, 2013.

HONZIKOVA N., FISER B Baroreflex sensitivity and essential hypertension in adolescents. **Physiol Res**, v. 58, n. 5, p. 605-612, 2009.

ISGOR C., KABBAJ M., AKIL H., WATSON S.J. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. **Hippocampus**, v.14, p.636-648, 2004.

ISINGRINI, E; BELZUNG, C; FRESLON, J.L., MACHET, M.C; CAMUS, V. Fluoxetine effect on aortic nitric oxide-dependent vasorelaxation in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice. **Psychosom Med** , v.74, n.1, p.63-72, 2012.

ISINGRINI, E.; SURGET, A.; BELZUNG, C.; FRESLON, J.L.; FRISBEE, J.; O'DONNELL J.; CAMUS V. D'AUDIFFRET A. Altered aortic vascular reactivity in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice: UCMS causes relaxation impairment to ACh. **Physiol Behav**, v. 103, n.5, p. 540-546, 2011.

IRIGOYEN, M.C.; KRIEGER, E.M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Braz J Med Biol Res**, v.31, n.9, p.1213-1220, 1998.

JANKORD, R; HERMAN, J.P. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. **Ann N Y Acad Sci.**, v.1148, p.64-73, 2008.

JANKORD, R; SOLOMON, M.B; ALBERTZ, J; FLAK, J.N, ZHANG, R, HERMAN, J.P. Stress vulnerability during adolescent development in rats. **Endocrinology.** v.152, n. 2, p.629-638, 2011.

JOËLS, M; BARAM, T.Z. The neuro-symphony of stress. Nature review **Neuroscience**, v.10, n.6, p.459-466, 2009.

KARATSOREOS, I.N, McEWEN, B.S. Psychobiological allostasis: resistance, resilience and vulnerability. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 15, p.12, 2011.

KAWACHI I, SPARROW D, VOKONAS PS, WEISS ST. Symptoms of anxiety and risk of coronary heart disease. The Normative Aging Study. **Circulation.**, v.90, n.5, p.2225-2229, 1994.

KNOX, S.S; UVNÄS-MOBERG, K. Social isolation and cardiovascular disease: an atherosclerotic pathway? **Psychoneuroendocrinology**, v.23, n.8, p.877-890, 1998.

KRÜGEL, U; FISCHER, J; RADICKE, S; SACK, U; HIMMERICH, H. Antidepressant effects of TNF- α blockade in an animal model of depression. **J Psychiatr Res.**, v.47, n.5, p.611-616, 2013.

LACHUER J, DELTON I, BUDA M, TAPPAZ M. The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronic daily restraint stress is stress specific like that of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Brain Res.**, v.28, v. 638, n.1-2, p.196-202, 1994.

LAVIOLA G, ADRIANI W, TERRANOVA ML, GERRA G. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.23, n.7, p.993-1010, 1999.

LAURENT S, JUILLERAT L, LONDON G, NUSSBERGER J, BRUNNER H, SAFAR M. Hyperreactivity of the humeral artery to noradrenaline in essential hypertension patients. **Arch Mal Coeur Vaiss**, v. 80, n.6, p. 826-831, 1987.

MAGARINOS AM; McEWEN BS. Stress-induced hippocampal atrophy of apical dendrites of ca3c neurons: Comparison of stressors. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 83-88, 1995.

MARIN MT, CRUZ FC, PLANETA CS. Chronic or variable stresses differently affect the behavioral, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiology & Behavior**, v.90, p.29-35, 2007.

MARTÍ, O.; MARTÍ, J.; ARMARIO, A. Effects of chronic on food intake in rats: Influence of stressor intensity and duration of daily exposure. **Physiology & Behavior**, v.55, n.4, p.747-753, 1994.

MASLOVA, L.N; BULYGINA, V.V; MARKEL, A.L. Chronic stress during prepubertal development: immediate and long-lasting effects on arterial blood pressure and anxiety-related behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v.27, n.5, p.549-61, 2002.

MASLOVA, L.N; BULYGINA, V.V, POPOVA, N.K. Immediate and long-lasting effects of chronic stress in the prepubertal age on the startle reflex. **Physiol Behav.**, v.75, n.1-2, p.217-25, 2002b.

MASLOVA, L.N; BULYGINA, V.V; AMSTISLAVSKAYA, T.G. Prolonged social isolation and social instability in adolescence in rats: immediate and long-term physiological and behavioral effects. **Neurosci Behav Physiol.**, v.40, n.9, p.955-963, 2010.

MCCORMICK, C.M; MATHEWS, I.Z; THOMAS, C; WATERS, P. Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. **Brain Cogn.**, v.72, n.1, p. 73-85, 2010.

MCCORMICK CM, GREEN MR. From the stressed adolescent to the anxious and depressed adult: investigations in rodent models. **Neuroscience.**, v.249, p.242-257, 2013.

MCDOUGALL, S.J.; LAWRENCE, A.J. e WIDDOP, R.E. Differential cardiovascular responses to stressors in hypertensive and normotensive rats. *Exp Physiol*, v.90, n.1, p.141-150, 2005.

MCDOUGALL, S.J.; PAULL, J.R.; WIDDOP, R.E.; LAWRENCE, A.J. restrain stress: differential cardiovascular responses in wistar-kioto and spontaneously hypertensive rats. **Hipertension.** , v.35 p.126-129, 2000.

MCEWAN, B.S. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. **Dialouges Clin. Neurosci.**, v. 8, p.367-381, 2006.

NATELSON, B.H; OTTENWELLER, J.E; COOK, J.A; PITMAN, D.; MCCARTY, R; TAPP, W.N. Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. **Physiology & Behavior**, v. 43, p. 41-46, 1988.

NEGRAO, C.E; MOREIRA, E.D; SANTOS, M.C; FARAH, V.M; KRIEGER, E.M. Vagal function impairment after exercise training. **J Appl Physiol.**, v.72, n.5, p.1749-1753, 1992.

ORTIZ, J; FITZGERALD, L.W; LANE, S; TERWILLIGER, R; NESTLER, E.J. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. *Neuropsychopharmacology.*, v.14, n.6, p.443-452, 1996.

PALATINI, P; JULIUS, S. Association of tachycardia with morbidity and mortality: pathophysiological considerations. **J Hum Hypertens.** supl 1, S19-27, 1997.

PICKERING, T.G. Does psychological stress contribute to the development of hypertension and coronary heart disease? **Eur J Clin Pharmacol.**, v.39, supl1, S1-7, 1990.

PIJLMAN, F.T.A, WOLTERINK, G.; VAN REE, J.M. Physical and emotional stress have differential effects on preference for saccharine and open field behaviour in rats. **Behav Brain Res**, v.139, p.131-138, 2003.

PORTER, J.P; PHILLIPS, A; RICH, J; WRIGHT, D. Effect of chronic stress on the cardiac baroreflex in the post-weanling rat. **Life Sci.**, v.75, n. 13, p.595-1607, 2004.

RESSTEL, L.B.; TIRAPELLI, C.R.; LANCHOTE, V.L.; UYEMURA, S.A.; DE OLIVEIRA, A.M.; CORREA, F.M. Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. **Life Sci**, v.78, n.19, p.2179-2187, 2006.

RISTUCCIA, R.C; SPEAR, L.P. Autonomic responses to ethanol in adolescent and adult rats: a dose-response analysis. **Alcohol**, v.42, n.8, p.623-629, 2008.

ROMEO, R.D; LEE, S.J; CHHUA, N.; MCPHERSON, C.R; MCEWEN, B.S. Testosterone cannot activate an adult-like stress response in prepubertal male rats, **Neuroendocrinology**, v. 79, p.125-132, 2004.

ROMEO, R.D. Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. **Front Neuroendocrinol**, v.31, n.2, p.232-240, 2010.

ROZANSKI, A; BLUMENTHAL, J.A; KAPLAN, J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. **Circulation.**, v.99, n.16, p.2192-217, 1999.

SANCHES, I.C; SARTORI, M.; JORGE, L; IRIGOYEN, M.C; ANGELIS, K. Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n.10, p. 942-948, 2009.

SHEN, S; INGENITO, A.J. Depressor effect of kappa opioid agonist on hypertension induced by isolation in the rat. **Clin. Exp. Hypertens.**, v.21, n.3, p.275-297, 1999.

SOUZA, H.C, BALLEJO, G, SALGADO, M.C, Da SILVA ,V.J, SALGADO H.C. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 280, H844-H850, 2001.

SPEAR, L.P; BRAKE, S.C. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. **Dev Psychobiol.**, v. 16, n.2, p.83-109, 1983.

SPEAR, L.P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 24, n.4, p.417-463, 2000.

STONE, E.A; QUARTERMAIN, D. Greater behavioral effects of stress in immature as compared to mature male mice. **Physiol Behav.**, v.63, n.1, p.143-145, 1997.

TAKASE, B.; KURITA, A.; NORITAKE, M.; UEHATA, A.; MARUYAMA, T.; NAGAYOSHI, H.; NISHIOKA, T.; MIZUNO, K. e NAKAMURA, H. Heart rate variability in patients with diabetes mellitus, ischemic heart disease, and congestive heart failure. **J Electrocardiol.** v.25, n.2, p.79-88, 1992.

TANG, E.H; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? **Pflugers Arch**, v. 459, n.6, p. 995-1004, 2010.

TIRELLI, E.; LAVIOLA, G.; ADRIANI, W. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.27, p.163-178, 2003.

ULRICH-LAI, Y.M.; HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, v.10, p.397-409, 2009.

ULRICH-LAI, Y.M; OSTRANDER, M.M; THOMAS, I.M; PACKARD, B.A, FURAY, A.R; DOLGAS, C.M; VAN HOOREN, D.C; FIGUEIREDO, H.F, MUELLER, N.K; CHOI, D.C, HERMAN, J.P. Daily limited access to sweetened drink attenuates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis stress responses. **Endocrinology**, v.148, n.4, p.1823-1834, 2007.

ULRICH-LAI, Y.M, FIGUEIREDO, H.F, OSTRANDER, M.M, CHOI, D.C, ENGELAND, W.C, HERMAN, J.P. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**,v.291, n.5 E965-73, 2006.

VÁZQUEZ DM, AKIL H. Pituitary-adrenal response to ether vapor in the weanling animal: characterization of the inhibitory effect of glucocorticoids on adrenocorticotropin secretion. **Pediatr Res.**, v.34, n.5, p.646-653, 1993.

WEINTRAUB, A.; SINGARAVELU, J.; BHATNAGAR, S. Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity. **Brain Res.**, p. 83-92, 2010.

WILLNER, P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology (Berl)**, v.134, n.4, p.319-329, 1997.

ZUCCHI, F.C, KIRKLAND, S.W, JADAVJI, N.M, VAN WAES, L.T; KLEIN, A; SUPINA, R.D; METZ, G.A. Predictable stress versus unpredictable stress: a comparison in a rodent model of stroke. **Behav Brain Res.**, v.205, n.1, p.67-75, 2009.



Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardiovascular function: Comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens

Josiane O. Duarte^{a,b}, Cleopatra S. Planeta^{a,b}, Carlos C. Crestani^{a,b,*}

^a Laboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Univ. Estadual Paulista-UNESP, Araraquara, SP, Brazil

^b Joint UFSCar-UNESP Graduate Program in Physiological Sciences, São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 August 2014

Received in revised form

10 November 2014

Accepted 11 November 2014

Available online 20 November 2014

Keywords:

Unpredictable stress

Chronic variable stress

Restraint stress

Autonomic

Baroreflex

Ontogeny

ABSTRACT

Adolescence has been proposed as an ontogenic period of vulnerability to stress. Nevertheless, the impact of stressful events during adolescence in cardiovascular activity is poorly understood. Therefore, the purpose of this study was to investigate the immediate and long-lasting effects of exposure to stressful events during adolescence in cardiovascular function of rats. To this end, we compared the impact of 10-days exposure to two chronic stress protocols: the repeated restraint stress (RRS, homotypic) and chronic variable stress (CVS, heterotypic). Independent groups of animals were tested 24 h (immediate) or three weeks (long-lasting) following completion of stress period. Exposure to CVS, but not RRS, during adolescence increased basal HR values without affecting arterial pressure, which was followed by augmented power of oscillatory component at low frequency (sympathetic-related) of the pulse interval (PI). RRS enhanced variance of the PI with an increase in the power of both low and high (parasympathetic-related) frequency components. RRS also increased the baroreflex gain. Neither RRS nor CVS affected systolic arterial pressure variability. The RRS-evoked changes in PI variability were long-lasting and persisted into adulthood while all alterations evoked by the CVS were reversed in adulthood. These findings indicate a stress type-specific influence in immediate and long-term effects of stress during adolescence in cardiovascular function. While immediate changes in cardiovascular function were mainly observed following CVS, long-lasting autonomic consequences in adulthood were observed only in animals exposed to RRS during adolescence.

© 2014 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Several lines of evidence correlate psychosocial factors with the pathogenesis of cardiovascular diseases (Rozanski et al., 1999; Steptoe and Kivimaki, 2012). For instance, clinical and preclinical studies have shown a role of factors such as environmental and social stress, anxiety and mood states, and personality traits (e.g., anger and aggressiveness) in etiology and progression of several

Abbreviations: CVS, chronic variable stress; DAP, diastolic arterial pressure; HF, variability at high frequency; HR, heart rate; LF, variability at low frequency; MAP, mean arterial pressure; PI, pulse interval; RRS, repeated restraint stress; SAP, systolic arterial pressure.

* Corresponding author at: São Paulo State University—UNESP, Department of Natural Active Principles and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Rodovia Araraquara-Jaú Km 01, (Campus Universitário), Caixa Postal 502, Araraquara 14801-902, SP, Brazil. Tel.: +55 16 3301 6982; fax: +55 16 3301 6980.

E-mail addresses: ccrestani@yahoo.com.br, crestani@fcfar.unesp.br (C.C. Crestani).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.11.004>

0736-5748/© 2014 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

cardiovascular dysfunctions (Ford et al., 1998; Grippo and Johnson, 2009; Kawachi et al., 1994; Pickering, 1990; Rozanski et al., 2005; Sgoifo et al., 2014). Although the relevance of the topic, the mechanisms and factors explaining the association between psychosocial factors and cardiovascular diseases are still poorly understood.

Adolescence is a period of continuous development of the neural circuits involved in the stress responses (Andersen, 2003; Casey et al., 2008), which can affect how adolescents cope with stress. Indeed, studies in rodents have shown that somatic, behavioral, and neuroendocrine changes induced by chronic exposure to stress are more pronounced in adolescent than adult animals (Doremus-Fitzwater et al., 2009; Jankord et al., 2011; Stone and Quartermain, 1997). Thus, adolescence is proposed to be an ontogenic period of higher vulnerability to stress (Andersen and Teicher, 2008; Dahl, 2004). Nevertheless, the impact of stressful events during adolescence in cardiovascular activity is poorly understood (Maslova et al., 2002; Porter et al., 2004). Furthermore, despite evidence that stress during adolescence evokes long-lasting behavioral changes and neuroplasticity (Buwalda et al., 2011), the cardiovascular

consequences in adulthood of emotional stress exposure during adolescence are still unknown.

Characteristics of the aversive stimulus (e.g., chronicity, predictability, and severity) may also influence the impact of stress on physiological functions. Preclinical studies have compared the impact of chronic stress protocols involving daily exposure to the same stressor (i.e., homotypic) or different stressors (i.e., heterotypic) (Flak et al., 2012; Kopp et al., 2013; Magarinos and McEwen, 1995). The chronic variable stress (CVS) is a heterotypic stressor widely used to investigate physiological, behavioral and neural consequences of the exposure to stress in rodents (Grippe, 2009; Herman, 2013; Willner, 2005). It has been demonstrated that CVS, relative to RRS, causes a more severe impact in terms of somatic parameters (e.g., adrenal hypertrophy and thymic involution) and neuroendocrine function (Flak et al., 2012; Kopp et al., 2013; Magarinos and McEwen, 1995; Marin et al., 2007). Also, neuroplasticity and behavioral changes induced by chronic stress seems to be related to the stress regimen (Flak et al., 2012; Kopp et al., 2013; Marin et al., 2007). Cardiovascular changes, autonomic unbalance, and alterations in reflex cardiac and sympathetic nerve activity responses to blood pressure changes (i.e., baroreflex activity) have also been reported following exposure to either CVS or homotypic stressors (Conti et al., 2001; Daubert et al., 2012; Grippe et al., 2008). However, so far, no study compared the impact of homotypic vs heterotypic chronic stress regimens in cardiovascular function.

Altogether, above evidence indicate the adolescence as a period of vulnerability to stress. However, the impact of stressful events during adolescence in cardiovascular activity, including evaluation of possible differences among stress paradigms, has never been investigated. Therefore, our purpose in the present study was to investigate the immediate and long-lasting cardiovascular consequences of the exposure to homotypic and heterotypic chronic stress regimens during adolescence.

2. Material and methods

2.1. Animals

Adolescence has been defined in rodents as the ontogenic period from postnatal day 28 to 42 (Spear, 2000), although some authors have extended this period until the postnatal day 59 (Eiland and Romeo, 2013; Tirelli et al., 2003). During this developmental period, the animals present adolescent-typical neurobehavioral characteristics (McCormick et al., 2010; Spear, 2000). Therefore, 28-days-old male Wistar rats were used in the present study for all experiments. Animals were obtained from the animal breeding facility of the Univ. Estadual Paulista—UNESP (Botucatu, SP, Brazil) and were housed in collective plastic cages (3–4 rats/cage) in a temperature-controlled room at 24 °C in the Animal Facility of the Laboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Univ. Estadual Paulista—UNESP. They were kept under a 12:12 h light–dark cycle (lights on between 7:00 a.m. and 7:00 p.m.) with free access to water and standard laboratory food. Housing conditions and experimental procedures were carried out following protocols approved by Ethical Committee for Use of Animal of the School of Pharmaceutical Sciences/UNESP, which complies with the Brazilian and international guidelines for animal use and welfare.

2.2. Chronic stress regimens

The chronic stress regimens were based in protocols previously described by our group (Cruz et al., 2012; Marin et al., 2007). Therefore, repeated restraint stress (RRS) was chosen as a homotypic stressor while CVS was used as a heterotypic stress regimen. The animals of RRS group were restrained in opaque plastic cylinders

for 1 h daily starting at 9:00 a.m. for 10 consecutive days. The CVS protocol consisted of exposure twice-daily to randomly assigned stressors for 10 consecutive days, according to protocol previously described (Cruz et al., 2012; Marin et al., 2007). The stressors were forced swim (3–4 min), restraint stress (60 min), lights on overnight, lights off during the light period of the light/dark cycle (2–3 h), humid sawdust (overnight or all day), cold stress, food and water deprivation overnight, and social isolation overnight. All the stress sessions were performed in an adjacent room to the animal facility. The RRS and CVS started simultaneously, and during this period animals of the control groups were left undisturbed, except for cleaning the cages, in the animal facility.

2.3. Surgical preparation

Animals were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg, i.p.) and a catheter (a 4 cm segment of PE-10 heat-bound to a 13 cm segment of PE-50) (Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery for cardiovascular recording. Catheter was tunneled under the skin and exteriorized on the animal's dorsum. After the surgery, rats were treated with a poly-antibiotic formulation (0.27 mg/kg, i.m.; Pentabiotico[®]; Fort-Dodge, Brazil) to prevent infection, and received the non-steroidal anti-inflammatory drug flunixin meglumine (0.025 mg/kg, i.m.; Banamine[®], Schering-Plough, Brazil) for postoperative analgesia.

2.4. Measurement of cardiovascular parameters

Animals were allowed 60 min to adapt to experimental room conditions, such as sound and illumination, before starting cardiovascular recording. The experimental room was temperature controlled (24 °C) and was acoustically isolated from the other rooms. For the recording, the arterial cannula was connected to a pressure transducer (DPT100, Utah Medical Products Inc., Midvale, UT, USA). Pulsatile arterial pressure was recorded using an amplifier (Quad Bridge Amp, ML224, ADInstruments, NSW, Australia) and an acquisition board (PowerLab 4/30, ML866/P, ADInstruments, NSW, Australia) connected to a personal computer. Mean arterial pressure (MAP), systolic arterial pressure (SAP), diastolic arterial pressure (DAP), and heart rate (HR) values were derived from pulsatile arterial pressure recordings.

2.5. Power spectral analysis of systolic arterial pressure and pulse interval

Power spectral analysis of SAP and pulse interval (PI) was employed to analyze autonomic activity controlling blood vessels and the heart, respectively. For this, beat-to-beat time series of SAP and PI were extracted from the pulsatile arterial pressure signal. Using fast Fourier transform spectral analysis (Software Cardioseries v2.4, available on <https://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>), the overall variability of these series was calculated in the time and frequency domain. The time domain analysis consisted of calculating the variance in the entire time series. For frequency domain analysis, the power of oscillatory components obtained was quantified in two frequency bands: low frequency (LF, 0.20–0.75 Hz) and high frequency (HF, 0.75–3.0 Hz) (Malliani et al., 1991). Oscillations lower than 0.20 Hz were not quantified.

Oscillations of arterial pressure and PI at LF range are representative of the modulatory effects of sympathetic activity controlling vascular tonus and heart activity, respectively; whereas oscillations of PI at HF range are associated with a parasympathetic modulation of the heart (Malliani et al., 1991).

2.6. Assessment of spontaneous baroreflex sensitivity

The sequence method was used to analysis the spontaneous baroreflex sensitivity. This technique is used to evaluation of the baroreflex function over the physiological range of fluctuations in arterial pressure, without any pharmacological manipulations (Bertinieri et al., 1985). For this, using the software Cardioseries v2.4 (<https://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>), beat-to-beat values of SAP and PI were analyzed for identification of sequences in which SAP increases were associated with PI lengthening (up sequence) or SAP decreases were associated with PI shortening (down sequence). A baroreflex sequence was only used when the correlation coefficient (r) between SAP and PI was greater than 0.8. The spontaneous baroreflex sensitivity was assessed by the slope (ms/mmHg) of the linear regression between SAP and PI.

2.7. Experimental procedures

Adolescent animals (28-days-old) were randomly divided into six groups: (i) control adolescent ($n=6$), (ii) RRS adolescent ($n=7$), (iii) CVS adolescent ($n=7$), (iv) control adult ($n=6$), (v) RRS adult ($n=6$), and (vi) CVS adult ($n=6$). All animals of RRS and CVS groups were submitted to daily sessions of stress from postnatal day 28 to 37. In order to evaluate the immediate effects of exposure to stressful events during adolescence, animals of adolescent groups (groups i–iii) were subjected to surgical preparation at 10th day of stress protocols, after the last session of stress, and cardiovascular recording was performed 24 h later on postnatal day 38 (i.e., 11th day after onset of chronic stress protocols).

To investigate the consequences in adulthood of chronic stress exposure during adolescence (long-lasting effects), animals of adult groups (groups iv–vi) were kept in rest for three weeks after completion of stress protocols. On postnatal day 58, animals were subjected to surgical preparation, and cardiovascular recording was realized 24 h later (i.e., postnatal day 59). A schematic representation of the complete protocol for the investigation of immediate and long-lasting cardiovascular consequences of stress exposure during adolescence is presented in Fig. 1.

2.8. Data analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. Results were analyzed using two-way ANOVA, with stress (control, RRS or CVS) and age (adolescent vs adult) as independent factors. The Bonferroni's *post hoc* test was used for identification of differences between the groups. Results of statistical tests with $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Immediate and long-term effects of exposure to homotypic or heterotypic stress regimens during adolescence on basal levels of arterial pressure and heart rate

Analysis of both MAP, DAP, and SAP baseline did not indicate significant effect of either stress (MAP: $F_{(2,32)} = 1$, $P > 0.05$; DAP: $F_{(2,32)} = 0.1$, $P > 0.05$; SAP: $F_{(2,32)} = 3$, $P > 0.05$) or age (MAP: $F_{(1,32)} = 1$, $P > 0.05$; DAP: $F_{(1,32)} = 2$, $P > 0.05$; SAP: $F_{(1,32)} = 0.2$, $P > 0.05$) (Fig. 2). However, analysis of HR baseline indicated significant effect of both stress ($F_{(2,32)} = 5$, $P < 0.02$) and age ($F_{(2,32)} = 66$, $P < 0.0001$), but without a stress \times age interaction ($F_{(2,32)} = 1$, $P > 0.05$). *Post-hoc* analysis revealed that adult animals in all experimental groups presented reduced values of HR when compared with the respective adolescent groups ($P < 0.05$) (Fig. 2). Furthermore, exposure to CVS during

adolescence increased basal HR ($P < 0.05$), but this effect was abolished into adulthood ($P > 0.05$) (Fig. 2).

3.2. Immediate and long-term effects of exposure to homotypic or heterotypic stress regimens during adolescence in power spectral analysis of systolic arterial pressure and pulse interval

3.2.1. Pulse interval

Analysis of variance of the PI indicated significant effect of stress ($F_{(2,32)} = 6$, $P < 0.01$) and age ($F_{(1,32)} = 11$, $P < 0.003$), as well as a stress \times age interaction ($F_{(2,32)} = 6$, $P < 0.01$). Comparisons of oscillations at LF range indicated significant effect of stress (variance: $F_{(2,32)} = 9$, $P < 0.001$; LF: $F_{(2,32)} = 8$, $P < 0.001$), but without influence of age (variance: $F_{(1,32)} = 1$, $P > 0.05$; LF: $F_{(1,32)} = 0.1$, $P > 0.05$) and stress \times age interaction (variance: $F_{(2,32)} = 0.1$, $P > 0.05$; LF: $F_{(2,32)} = 0.2$, $P > 0.05$) (Fig. 3). Analysis of oscillations at HF range and LF/HF ratio (an index of sympathetic/parasympathetic balance to the heart) indicated effect of both stress (HF: $F_{(2,32)} = 8$, $P < 0.002$; LF/HF: $F_{(2,32)} = 6$, $P < 0.009$) and age (HF: $F_{(2,32)} = 11$, $P < 0.002$; LF/HF: $F_{(2,32)} = 5$, $P < 0.03$), but without a stress \times age interaction (HF: $F_{(2,32)} = 0.3$, $P > 0.05$; LF/HF: $F_{(2,32)} = 1$, $P > 0.05$) (Fig. 3).

Post hoc analysis revealed that adult animals in control group presented reduced oscillations at LF range when compared with the respective adolescent group ($P < 0.05$). Furthermore, RRS increased variance ($P < 0.01$) and LF/HF ratio ($P < 0.05$) of the PI in adolescent animals (Fig. 3). Also, oscillation at LF (adolescent: $P < 0.05$; adult: $P < 0.01$) and HF (adolescent: $P < 0.05$; adult: $P < 0.05$) range were enhanced by RRS in both adolescent ($P < 0.05$) and adult ($P < 0.01$) animals (Fig. 3). The CVS increased oscillation at LF range ($P < 0.05$) and LF/HF ratio ($P < 0.05$) in adolescent, but not in adult animals ($P > 0.05$) (Fig. 3).

3.2.2. Systolic arterial pressure

Analysis of variance and oscillations at LF and HF range of the SAP did not indicate significant effect of either stress (variance: $F_{(2,32)} = 3$, $P > 0.05$; LF: $F_{(2,32)} = 0.1$, $P > 0.05$; HF: $F_{(2,32)} = 2$, $P > 0.05$) or age (variance: $F_{(1,32)} = 0.2$, $P > 0.05$; LF: $F_{(1,32)} = 3$, $P > 0.05$; HF: $F_{(1,32)} = 4$, $P > 0.05$) (Fig. 4).

3.3. Immediate and long-term effects of exposure to homotypic or heterotypic stress regimens during adolescence in spontaneous baroreflex sensitivity

Baroreflex activity assessed by the sequence analysis technique indicated a stress \times age interaction ($F_{(2,32)} = 6$, $P < 0.005$) in the slope of up sequences, but without effect of either stress ($F_{(2,32)} = 1$, $P > 0.05$) or age ($F_{(1,32)} = 2$, $P > 0.05$) (Fig. 5). Analysis of the slope of down and all sequences (mean of up and down sequence slopes) did not indicate effect of either stress (down: $F_{(2,32)} = 0.3$, $P > 0.05$; all: $F_{(2,32)} = 0.1$, $P > 0.05$) or age (down: $F_{(1,32)} = 0.1$, $P > 0.05$; all: $F_{(1,32)} = 0.3$, $P > 0.05$) (Fig. 5). *Post hoc* analysis revealed that RRS increased the slope of up sequences in adolescent ($P < 0.05$), but not in adult animals ($P > 0.05$) (Fig. 5).

4. Discussion

The present study provides the first evidence of cardiovascular changes evoked by RRS and CVS in adolescent animals. The main findings of the present study are: (1) CVS, but not RRS, increased basal values of HR without affecting arterial pressure, and this effect was reversed in adulthood; (2) RRS during adolescence enhanced variance of the PI with an increase of both LF and HF component and LF/HF ratio. The effects in LF and HF components and LF/HF ratio were long-lasting and persisted into adulthood; (3) CVS increased LF component and LF/HF ratio of the PI during adolescence, but these effects were reversed into adulthood; (4) Neither RRS nor CVS

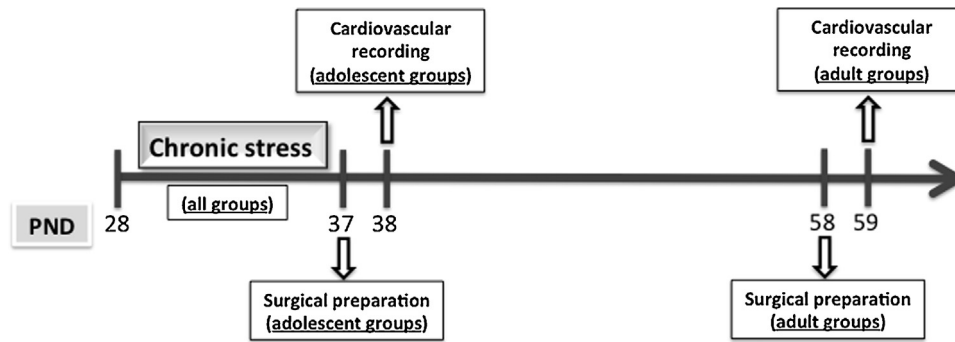


Fig. 1. Schematic representation of the protocol for the investigation of immediate and long-lasting cardiovascular consequences of stress exposure during adolescence. All animals of RRS and CVS groups were submitted to daily sessions of stress from postnatal day (PND) 28 to 37. Animals of adolescent groups (immediate effects of stress during adolescence) were subjected to surgical preparation on PND37, after the last session of stress, and cardiovascular recording was performed 24 h later on PND38. Animals of adult groups (long-lasting consequences of stress during adolescence) were kept in rest for three weeks after completion of stress protocols. On PND58 animals were subjected to surgical preparation, and cardiovascular recording was realized 24 h later on PND59.

affected analysis of SAP variability; (5) RRS increased the slope of up baroreflex sequence, but this effect was abolished in adulthood.

Regardless of stress experience, adolescent animals showed enhanced basal values of HR relative to adult, what is in line with previous studies indicating resting tachycardia in adolescent rodents relative to adults (Canese et al., 2009; Ristuccia and Spear, 2008). Ontogenic differences in HR were followed by augmented power of oscillatory component at LF range of the PI, thus providing the first evidence that resting tachycardia in adolescent relative to adult is mediated by a higher sympathetic tone to the heart. Tachycardia and increased cardiac sympathetic tone is proposed to be a risk factor for the emergence of several cardiovascular diseases (Dyer et al., 1980; Palatini and Julius, 1997). Thus, ontogenic differences in cardiovascular function may indicate a cardiovascular vulnerability during adolescence.

The absence of arterial pressure changes in adolescent animals exposed to either RRS or CVS is consistent with previous studies (Maslova et al., 2002; Porter et al., 2004). The finding that none of the chronic stress regimens affected SAP variability reinforces

this observation. However, the present findings provide the first evidence of CVS-evoked elevation of basal HR in adolescent animals. Resting tachycardia evoked by CVS was followed by augment of oscillatory component at LF range and LF/HF ratio of the PI, thus indicating an involvement of elevated sympathetic tone to the heart (Malliani et al., 1991). A sympathetic-mediated elevation of basal HR following exposure to CVS corroborates earlier reports in adult rodents (Grippeo et al., 2003, 2002).

Analysis of spontaneous baroreflex sensitivity indicated that RRS increased up baroreflex sequences. Impairment of baroreflex activity has been related to overactivity of the sympathetic tone and reduction of parasympathetic activity to the heart (Grassi et al., 2004). Thus, RRS-evoked increase in up baroreflex sequence is in line with previous evidence of enduring increase in cardiac parasympathetic activity following chronic stress exposure (Carnevali et al., 2011; Carnevali and Sgoifo, 2014). Nevertheless, RRS enhanced variance of PI with an increase in the power of the LF and HF component, thus indicating an increase in both sympathetic and parasympathetic activity to the heart (Malliani et al., 1991).

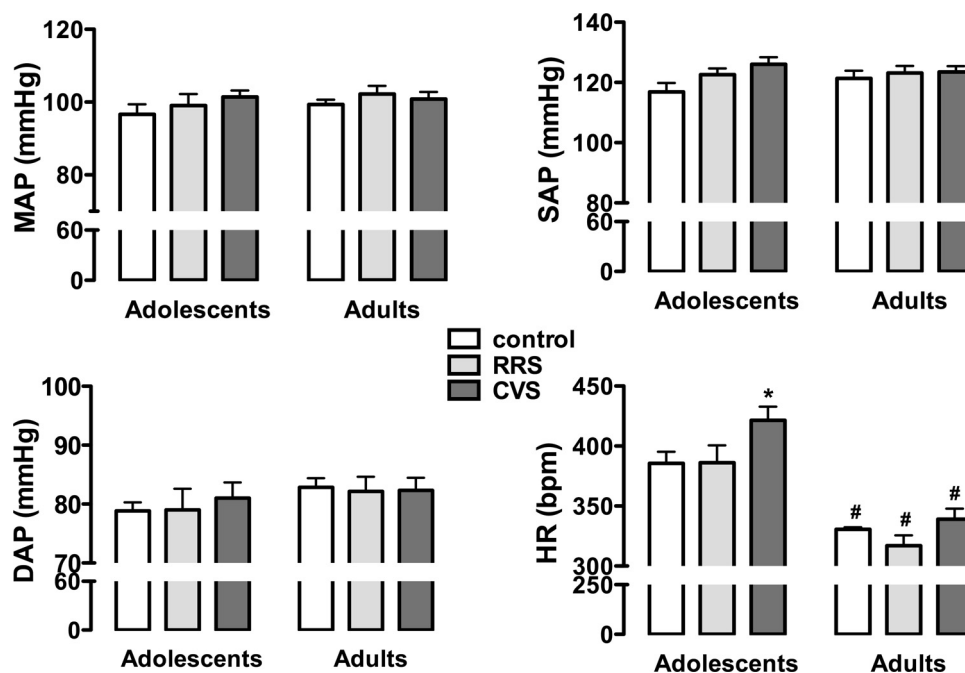


Fig. 2. Values of mean (MAP), systolic (SAP), and diastolic (DAP) arterial pressure; and heart rate (HR) in adolescent (immediate effects) and adult (long-lasting effects) animals subjected to RRS or CVS during adolescence. The bars represent the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs age-matched control, # $P < 0.05$ vs respective adolescent group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

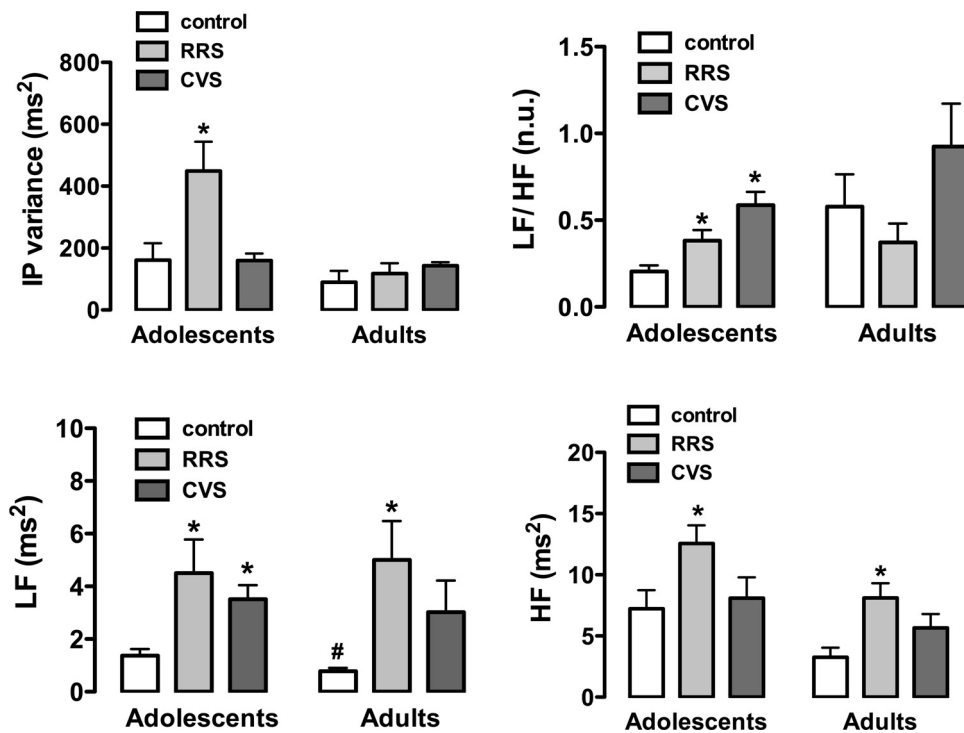


Fig. 3. Power spectral analysis of the pulse interval (PI) in adolescent (immediate effects) and adult (long-lasting effects) animals subjected to RRS or CVS during adolescence. Graphs present the variance (top left), LF/HF ratio (top right), and oscillation at LF (bottom left) and HF (bottom right) range. The bars represent the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs age-matched control, # $P < 0.05$ vs respective adolescent group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

Thus, RRS-induced change in baroreflex activity may be interpreted as an adaptation mechanism facilitating vagal activity, which buffer the sympathetic hyperactivity.

Results obtained in adult rodents have demonstrated that somatic (e.g., adrenal hypertrophy and thymic involution) and neuroendocrine changes (mainly in terms of hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity) are mainly observed following heterotypic stress regimens, whereas minimal effects are evoked by homotypic stressors (Flak et al., 2012; Kopp et al., 2013; Magarinos and McEwen, 1995). It has been proposed that these differences are, at least in part, due to the process of habituation upon repeated exposure to the same stressor (Herman, 2013). Previous results from our group obtained in adult rats, using the same protocols of CVS and RRS employed in the present study, demonstrated that adult rats exposed to CVS, but not RRS, showed higher basal levels of plasma corticosterone and reduced body weight gain (Marin et al., 2007). However, exposure to RRS did not change corticosterone response to acute restraint, suggesting the lack of habituation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response (Marin et al., 2007). Therefore, in addition to the process of habituation, particular characteristics of each chronic stress regimen may explain the specific responses following exposure to CVS and RRS. For example, distinct types of physical or psychological stressors, some of them for longer periods as compared to the homotypic regimen, are employed in the CVS (Kopp et al., 2013; Marin et al., 2007).

In contrast, results obtained in adolescent animals demonstrated that although thymic involution was selectively observed following CVS, basal levels of plasma corticosterone and the response of corticosterone to novelty or acute restraint stress were not altered by CVS or RRS, suggesting that differences in the impact of homotypic vs heterotypic stressors in somatic parameters and neuroendocrine function are age-dependent (Cruz et al., 2012). Indeed, enhanced corticosterone response to a novel stressor following CVS exposure is more pronounced in adult than adolescent rats (Jankord et al., 2011). Furthermore, contrary to the habituation

of neuroendocrine responses upon repeated exposure to the same stressor observed in adult animals (Herman, 2013), habituation of ACTH and corticosterone responses during repeated exposure to restraint stress is reduced in adolescents (Doremus-Fitzwater et al., 2009; Lui et al., 2012; Romeo et al., 2006). Taken together, these results suggest a vulnerability of adolescent to the neuroendocrine changes evoked by homotypic stressors as compared to heterotypic stress regimens.

Although differences in the impact of exposure to homotypic vs heterotypic stressors during adolescence in neuroendocrine function are well described, to the best of our knowledge, the present study provides the first evidence that these chronic stress regimens differently affect cardiovascular function in adolescent animals. We observed that immediate changes in cardiovascular function of adolescents were mainly observed following CVS. Nevertheless, our results also showed numerous RRS-evoked autonomic changes. Some of them appeared to be compensatory (e.g., baroreflex change and increased cardiac vagal activity buffered the elevation in sympathetic tone to the heart), thus avoiding the emergence of cardiovascular changes.

Previous results obtained in adult animals have reported that maximum cardiovascular changes observed during restraint stress are similar at the first and fifth (Daubert et al., 2012) or 10th session (McDougall et al., 2005, 2000), thus contrasting with the idea of habituation. Furthermore, as stated above, habituation of neuroendocrine responses during repeated exposure to restraint stress is blunted in adolescent rodents (Romeo et al., 2006) and we did not observe habituation of the corticosterone response upon exposure to our RRS protocol in either adolescent or adult animals (Cruz et al., 2012; Marin et al., 2007). Taken together, these evidence suggest that cardiovascular and autonomic adjustments do not seem to adapt upon repeated exposure to the same stressor. Thus, a better cope with homotypic stressors in terms of arterial pressure and HR changes during adolescence seems to be mediated by compensatory autonomic adjustments that avoid

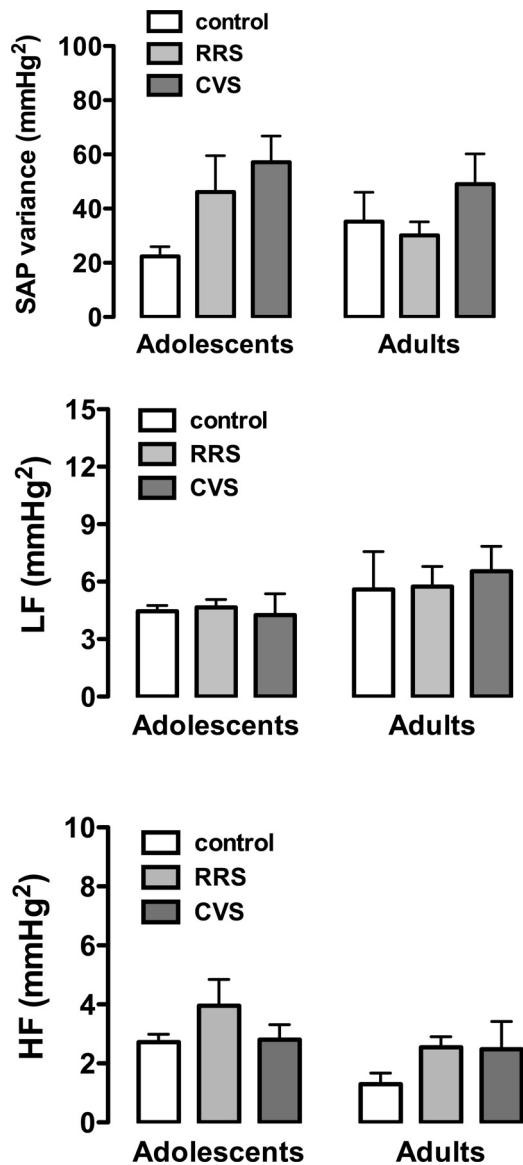


Fig. 4. Power spectral analysis of the systolic arterial pressure (SAP) in adolescent (immediate effects) and adult (long-lasting effects) animals subjected to RRS or CVS during adolescence. Graphs present the variance (top), and oscillation at LF (middle) and HF (bottom) range. The bars represent the mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

the development of cardiovascular changes. Nevertheless, these compensatory responses seem to fail following the exposure to CVS, thus leading to the emergence of cardiovascular changes.

Except for RRS-evoked changes in oscillatory component at LF and HF range of the PI, all alterations evoked by chronic stress during adolescence were reversed in adulthood. Therefore, the present findings provide evidence of a stress type-dependent influence in long-term impact of stressful events in autonomic activity during adolescence. However, it has been reported that exposure to either homotypic or heterotypic stress regimens during adolescence evokes long-lasting alterations in neuroendocrine activity, behavioral responses, and encephalic morphology/function that persist into adulthood (Ariza Traslavina et al., 2014; Buwalda et al., 2011; Isgor et al., 2004; Maslova et al., 2002; Pohl et al., 2007; Suo et al., 2013; Tsoory et al., 2007). Thus, the above-mentioned previous results taken together with the present findings suggest that stressful events during adolescence differently affect the enduring effect of stress on cardiovascular function relative

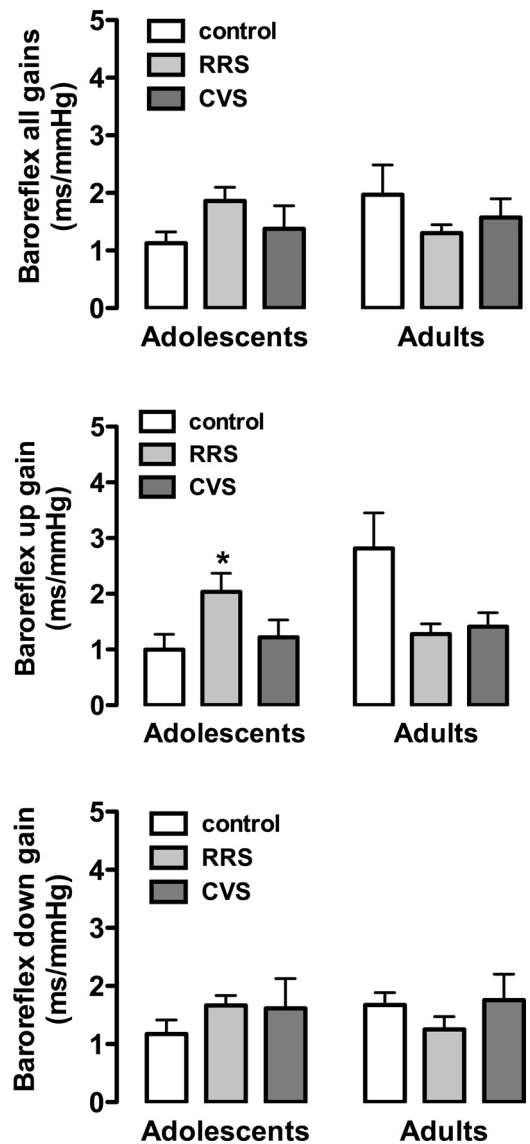


Fig. 5. Spontaneous baroreflex sensitivity determined by the sequence analysis technique in adolescent (immediate effects) and adult (long-lasting effects) animals subjected to RRS or CVS during adolescence. Graphs present the mean of all slopes (baroreflex all gains, mean of up and down sequence slopes) (top) and the slopes of up (baroreflex up gain, middle) and down (baroreflex down gain, bottom) sequences. The bars represent the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs age-matched control. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test.

to neuroendocrine activity, behavioral responses, and encephalic morphology/function in adulthood.

Both CVS and RRS evoke several morphological and functional changes in the brain. Evaluation of neurocircuits tonically recruited by CVS and RRS, assessed by Δ FosB staining (a documented marker of tonic neuronal activation), demonstrated that both chronic stress regimens tonically recruited a number of known cardiovascular-regulatory regions (Flak et al., 2012). However, while some regions were selectively recruited by CVS (e.g., nucleus of the solitary tract, posterior hypothalamic nucleus, and medial prefrontal cortex), other regions, such as the dorsomedial hypothalamic nucleus, increased tonic activity in response to both CVS and RRS (Flak et al., 2012). These results provide evidence that neurocircuits involved in cardiovascular changes to RRS may overlap with those related to CVS-evoked changes, whereas specific neurobiological mechanisms seem to be recruited by CVS. However, specific changes in the brain have also been described following RRS exposure. For

instance, dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons and increase in microglial density in the medial prefrontal cortex were more often evoked by RRS than CVS (Kopp et al., 2013; Vyas et al., 2002). However, some results have indicated similar dendritic remodeling in hippocampal neurons for both stressors (Magarinos and McEwen, 1995). Thus, further studies are necessary to clarify the neurobiological mechanisms involved in cardiovascular changes evoked by chronic stress.

In summary, our results provide evidence of a stress type-specific influence in immediate and long-term effects of the exposure to stress during adolescence in the cardiovascular function. Immediate cardiovascular changes were only observed following CVS exposure. Nevertheless, both chronic stress regimens affected autonomic activity. Present findings indicate that increase in cardiac sympathetic tone mediates CVS-evoked HR changes, whereas baroreflex change and increase in cardiac vagal activity caused by RRS seem to constitute important adaptive mechanisms that buffer the increased sympathetic tone to the heart. Finally, while CVS-evoked changes in HR and cardiac sympathetic activity were completely reversed in adulthood, long-lasting autonomic consequences of stress exposure during adolescence were only observed in animals exposed to the RRS.

Acknowledgments

The authors wish to thank Elisabete Z.P. Lepera and Rosana F.P. Silva for technical assistance. This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) grants no. 2012/14376-0 and 2012/50549-6; and PADC-FCF UNESP. CSP is a CNPq research fellow.

References

- Andersen, S.L., 2003. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 3–18.
- Andersen, S.L., Teicher, M.H., 2008. Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *Trends Neurosci.* 31, 183–191.
- Ariza Traslavina, G.A., de Oliveira, F.L., Franci, C.R., 2014. Early adolescent stress alters behavior and the HPA axis response in male and female adult rats: the relevance of the nature and duration of the stressor. *Physiol. Behav.* 133, 178–189.
- Bertinieri, G., di Rienzo, M., Cavallazzi, A., Ferrari, A.U., Pedotti, A., Mancina, G., 1985. A new approach to analysis of the arterial baroreflex. *J. Hypertens. Suppl.* 3, S79–S81.
- Buwalda, B., Geerdink, M., Vidal, J., Koolhaas, J.M., 2011. Social behavior and social stress in adolescence: a focus on animal models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 1713–1721.
- Canese, R., Adriani, W., Marco, E.M., De Pasquale, F., Lorenzini, P., De Luca, N., Fabi, F., Podo, F., Laviola, G., 2009. Peculiar response to methylphenidate in adolescent compared to adult rats: a pHMRI study. *Psychopharmacology (Berl)* 203, 143–153.
- Carnevali, L., Bondarenko, E., Sgoifo, A., Walker, F.R., Head, G.A., Lukoshkova, E.V., Day, T.A., Nalivaiko, E., 2011. Metyrapone and fluoxetine suppress enduring behavioral but not cardiac effects of subchronic stress in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, R1123–R1131.
- Carnevali, L., Sgoifo, A., 2014. Vagal modulation of resting heart rate in rats: the role of stress, psychosocial factors, and physical exercise. *Front Physiol.* 5, 118.
- Casey, B.J., Jones, R.M., Hare, T.A., 2008. The adolescent brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1124, 111–126.
- Conti, L.H., Shannon, M.H., Murry, J.D., Printz, M.P., 2001. Repeated restraint stress-induced increase in baroreceptor reflex sensitivity: role of corticotropin-releasing factor. *Neuropeptides* 35, 71–81.
- Cruz, F.C., Marin, M.T., Leao, R.M., Planeta, C.S., 2012. Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 30, 19–23.
- Dahl, R.E., 2004. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1021, 1–22.
- Daubert, D.L., McCowan, M., Erdos, B., Scheuer, D.A., 2012. Nucleus of the solitary tract catecholaminergic neurons modulate the cardiovascular response to psychological stress in rats. *J. Physiol.* 590, 4881–4895.
- Doremus-Fitzwater, T.L., Varlinskaya, E.I., Spear, L.P., 2009. Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Physiol. Behav.* 97, 484–494.
- Dyer, A.R., Persky, V., Stampler, J., Paul, O., Shekelle, R.B., Berkson, D.M., Lepper, M., Schoenberger, J.A., Lindberg, H.A., 1980. Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies. *Am. J. Epidemiol.* 112, 736–749.
- Eiland, L., Romeo, R.D., 2013. Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience* 249, 162–171.
- Flak, J.N., Solomon, M.B., Jankord, R., Krause, E.G., Herman, J.P., 2012. Identification of chronic stress-activated regions reveals a potential recruited circuit in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 36, 2547–2555.
- Ford, D.E., Mead, L.A., Chang, P.P., Cooper-Patrick, L., Wang, N.Y., Klag, M.J., 1998. Depression is a risk factor for coronary artery disease in men: the precursors study. *Arch. Intern. Med.* 158, 1422–1426.
- Grassi, G., Seravalle, G., Dell'Oro, R., Facchini, A., Ilardo, V., Mancina, G., 2004. Sympathetic and baroreflex function in hypertensive or heart failure patients with ventricular arrhythmias. *J. Hypertens.* 22, 1747–1753.
- Grippe, A.J., 2009. Mechanisms underlying altered mood and cardiovascular dysfunction: the value of neurobiological and behavioral research with animal models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 171–180.
- Grippe, A.J., Moffitt, J.A., Johnson, A.K., 2002. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282, R1333–R1341.
- Grippe, A.J., Beltz, T.G., Johnson, A.K., 2003. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiol. Behav.* 78, 703–710.
- 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, 1–21.
- Grippe, A.J., Moffitt, J.A., Johnson, A.K., 2008. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. *Psychosom. Med.* 70, 435–443.
- Herman, J.P., 2013. Neural control of chronic stress adaptation. *Front Behav. Neurosci.* 7, 61.
- Isgor, C., Kabbaj, M., Akil, H., Watson, S.J., 2004. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus* 14, 636–648.
- Jankord, R., Solomon, M.B., Albertz, J., Flak, J.N., Zhang, R., Herman, J.P., 2011. Stress vulnerability during adolescent development in rats. *Endocrinology* 152, 629–638.
- Kawachi, I., Sparrow, D., Vokonas, P.S., Weiss, S.T., 1994. Symptoms of anxiety and risk of coronary heart disease. The Normative Aging Study. *Circulation* 90, 2225–2229.
- Kopp, B.L., Wick, D., Herman, J.P., 2013. Differential effects of homotypic vs. heterotypic chronic stress regimens on microglial activation in the prefrontal cortex. *Physiol. Behav.* 122, 246–252.
- Lui, P., Padow, V.A., Franco, D., Hall, B.S., Park, B., Klein, Z.A., Romeo, R.D., 2012. Divergent stress-induced neuroendocrine and behavioral responses prior to puberty. *Physiol. Behav.* 107, 104–111.
- Magarinos, A.M., McEwen, B.S., 1995. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience* 69, 83–88.
- Malliani, A., Pagani, M., Lombardi, F., Cerutti, S., 1991. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84, 482–492.
- Marin, M.T., Cruz, F.C., Planeta, C.S., 2007. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol. Behav.* 90, 29–35.
- Maslova, L.N., Bulygina, V.V., Markel, A.L., 2002. Chronic stress during prepubertal development: immediate and long-lasting effects on arterial blood pressure and anxiety-related behavior. *Psychoneuroendocrinology* 27, 549–561.
- McCormick, C.M., Mathews, I.Z., Thomas, C., Waters, P., 2010. Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain Cogn.* 72, 73–85.
- McDougall, S.J., Paull, J.R., Widdop, R.E., Lawrence, A.J., 2000. Restraint stress: differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 35, 126–129.
- McDougall, S.J., Lawrence, A.J., Widdop, R.E., 2005. Differential cardiovascular responses to stressors in hypertensive and normotensive rats. *Exp. Physiol.* 90, 141–150.
- Palatini, P., Julius, S., 1997. Association of tachycardia with morbidity and mortality: pathophysiological considerations. *J. Hum. Hypertens.* 11 (Suppl. 1), S19L 27.
- Pickering, T.G., 1990. Does psychological stress contribute to the development of hypertension and coronary heart disease? *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 39 (Suppl. 1), S1–S7.
- Pohl, J., Olmstead, M.C., Wynne-Edwards, K.E., Harkness, K., Menard, J.L., 2007. Repeated exposure to stress across the childhood-adolescent period alters rats' anxiety- and depression-like behaviors in adulthood: the importance of stressor type and gender. *Behav. Neurosci.* 121, 462–474.
- Porter, J.P., Phillips, A., Rich, J., Wright, D., 2004. Effect of chronic stress on the cardiac baroreflex in the post-weanling rat. *Life Sci.* 75, 1595–1607.
- Ristuccia, R.C., Spear, L.P., 2008. Autonomic responses to ethanol in adolescent and adult rats: a dose–response analysis. *Alcohol* 42, 623–629.
- Romeo, R.D., Bellani, R., Karatsoreos, I.N., Chhua, N., Vernov, M., Conrad, C.D., McEwen, B.S., 2006. Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic–pituitary–adrenal axis plasticity. *Endocrinology* 147, 1664–1674.
- Rozanski, A., Blumenthal, J.A., Davidson, K.W., Saab, P.G., Kubzansky, L., 2005. The epidemiology, pathophysiology, and management of psychosocial risk factors in cardiac practice: the emerging field of behavioral cardiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45, 637–651.
- Rozanski, A., Blumenthal, J.A., Kaplan, J., 1999. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 99, 2192–2217.
- Sgoifo, A., Carnevali, L., Grippe, A.J., 2014. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 39, 51–60.
- Spear, L.P., 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 417–463.

- Stephens, A., Kivimäki, M., 2012. Stress and cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 9, 360–370.
- Stone, E.A., Quartermain, D., 1997. Greater behavioral effects of stress in immature as compared to mature male mice. *Physiol. Behav.* 63, 143–145.
- Suo, L., Zhao, L., Si, J., Liu, J., Zhu, W., Chai, B., Zhang, Y., Feng, J., Ding, Z., Luo, Y., Shi, H., Shi, J., Lu, L., 2013. Predictable chronic mild stress in adolescence increases resilience in adulthood. *Neuropsychopharmacology* 38, 1387–1400.
- Tirelli, E., Laviola, G., Adriani, W., 2003. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 163–178.
- Tsoory, M., Cohen, H., Richter-Levin, G., 2007. Juvenile stress induces a predisposition to either anxiety or depressive-like symptoms following stress in adulthood. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 17, 245–256.
- Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J. Neurosci.* 22, 6810–6818.
- Willner, P., 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52, 90–110.

Stress Vulnerability During Adolescence: Comparison of Chronic Stressors in Adolescent and Adult Rats

Josiane O. Duarte, MSc, Fábio C. Cruz, PhD, Rodrigo M. Leão, PhD, Cleopatra S. Planeta, PhD, and Carlos C. Crestani, PhD

ABSTRACT

Objective: This study investigated the physiological and somatic changes evoked by daily exposure to the same type of stressor (homotypic) or different aversive stressor stimuli (heterotypic) in adolescent and adult rats, with a focus on cardiovascular function. The long-term effects of stress exposure during adolescence were also investigated longitudinally.

Methods: Male Wistar rats were exposed to repeated restraint stress (RRS, homotypic) or chronic variable stress (CVS, heterotypic).

Results: Adrenal hypertrophy, thymus involution, and elevated plasma glucocorticoid were observed only in adolescent animals, whereas reduction in body weight was caused by both stress regimens in adults. CVS increased mean arterial pressure (adolescent: $p = .001$; adult: $p = .005$) and heart rate (HR; adolescent: $p = .020$; adult: $p = .011$) regardless of the age, whereas RRS increased blood pressure selectively in adults ($p = .001$). Rest tachycardia evoked by CVS was associated with increased cardiac sympathetic activity in adults, whereas a decreased cardiac parasympathetic activity was observed in adolescent animals. Changes in cardiovascular function and cardiac autonomic activity evoked by both CVS and RRS were followed by alterations in baroreflex activity and vascular reactivity to vasoconstrictor and vasodilator agents in adolescent adult animals. Except for the circulating glucocorticoid change, all alterations observed during adolescence were reversed in adulthood.

Conclusions: These findings suggest a stress vulnerability of adolescents to somatic and neuroendocrine effects regardless of stress regimen. Our results indicated an age-stress type-specific influence in stress-evoked cardiovascular/autonomic changes. Data suggest minimal consequences in adulthood of stress during adolescence.

Key words: unpredictable stress, restraint, autonomic, baroreflex, vascular, glucocorticoids.

INTRODUCTION

Preclinical studies have used protocols of chronic psychological stress involving daily exposure to the same type of stressor (homotypic) or different aversive stimuli (heterotypic; e.g., Refs. (1–3)). The chronic variable stress (CVS) is one of the most widely used heterotypic stressor to investigate physiological, behavioral, and somatic responses to stress in rodents (4–6). It has been proposed that adaptation to chronic stress is determined by habituation to repeated stress exposure, which likely limits the long-term impact of stress (5). Habituation of hypothalamic-pituitary-adrenal

(HPA) axis activation and cardiovascular responses has been reported upon repeated exposure to the same stressor (5,7–9). Therefore, studies comparing homotypic stressors versus CVS (nonhabituating) have demonstrated that the latter exhibits a more severe impact in terms of somatic parameters (e.g., adrenal hypertrophy and thymic involution) and

CVS = chronic variable stress, DAP = diastolic arterial pressure, HR = heart rate, iHR = intrinsic heart rate, MAP = mean arterial pressure, RRS = repeated restraint stress, SAP = systolic arterial pressure, SNP = sodium nitroprusside

SDC Supplemental Content

From the Laboratory of Pharmacology (Duarte, Planeta, Crestani), School of Pharmaceutical Sciences, University of Estadual Paulista–UNESP, Araraquara, SP, Brazil; Joint UFSCar–UNESP Graduate Program in Physiological Sciences (Duarte, Planeta, Crestani), São Carlos, SP, Brazil; and Behavioral Neuroscience Branch (Cruz, Leão), Intramural Research Program, National Institute on Drug Abuse, US National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Baltimore, Maryland.

Address correspondence and reprint requests to Carlos C. Crestani, PhD, Laboratory of Pharmacology, Department of Natural Active Principles and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University–UNESP, Rodovia Araraquara–Jau Km 01 (Campus Universitário), 14801-902, Caixa Postal 502, Araraquara, SP, Brazil. E-mail: ccrestani@yahoo.com.br

Received for publication April 12, 2014; revision received November 23, 2014.

DOI: 10.1097/PSY.0000000000000141

Copyright © 2015 by the American Psychosomatic Society

HPA axis activity (2,10). Also, neuroplasticity and behavioral changes induced by chronic stress exposure seem to be related to the stress regimen (1,3,10). However, to the best of our knowledge, no study has compared the impact of homotypic versus heterotypic stress regimens on cardiovascular function.

Ontogeny is another factor affecting the impact of stress on physiological and psychological processes (11). Adolescence is a period of continuous development of the neural circuits involved in the stress responses (12,13), which can affect how adolescents cope with stress. Indeed, studies in rodents have shown that somatic changes and increased glucocorticoid level induced by chronic stress are more pronounced in adolescent than in adult animals (14–16). Thus, adolescence is proposed to be an ontogenic period of vulnerability to stress (13,17,18). However, a possible vulnerability of adolescents to cardiovascular consequences of chronic stress has never been investigated. Furthermore, although previous studies show that chronic stress exposure during adolescence evokes numerous behavioral changes and neuroplasticity that persist in adulthood (19), the cardiovascular and neuroendocrine consequences in adulthood of stress exposure during adolescence are still poorly understood.

Studies in adult rodents have demonstrated that mild hypertension evoked by CVS in adult rats is followed by elevated resting heart rate (HR), sympathoexcitation, and impairment of baroreflex activity (20–22). Changes in baroreflex activity and autonomic unbalance have also been reported in adult rats exposed to homotypic stressors (9,23,24). Furthermore, the exposure of adult rodents to either CVS or homotypic stressors altered vascular reactivity to vasoactive agents (25–28). Thus, changes in autonomic function, baroreflex activity, and vascular function may be important mechanisms involved in the etiology of stress-evoked cardiovascular complications. However, there is no evidence of the impact of chronic stress on these mechanisms in adolescents.

The above evidence indicates that chronic stress results in physiological and somatic changes. However, the influence of factors such as the type of stress and ontogeny still needs to be clarified. Therefore, our purpose in the present study was to investigate a) the physiological and somatic changes caused by the exposure to homotypic or heterotypic chronic stress regimens during adolescence or adulthood, with a focus on cardiovascular function, and b) whether stress-induced changes during adolescence endure to adulthood.

METHODS

Animals

Male Wistar rats (28-days-old [adolescent] and 60-days-old [adult]) were obtained from the animal breeding facility of the São Paulo

State University–UNESP (Botucatu, SP, Brazil). Animals were housed in collective plastic cages (41 × 34 × 16 cm, 3–4 rats/cage) in a temperature-controlled room at 24°C in the Animal Facility of the Laboratory of Pharmacology–UNESP. They were kept under a 12:12-hour light-dark cycle (lights on between 7:00 AM and 7:00 PM) with free access to water and standard laboratory food. Housing conditions and experimental procedures were carried out following protocols approved by Ethical Committee for Use of Animal of the School of Pharmaceutical Sciences/UNESP, which complies with Brazilian and international guidelines for animal use and welfare.

Chronic Stress Regimens

The chronic stress regimens were based in protocols previously described by our group (10,29). Therefore, repeated restraint stress (RRS) was chosen as a homotypic stressor, whereas CVS was used as a heterotypic stress regimen. The animals of RRS group were restrained in opaque plastic cylinders for 1 hour daily starting at 9:00 AM for 10 consecutive days. The CVS protocol consisted of exposure to different stressors in variable schedules for 10 consecutive days (Table 1). The RRS and CVS started simultaneously, and during this period, animals of the control groups were left undisturbed, except for cleaning the cages, in the animal facility.

Surgical Preparation

Animals were anesthetized with tribromoethanol (250 mg/kg, IP), and a catheter was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery for cardiovascular recording. A second catheter was implanted into the femoral vein for the infusion of drugs. Both catheters were tunneled under the skin and exteriorized on the

TABLE 1. Protocol of CVS

Day	Stress Type and Schedule
1	10:00 AM, restraint stress, 60 min; 7:00 PM, humid sawdust, overnight
2	3:00 PM, cold (4°C) isolation, 60 min; 7:00 PM, lights on, overnight
3	12:00 AM, lights off, 180 min; 3:00 PM, swim stress, 4 min
4	7:30 AM, humid sawdust, all day; 7:00 PM, food/water deprivation, overnight
5	1:00 PM, swim stress, 3 min; 7:00 PM, isolation housing, overnight
6	2:00 PM cold (4°C) isolation, 15 min; 3:00 PM, lights off, 120 min
7	7:00 PM, humid sawdust and lights on, overnight
8	7:00 PM, isolation and food/water deprivation, overnight
9	4:00 PM, restraint stress, 60 min; 7:00 PM, lights on, overnight
10	8:00 AM, swim stress, 4 min; 10:00 h, restraint stress, 60 min

CVS = chronic variable stress.

animal's dorsum. After the surgery, rats were treated with a poly-antibiotic formulation (0.27 mg/kg, IM; Pentabiotico; Fort-Dodge, Campinas, Brazil) and the nonsteroidal anti-inflammatory drug flunixin meglumine (0.025 mg/kg, IM; Banamine, Schering-Plough, Cotia, Brazil).

Measurement of Cardiovascular Parameters

The arterial cannula was connected to a pressure transducer (DPT100; Utah Medical Products Inc, Midvale, UT). Pulsatile arterial pressure was recorded using an amplifier (Quad Bridge Amp, ML224; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) and an acquisition board (PowerLab 4/30, ML866/p; ADInstruments) connected to a personal computer. Mean (MAP), systolic (SAP), and diastolic (DAP) arterial pressure and HR values were derived from pulsatile arterial pressure recordings.

Assessment of Cardiac Autonomic Activity and Intrinsic HR

Assessment of the cardiac autonomic tonus and intrinsic HR (iHR) was realized by intravenously administering methylatropine (muscarinic receptor antagonist; 3 mg/ml/kg) and propranolol (β -adrenoceptor antagonist; 4 mg ml⁻¹ kg⁻¹) (30,31). The protocol was performed on 2 days (20,30,31). On the first day, animals in all experimental groups received intravenous administration of methylatropine and propranolol in a random order. The interval of treatment between drugs was 10 minutes. On the subsequent day, animals were treated with methylatropine and propranolol in the opposite sequence to that realized on the first day.

The parasympathetic activity was obtained by the change in basal HR caused by methylatropine, whereas the sympathetic activity was determined by the HR change after propranolol treatment. The iHR was obtained after combined treatment with propranolol and methylatropine (20,30).

Infusion of Vasoactive Agents

Intravenous infusion of the α_1 -adrenoceptor agonist phenylephrine (70 μ g/ml at 0.4 ml min⁻¹ kg⁻¹), the nitric oxide donor sodium nitroprusside (SNP; 100 μ g/ml at 0.8 ml min⁻¹ kg⁻¹), and acetylcholine (10 μ g/ml at 1.2 ml min⁻¹ kg⁻¹) was performed using an infusion pump (K.D. Scientific, Holliston, MA) (32,33). Phenylephrine caused incremental pressor effect, whereas SNP and acetylcholine evoked incremental depressor responses.

Assessment of Baroreflex Activity

Paired values of MAP and HR changes evoked by phenylephrine and SNP infusion were plotted to generate sigmoid logistic functions (33). Baroreflex analysis using sigmoid curves was characterized by five parameters: a) lower HR plateau (P_1 ; in beats/min; i.e., maximum reflex bradycardia); b) upper HR plateau (P_2 ; in beats/min; i.e., maximum reflex tachycardia); c) HR range (in beats/min; i.e., difference between upper and lower plateau levels); d) median blood pressure (BP₅₀; in mm Hg), which is the MAP at 50% of the HR range; and e) average gain (G ; in beats/min per mm Hg), which is the average slope of the curves between +1 and -1 standard derivations from BP₅₀ (33).

Vascular Reactivity to Vasoactive Agents

The graded changes in MAP evoked by intravenous infusion of phenylephrine, SNP, and acetylcholine were plotted to generate dose-response curves (32). Dose-effect curves were generated for each vasoactive agent by calculating the amount of drug infused and the MAP change each 2 seconds after starting the infusion. The maximal effect (E_{max}) and the dose at 50% of the MAP range (ED₅₀) for each vasoactive agent were compared in all experimental groups.

Plasma Corticosterone Measurements

Plasma corticosterone concentration was measured by radioimmunoassay, as described previously (34). Briefly, 20 μ l of plasma was diluted 50 times with 0.01 M phosphate-buffered saline and placed in a water bath at 75°C for 1 hour for heat inactivation of corticosteroid binding globulin. One hundred microliters of a solution of antibody and (3H)-corticosterone (New England Nuclear; Boston, MA; 10,000-20,000 cpm/ml) was added to each sample, mixed, and incubated overnight at 4°C. Dextran-coated charcoal was used to adsorb free steroid after incubation. Tubes were centrifuged at 2000 \times g for 15 minutes at 4°C, the supernatant from each tube was transferred to scintillation vials, and the radioactivity was quantified by liquid scintillation spectrometry. After dilution, all concentrations of corticosterone samples were within the linear range of the standard curve.

Drugs

Propranolol hydrochloride (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), methylatropine (Sigma-Aldrich), phenylephrine hydrochloride (Sigma-Aldrich), SNP (Sigma-Aldrich), acetylcholine (Sigma-Aldrich), and tribromoethanol (Sigma-Aldrich) were dissolved in saline (0.9% NaCl). Flunixin meglumine (Banamine; Schering-Plough) and the poly-antibiotic preparation (Pentabiotico; Fort-Dodge) were used as provided.

Experimental Procedures

Experiment 1: Effects of Homotypic and Heterotypic Stress Regimens in Adolescent and Adult Animals

Adolescent and adult animals were randomly divided into three groups: a) control, b) RRS, and c) CVS. The animals of RRS and CVS groups were submitted to daily sessions of stress for 10 consecutive days. On the 10th day, after the last session of stress, animals in all experimental groups were subjected to surgical preparation. The tests were performed 24 and 48 hours after surgical preparation.

Experiment 2: Long-Term Effects of Chronic Stress During Adolescence

The aim of this protocol was to investigate the consequences in adulthood of chronic stress exposure during adolescence. For this, adolescent animals other than those used in Experiment 1 were randomly divided into three groups: a) control, b) RRS, and c) CVS. The RRS and CVS groups were submitted to daily sessions of stress during adolescence (from postnatal days 28–37).

After this period, the animals were kept in rest for 3 weeks in an animal facility. Then, animals were subjected to surgical preparation, and tests were realized 24 and 48 hours later.

The tests in all experimental groups were realized in 2 days. On test days, animals were transferred to the experimental room in their home box and allowed 60 minutes to adapt to experimental room conditions before starting experiments. On the first day, blood samples (200 µl) were collected from the femoral artery catheter for determination of plasma corticosterone concentration. In the sequence, animals were subjected to a 30-minute period of basal cardiovascular recording. After that, they received intravenous infusion of phenylephrine, SNP, and acetylcholine in a random order. Then, animals received intravenous administration of methylatropine and propranolol in a random order. On the second day, animals were treated with methylatropine and propranolol in the opposite sequence to that realized on day 1. At

the end of the experiments, animals were killed by anesthetic overdose (urethane, 2.5 g/kg, IP) and their heart, adrenals, and thymus were weighed.

Data Analysis

Data were expressed as mean ± standard error of the mean. Comparison of stress effect on body weight of adolescent and adult animals was realized using three-way analysis of variance (ANOVA), with stress (control, RRS, and CVS) and age (adolescent versus adult) as independent factors, and time as repeated measurement. Comparison in adolescents and adults of the impact of chronic stress in other parameters was realized using two-way ANOVA, with stress and age as independent factors. Planned comparisons were performed after two- and three-way ANOVA to assess the effects of age and stress protocols within adolescent and adult animals. Results of the adult

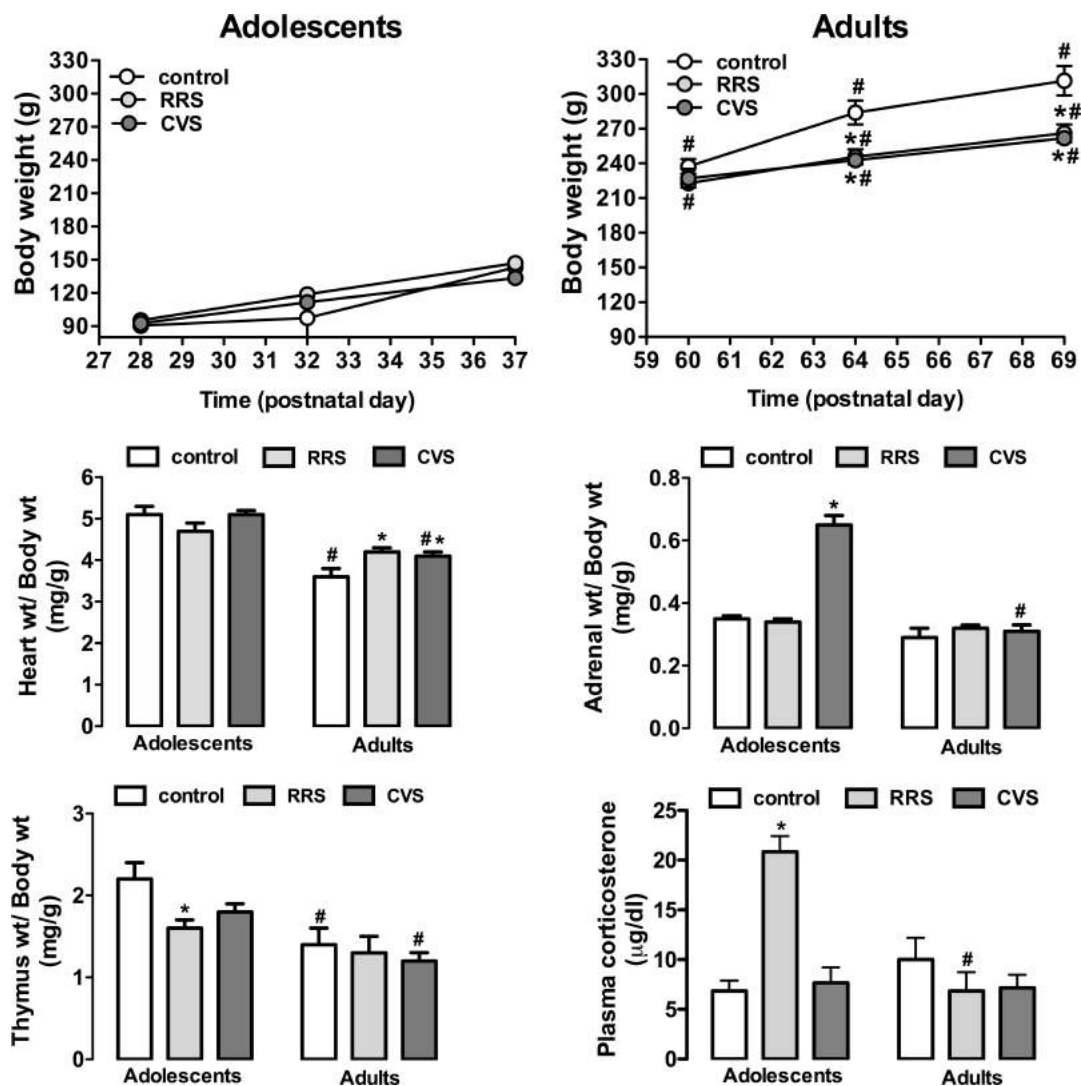


FIGURE 1. Body, heart, adrenals, and thymus weights and plasma corticosterone level in adolescent and adult rats control (white) and subjected to RRS (light gray) or CVS (dark gray). Top: time-course of body weight. The circles represent the mean ± SEM. **p* < .05 versus respective control group; #*p* < .05 versus respective adolescent group. Three-way ANOVA. Bottom: relative weight (weigh/body weight) of the heart, adrenal, and thymus, and plasma corticosterone level. The bars represent the mean ± SEM. **p* < .05 versus control within age group; #*p* < .05 versus respective adolescent group. Two-way ANOVA. RRS = repeated restraint stress; CVS = chronic variable stress; SEM = standard error of the mean; ANOVA = analysis of variance; wt = weight.

animals subjected to chronic stress during adolescence (Experiment 2) were examined using one-way ANOVA. Results of statistical tests with $p < .05$ were considered significant.

RESULTS

Experiment 1: Effects of Homotypic and Heterotypic Stress Regimens in Adolescent and Adult Animals

Effects of Chronic Stress on Somatic Parameters, Plasma Corticosterone Levels, and Basal Cardiovascular Parameters

Body Weight

Analysis of body weight revealed that adult animals in all experimental groups at all time points presented with elevated body weight when compared with adolescents ($p < .001$; Fig. 1). Also, RRS and CVS reduced body weight in adult animals at the 5th (RRS: $p < .001$, CVS: $p < .001$) and 10th (RRS: $p < .001$, CVS: $p < .001$) days of stress protocols, whereas neither RRS ($p = .67$) nor CVS ($p = .29$) affected body weight in adolescents (Fig. 1). There were no differences between RRS and CVS at any time

point in both adolescent ($p = .17$) and adult ($p = .64$) animals (Fig. 1).

Heart Weight

Analysis of heart weight indicated that adult animals in all experimental groups presented with higher heart weight ($p < .001$; see Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PSYMED/A177>, which demonstrates heart weight values). However, stress protocols did not affect heart weight in either adolescent or adult animals ($p = .48$). Analysis of relative heart weight indicated that adult animals of control ($p < .001$) and CVS ($p < .001$) groups presented with reduced values when compared with the respective adolescent group (Fig. 1). Furthermore, both RRS ($p = .023$) and CVS ($p = .049$) increased the relative heart weight in adult animals (Fig. 1).

Adrenals Weight

Analysis of adrenal weight indicated that adult animals in all experimental groups presented with higher adrenals weight ($p < .001$; see Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PSYMED/A177>, which demonstrates adrenal weight values). Furthermore, CVS increased adrenal weight in adolescent animals ($p = .012$). Analysis of

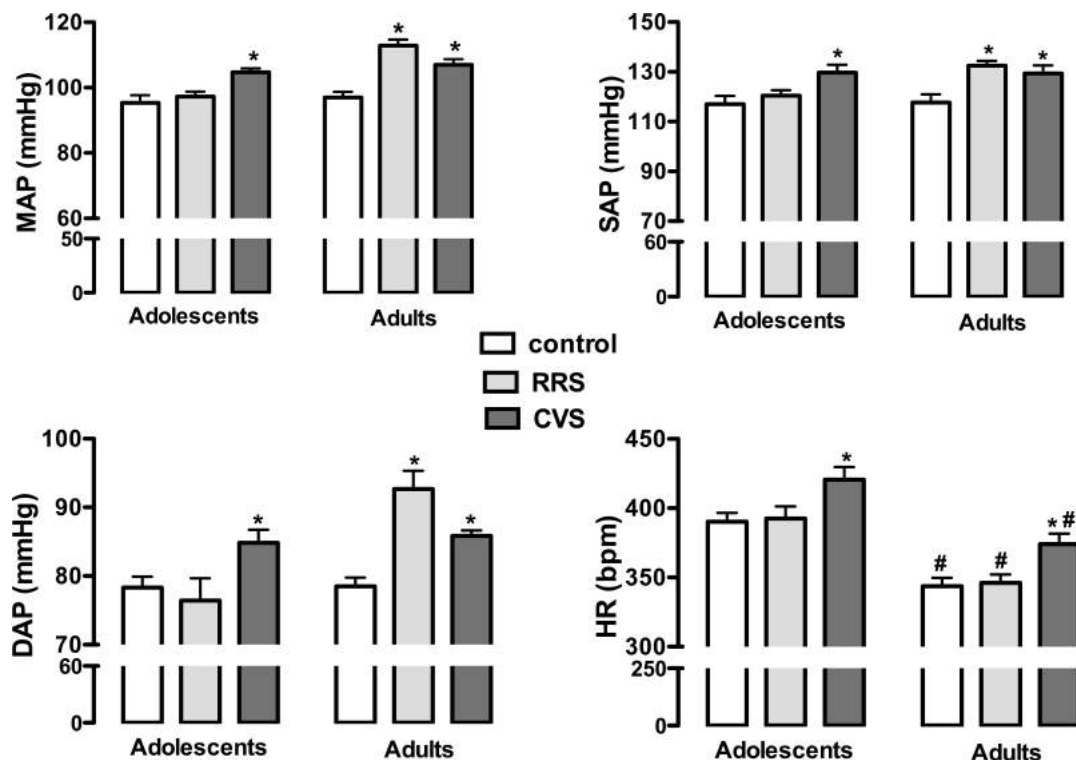


FIGURE 2. MAP, SAP, DAP, and HR in adolescent and adult rats control (white bars) and subjected to RRS (light gray bars) or CVS (dark gray bars). The bars represent the mean \pm SEM. * $p < .05$ versus control within age group; # $p < .05$ versus respective adolescent group. Two-way ANOVA. MAP = mean arterial pressure; SAP = systolic arterial pressure; DAP = diastolic arterial pressure; HR = heart rate; RRS = repeated restraint stress; CVS = chronic variable stress; SEM = standard error of the mean; ANOVA = analysis of variance; bpm = beats per minute.

relative adrenal weight indicated reduced values in adults relative to adolescent animals in CVS animals ($p < .001$; Fig. 1). Furthermore, CVS increased relative adrenal weight in adolescents ($p < .001$; Fig. 1).

Thymus Weight

Analysis of thymus weight indicated that adult animals in all experimental groups presented with higher thymus weight ($p < .001$; see Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PSYMED/A177>, which demonstrates thymus weight values). However, stress protocols did not affect thymus weight in either adolescent or adult animals ($p = .066$). Analysis of relative thymus weight indicated that adult animals of control ($p = .018$) and CVS ($p < .001$) groups presented with reduced values when compared with the respective adolescent group (Fig. 1). Furthermore, RRS ($p = .017$) decreased the relative thymus weight in adolescents (Fig. 1).

Plasma Corticosterone

Analysis of plasma corticosterone levels revealed that RRS increased plasma corticosterone in adolescents ($p < .001$; Fig. 1). Analysis indicated differences between adolescent and adult only in the RRS group ($p < .001$; Fig. 1).

Basal Cardiovascular Parameters

CVS increased MAP, SAP, and DAP in both adolescents ($p < .001$) and adults ($p < .001$), whereas RRS increased these measurements only in adults ($p < .001$; Fig. 2). Adult animals in all experimental groups presented with reduced HR values when compared with the respective adolescent groups ($p < .001$; Fig. 2). Furthermore, CVS increased HR in both adolescents ($p = .020$) and adults ($p = .011$; Fig. 2).

Effect of Chronic Stress on Intrinsic HR and Autonomic Activity

Intrinsic HR

Analysis of the HR values after combined treatment with propranolol and methylatropine (iHR) revealed that adult animals of the control group presented with reduced iHR ($p < .001$) relative to the respective adolescent group (Fig. 3A). Furthermore, RRS reduced iHR in adolescent animals ($p < .001$; Fig. 3A).

Cardiac Sympathetic Activity

Analysis of the HR change induced by intravenous administration of propranolol indicated that adult animals of the

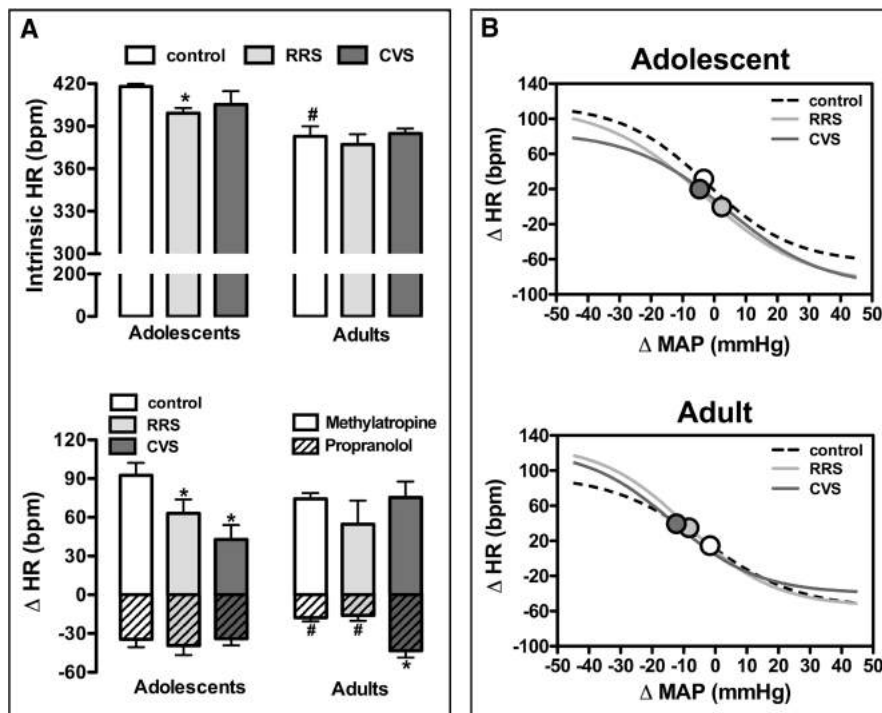


FIGURE 3. Cardiac autonomic activity, iHR, and baroreflex function in adolescent and adult rats control (white) and subjected to RRS (light gray) or CVS (dark gray). A, HR values after combined treatment with methylatropine and propranolol (iHR; top) and Δ HR evoked by administration of methylatropine (positive values, open bars) or propranolol (negative values, crosshatched bars; bottom). C, Nonlinear regression analysis of the baroreflex correlating Δ MAP and Δ HR. Symbols on curves indicate the BP₅₀. * $p < .05$ versus control within age group; # $p < .05$ versus respective adolescent group. Data are shown as the mean \pm SEM. Two-way ANOVA. iHR = intrinsic heart rate; RRS = repeated restraint stress; CVS = chronic variable stress; HR = heart rate; MAP = mean arterial pressure; BP₅₀ = median blood pressure; SEM = standard error of the mean; ANOVA = analysis of variance; bpm = beats per minute.

control ($p = .040$) and RRS ($p = .028$) adult groups presented with reduced response relative to the respective adolescent group (Fig. 3A). Furthermore, CVS increased the HR response to propranolol in adult animals ($p = .003$; Fig. 3A).

Cardiac Parasympathetic Activity

Analysis of the HR change induced by intravenous administration of methylatropine revealed that CVS ($p = .007$) and RRS ($p = .049$) reduced the HR response to methylatropine in adolescents (Fig. 3A).

Baroreflex Activity

Results of baroreflex activity analysis are presented in Figure 3B and Table 2. Baroreflex analysis indicated that RRS increased P_1 ($p = .005$) and HR range ($p = .022$) in adolescents, whereas this stress regimen increased P_2 ($p = .006$) and HR range ($p = .047$) and decreased BP_{50} ($p = .002$) in adults. CVS increased P_1 ($p < .001$) and reduced P_2 ($p < .001$) in adolescents, whereas P_1 ($p < .001$) and BP_{50} ($p < .001$) were reduced and P_2 ($p = .015$) was increased by this stress protocol in adults. Adult animals of RRS group presented with reduced P_1 ($p < .001$) and BP_{50} ($p < .001$) relative to the respective adolescent group, whereas G ($p = .011$), P_1 ($p < .001$), and BP_{50} ($p < .001$) in adults of CVS group were reduced when compared with adolescents subjected to CVS. No differences were identified between adolescent and adult animals of the control groups ($p > .99$).

Effect of Chronic Stress on Vascular Reactivity to Vasoactive Agents

The results of vascular reactivity to vasoactive agents are presented in Figure 4 and Table 3.

Phenylephrine

Analysis of the pressor response evoked by intravenous infusion of phenylephrine indicated that both RRS ($p < .001$) and CVS ($p < .001$) increased E_{max} of dose-response curve in adolescent animals. Stress protocols did not affect phenylephrine response in adults ($p = .69$). Adult animals of CVS group presented with reduced response when compared with the respective adolescent group ($p = .012$), but comparison of adolescent and adult animals of control groups did not identify differences ($p = .12$).

Acetylcholine

Analysis of the depressor response evoked by intravenous infusion of acetylcholine indicated that RRS decreased E_{max} of dose-response curve in adolescents ($p < .001$). Also, RRS increased ED_{50} ($p = .040$) of dose-response curve without affecting E_{max} in adults ($p = .37$). CVS did not affect acetylcholine depressor response in either adolescents ($p = .26$) or adults ($p = .54$). Comparison of adolescent and adult animals of the control groups did not identify differences ($p = .73$).

Sodium Nitroprusside

Analysis of the depressor response evoked by intravenous infusion of SNP indicated that RRS decreased E_{max} ($p < .001$) and ED_{50} ($p = .038$) of dose-response curve in adults. CVS did not affect SNP response in either adolescent ($p = .84$) or adult ($p = .83$) animals. Adults of RRS group presented with reduced E_{max} ($p < .001$) and ED_{50} ($p = .033$) relative to the respective adolescent group, but comparison of adolescent and adult animals of control groups did not identify differences ($p = .65$).

TABLE 2. Baroreflex Activity in Adolescent and Adult Animals Subjected to RRS or CVS for 10 Consecutive Days

Group	<i>n</i>	<i>G</i> , bpm/mm Hg	<i>P</i> ₁ , bpm	<i>P</i> ₂ , bpm	HR range, bpm	<i>BP</i> ₅₀ , mm Hg
Adolescent						
Control	6	-2.4 ± 0.20	-64 ± 4	116 ± 4	181 ± 6	-4 ± 2
RRS	7	-2.3 ± 0.2	-90 ± 6*	115 ± 7	205 ± 5*	2 ± 2
CVS	7	-2.2 ± 0.2	-91 ± 5*	85 ± 4*	177 ± 5	-4 ± 1
Adult						
Control	6	-1.9 ± 0.1	-58 ± 2	98 ± 6	155 ± 8	-4 ± 1
RRS	6	-2.1 ± 0.1	-55 ± 4**	129 ± 6*	184 ± 10*	-11 ± 2*,**
CVS	6	-1.5 ± 0.08**	-41 ± 3*,**	124 ± 6*	165 ± 7	-15 ± 1*,**

RRS = repeated restraint stress; CVS = chronic variable stress; *G* = average gain; bpm = beats per minute; *P*₁ = lower HR plateau; *P*₂ = upper HR plateau; HR = heart rate; *BP*₅₀ = median blood pressure; SEM = standard error of the mean; ANOVA = analysis of variance.

Values are mean ± SEM. Parameters derived from nonlinear regression analysis. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.

* $p < .05$ versus control group, ** $p < .05$ versus respective group adolescent.

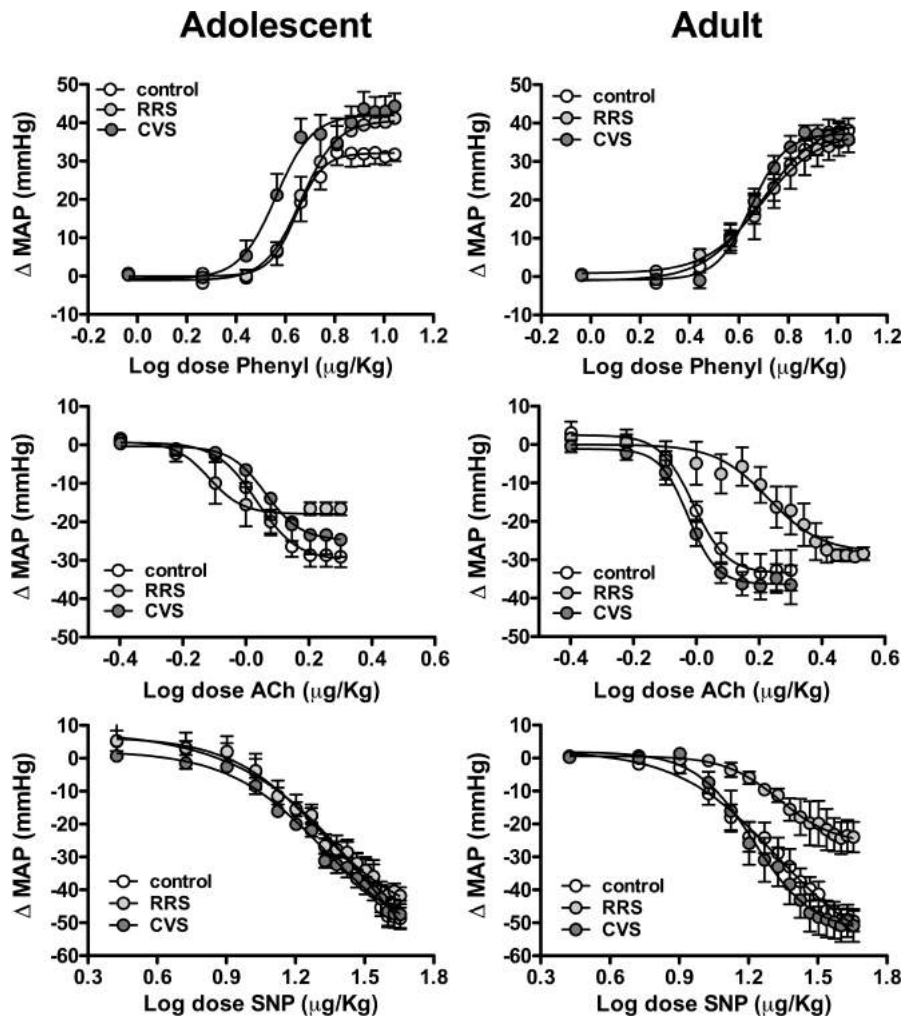


FIGURE 4. Δ MAP evoked by increasing concentrations of Phenyl, Ach, and SNP in adolescent (left) and adult (right) rats control (white circles) and subjected to RRS (light gray circles) or CVS (dark gray circles). The circles represent the mean \pm SEM. MAP = mean arterial pressure; Phenyl = phenylephrine; Ach = acetylcholine; SNP = sodium nitroprusside; RRS = repeated restraint stress; CVS = chronic variable stress; SEM = standard error of the mean.

Experiment 2: Long-Term Effects of Chronic Stress During Adolescence

Analysis of body, heart, adrenals, and thymus weights of adult animals that were stressed during adolescence did not identify the effect of either RRS or CVS (see Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/PSYMED/A178>, which demonstrates organs weight values; Fig. 5). However, adult animals subjected to RRS during adolescence presented with elevated corticosterone levels ($p = .003$; Fig. 5). CVS or RRS exposure during adolescence did not affect any cardiovascular or autonomic parameter in adulthood (Figs. 6 and 7; Tables 4 and 5).

DISCUSSION

Studies in adult rodents have demonstrated that somatic changes and the increase in circulating glucocorticoid levels

are mainly observed following heterotypic stress regimens, whereas homotypic stressor minimally affect these parameters (1,2,10), possibly due to a habituation to stressor when the same aversive stimulus is repeatedly presented (5). However, in the present study, neither CVS nor RRS affected adrenal and thymus weight and plasma corticosterone concentration in adult animals. Previous studies have reported the absence of changes in glucocorticoid level of adult animals after CVS (15,35,36). It has been demonstrated that somatic effects are more affected by physical stressors than by psychological aversive stimuli (37), which may explain the absence of somatic changes in the present study. However, we observed that both RRS and CVS reduced body weight. Reduction in body weight of animals subjected to either CVS or homotypic stressors is well described (35,38–40). Altogether, present findings indicate that our CVS and RRS protocols present similar profile on somatic and neuroendocrine parameters in adult animals.

TABLE 3. E_{max} and ED_{50} for Phenyl, Ach, and SNP Dose-Response Curves in Adolescent and Adult Animals Subjected to RRS or CVS for 10 Consecutive Days

Group	<i>n</i>	Phenyl ED_{50}	E_{max}	Ach ED_{50}	E_{max}	SNP ED_{50}	E_{max}
Adolescent							
Control	6	0.63 ± 0.03	32 ± 2	0.06 ± 0.04	-30 ± 3	1.25 ± 0.05	-48 ± 3
RRS	7	0.67 ± 0.04	42 ± 1*	-0.08 ± 0.05	-16 ± 1*	1.23 ± 0.01	-42 ± 2
CVS	7	0.57 ± 0.04	45 ± 3*	0.07 ± 0.02	-24 ± 4	1.19 ± 0.02	-47 ± 4
Adult							
Control	6	0.67 ± 0.02	38 ± 3	-0.001 ± 0.02	-32 ± 5	1.25 ± 0.03	-50 ± 3
RRS	6	0.66 ± 0.05	36 ± 3	0.20 ± 0.08*	-27 ± 2**	1.39 ± 0.05*,**	-23 ± 4*,**
CVS	6	0.65 ± 0.02	35 ± 1**	-0.03 ± 0.02	-36 ± 4	1.23 ± 0.03	-51 ± 4

E_{max} = maximal effect; ED_{50} = dose at 50% of the MAP range; Phenyl = phenylephrine; Ach = acetylcholine; SNP = sodium nitroprusside; RRS = repeated restraint stress; CVS = chronic variable stress; SEM = standard error of the mean; ANOVA = analysis of variance.

Values are mean ± SEM. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.

* $p < .05$ versus control group, ** $p < .05$ versus respective group adolescent.

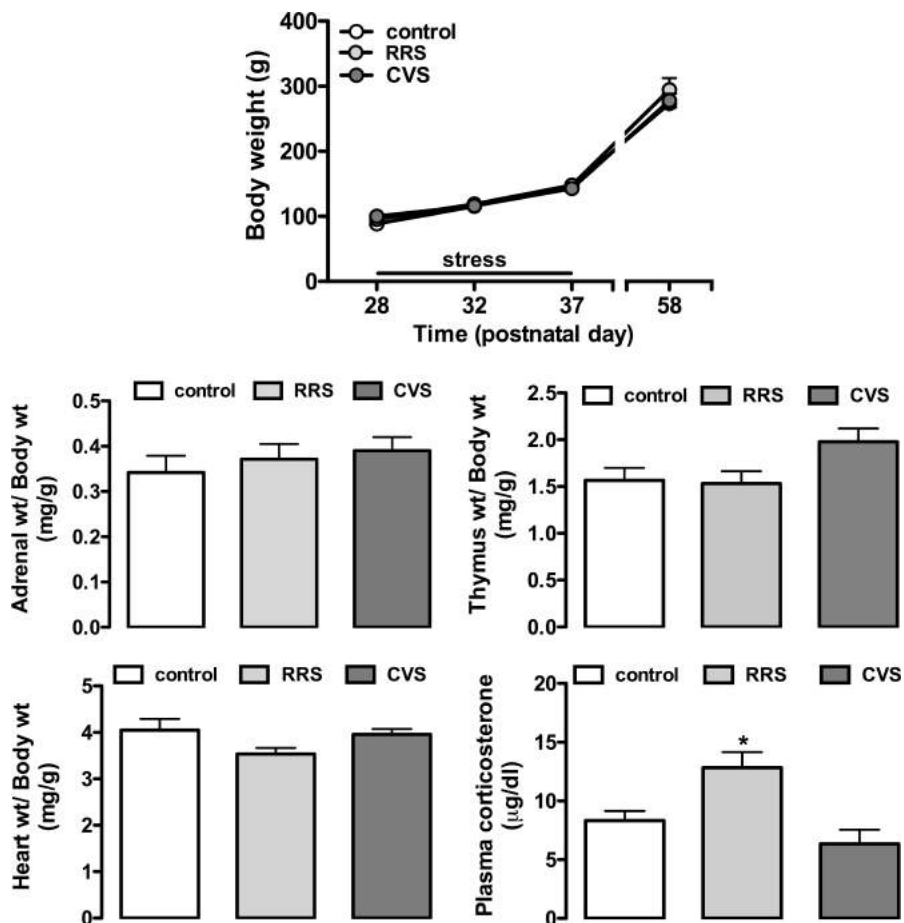


FIGURE 5. Body, heart, adrenals, and thymus weights in adult rats control (white) or subjected to RRS (light gray circles) or CVS (dark gray circles) during adolescence. Top: time-course of body weight. The circles represent the mean ± SEM. Two-way ANOVA. Bottom: relative weight (weigh/body weight) of the heart, adrenal, and thymus, and plasma corticosterone level. The bars represent the mean ± SEM. * $p < .05$ versus control group, one-way ANOVA. RRS = repeated restraint stress; CVS = chronic variable stress; SEM = standard error of the mean; ANOVA = analysis of variance; wt = weight.

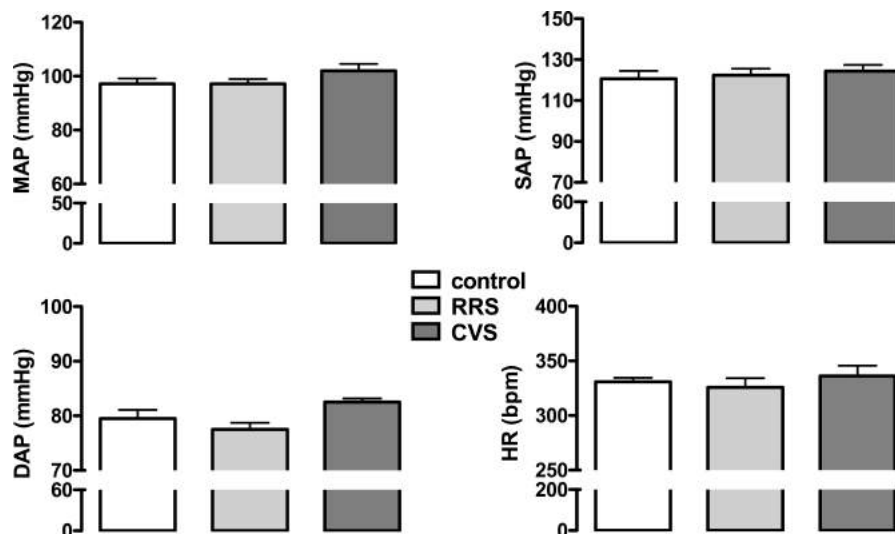


FIGURE 6. MAP, SAP, DAP, and HR in adult rats subjected to RRS (light gray bars) or CVS (dark gray bars) during adolescence. The bars represent the mean \pm SEM. One-way ANOVA. MAP = mean arterial pressure; SAP = systolic arterial pressure; DAP = diastolic arterial pressure; HR = heart rate; RRS = repeated restraint stress; CVS = chronic variable stress; SEM = standard error of the mean; ANOVA = analysis of variance.

Present findings are in line with previous studies reporting elevation of arterial pressure and HR in adult rodents subjected to CVS (20,21). On the other hand, it has been demonstrated that repeated exposure to the same stressor does not alter baseline cardiovascular parameters (8,41), possibly due to a habituation to aversive stimulus (8,41,42). Our results show that RRS elevated arterial pressure in adult animals, contrasting with the idea of habituation during repeated exposure to same stressor. A recent study in adult rats demonstrated that daily exposure to restraint stress for 5 consecutive days increased arterial pressure (9). It was also reported that cardiovascular changes observed during restraint stress were similar at the first and fifth session (9), reinforcing the idea of absence of habituation.

Influence of the Ontogeny

We observed that adolescents showed higher HR values relative to adult animals, which is in line with previous studies (24,43,44). However, the present study provides the first evidence that resting tachycardia in adolescents is mediated by a higher cardiac sympathetic tone and increased iHR. Increase in HR and cardiac sympathetic activity is proposed to be a risk factor for the emergence of cardiovascular diseases (45–47). Therefore, ontogenic differences in cardiovascular function may indicate a cardiovascular vulnerability during adolescence.

It has been shown that somatic effects and increased basal glucocorticoid level induced by chronic stress are exaggerated in adolescent animals relative to adults (14–16). These findings support present results demonstrating that adolescents

were selectively vulnerable to adrenal hypertrophy, thymus involution, and increase in corticosterone level evoked by chronic stress regimens. The absence of corticosterone change in CVS animals corroborates previous study demonstrating that CVS does not affect basal corticosterone and corticotrophin-releasing hormone messenger RNA in the hypothalamic paraventricular nucleus in early adolescence (15,29,48). Furthermore, CVS-evoked facilitation of corticosterone response to a novel stressor is more pronounced in adult relative to adolescent (15), thus indicating a resistance of adolescent to neuroendocrine effects of CVS. On the other hand, previous results showed lesser habituation of corticosterone response upon repeated exposure to restraint stress in adolescence than in adulthood (14,49,50), thus supporting present findings of increase in corticosterone levels in response to RRS during adolescence.

The present study provides the first evidence of cardiovascular changes to RRS and CVS in adolescent animals. The elevation of blood pressure and HR evoked by CVS contrasts previous study reporting that CVS does not affect basal systolic pressure in adolescent rats (48). Reasons for the discrepancy are not clear, but may be the result of methodological differences once cardiovascular results in this earlier study were obtained through indirect measurement of blood pressure (48). Regarding the RRS, in opposition to the elevation of blood pressure evoked by this stress regimen in adult animals, RRS did not affect cardiovascular basal parameters in adolescents. Thus, present results provide evidence that homotypic and heterotypic stress regimens differently impact the cardiovascular function in adolescents.

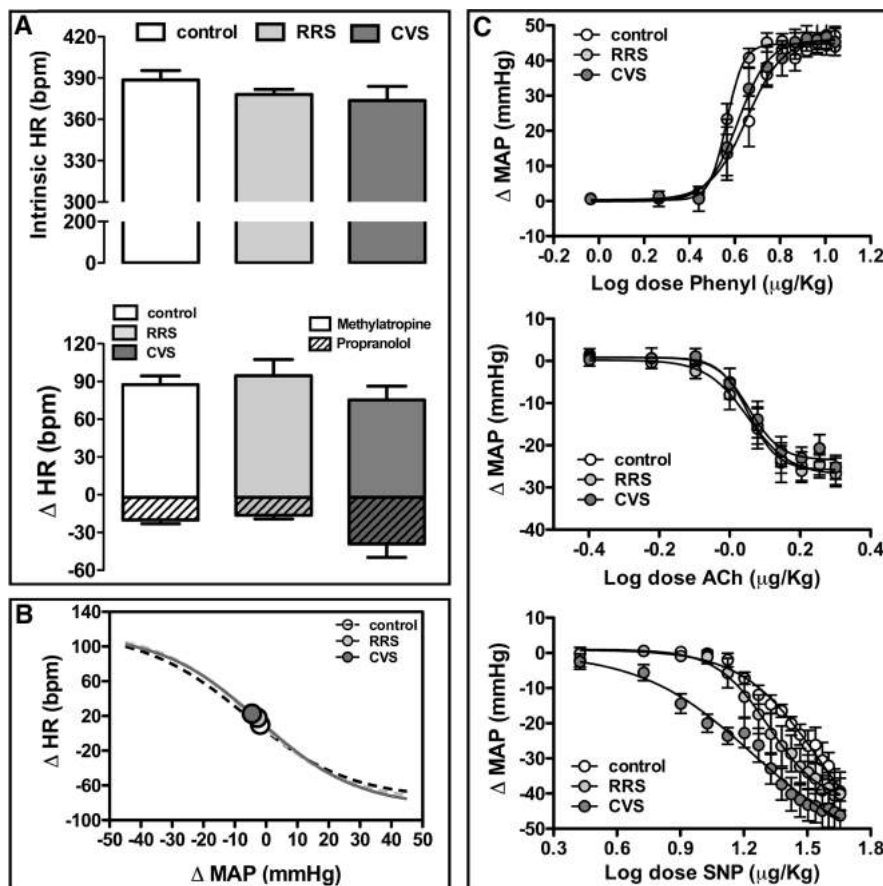


FIGURE 7. Cardiac autonomic activity, iHR, baroreflex function, and vascular reactivity to vasoactive agents in adult rats control (white) or subjected to RRS (light gray circles) or CVS (dark gray circles) during adolescence. A, HR values after combined treatment with methylatropine and propranolol (iHR; top) and Δ HR evoked by administration of methylatropine (positive values, open bars) or propranolol (negative values, crosshatched bars) (bottom). B, Nonlinear regression analysis of the baroreflex correlating Δ MAP and Δ HR. Symbols on curves indicate the BP₅₀. C, Δ MAP evoked by increasing concentrations of Phenyl, Ach, and SNP. Data are shown as mean \pm SEM. One-way ANOVA. iHR = intrinsic heart rate; RRS = repeated restraint stress; CVS = chronic variable stress; HR = heart rate; MAP = mean arterial pressure; BP₅₀ = median blood pressure; Phenyl = phenylephrine; Ach = acetylcholine; SNP = sodium nitroprusside; SEM = standard error of the mean; ANOVA = analysis of variance.

Long-Term Changes of Stress Exposure During Adolescence

Except for the changes in corticosterone level, we observed that all alterations evoked by stress exposure during adolescence were reversed in adulthood. Impact of chronic stress

during adolescence in HPA axis response to a novel stressor in adulthood has been reported (37), but our results are the first evidence of a long-term effect on basal glucocorticoid levels. Also, to our knowledge, present findings are the first to show that cardiovascular changes induced by psychological stress

TABLE 4. Baroreflex Activity in Adult Animals Subjected to RRS or CVS During Adolescence

Group	n	G, bpm/mm Hg	P ₁ , bpm	P ₂ , bpm	HR range, bpm	BP ₅₀ , mm Hg
Control	6	-2.2 \pm 0.2	-75 \pm 8	101 \pm 9	178 \pm 17	-3 \pm 2
RRS	7	-2.3 \pm 0.2	-75 \pm 6	102 \pm 12	179 \pm 12	-4 \pm 2
CVS	7	-2.1 \pm 0.1	-85 \pm 6	115 \pm 12	199 \pm 14	-5 \pm 4

RRS = repeated restraint stress; CVS = chronic variable stress; G = average gain; bpm = beats per minute; P₁ = lower HR plateau; P₂ = upper HR plateau; HR = heart rate; BP₅₀ = median blood pressure; SEM = standard error of the mean; ANOVA = analysis of variance.

Values are mean \pm SEM. Parameters derived from nonlinear regression analysis. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.

TABLE 5. E_{max} and ED_{50} for Phenyl, Ach, and SNP Dose-Response Curves in Adult Animals Subjected to RRS or CVS During Adolescence

Group	<i>n</i>	Phenyl ED_{50}	E_{max}	Ach ED_{50}	E_{max}	SNP ED_{50}	E_{max}
Control	6	0.66 ± 0.05	47 ± 4	0.06 ± 0.02	-27 ± 3	1.39 ± 0.04	-40 ± 5
RRS	7	0.54 ± 0.02	43 ± 2	0.05 ± 0.03	-27 ± 3	1.30 ± 0.04	-41 ± 4
CVS	7	0.62 ± 0.04	45 ± 3	0.06 ± 0.03	-26 ± 3	1.01 ± 0.1	-47 ± 4

E_{max} = maximal effect; ED_{50} = dose at 50% of the MAP range; Phenyl = phenylephrine; Ach = acetylcholine; SNP = sodium nitroprusside; RRS = repeated restraint stress; CVS = chronic variable stress; SEM = standard error of the mean; ANOVA = analysis of variance.

Values are mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.

during adolescence are reversed in adulthood. However, previous studies in rodents have shown that chronic stress exposure during adolescence causes numerous behavioral and morphological/neurochemical changes in adulthood (19,37,51), thus suggesting that stress in adolescence differently affects physiological, behavioral, and encephalic morphological/neurochemical parameters in adulthood.

Mechanisms of Stress-Evoked Cardiovascular Changes

Resting tachycardia evoked by CVS in adult animals was mediated by an elevated sympathetic tone to the heart, which is in line with earlier studies (20,52). Interestingly, we found that CVS-evoked HR elevation in adolescents was mediated by a decrease in cardiac parasympathetic activity. The reasons for the age difference are not completely clear, but may be the result of the elevated cardiac sympathetic tone observed in adolescents. It is important to note that despite the higher sympathetic activity and elevated HR in adolescents relative to adults, CVS caused a further increase in HR of adolescents through a modulation of vagal activity. This may indicate a vulnerability of adolescents to the impact of chronic stress in autonomic and cardiac functions.

Impairment of baroreflex activity is proposed to be involved in the development and progression of hypertension (53,54). Therefore, the reduction of reflex tachycardia in adolescents and of baroreflex bradycardia in adults may indicate a role of baroreflex impairment in blood pressure elevation evoked by CVS. Also, impairment of baroreflex activity is associated with overactivity of the sympathetic tone and reduction of cardiac parasympathetic activity (55), thus indicating that baroreflex changes could also explain the resting tachycardia evoked by CVS. Exacerbated tachycardiac response is proposed to be a risk factor for myocardial ischemia and sudden death (46,47). Thus, increased reflex tachycardia in adult animals subjected to either RRS or CVS may constitute a cardiovascular risk factor. Facilitated reflex bradycardia evoked by chronic stress regimens in adolescent animals may constitute a

mechanism counteracting the cardiovascular changes induced by CVS and RRS.

Hypertension is associated with vascular dysfunction, which is mainly characterized by endothelial impairment and abnormal dilatation of blood vessels (56). Thus, the reduced depressor response to acetylcholine and SNP in adult animals subjected to RRS indicates that impairment of vascular relaxation response may explain the elevation of blood pressure in these animals. Increased vascular response to vasoconstrictor agents has also been associated with hypertension (57,58), thus suggesting that increased pressor response to phenylephrine evoked by CVS in adolescents may explain the mild hypertension in these animals.

The absence of changes in vascular reactivity following CVS protocol in adulthood contrasts previous studies in vitro demonstrating that this stress regimen changed vascular reactivity in aorta rings (26,27,59). However, a recent study did not find change in vascular reactivity to noradrenaline in resistance vessels (saphenous and mesenteric small arteries) isolated from adult rats subjected to CVS (60). This result supports present findings once changes in arterial pressure are mainly resulted of the action of vasoactive agents in resistance vasculature. The impact of homotypic stressor in vascular function is less understood, but studies carried out in isolated aorta rings demonstrated that repeated exposure to the same stressor affected vascular response to vasoactive agents (25), supporting present findings.

In summary, our results suggest a vulnerability of adolescents to somatic and neuroendocrine effects of both homotypic and heterotypic stress regimens. Present findings also indicate an age- and stress type-specific influence in autonomic, baroreflex, and vascular changes evoked by chronic stress exposure. Alterations in these functions seem to constitute important mechanisms in etiology of chronic stress-evoked cardiovascular changes. Finally, our results suggest minimal long-term consequences in adulthood of chronic stress exposure during adolescence.

The authors thank Elisabete Lepera and Rosana Silva for technical assistance.

Source of Funding and Conflicts of Interest: This work was supported by FAPESP Grants 2012/14376-0 and 2012/50549-6 and PADC-FCF UNESP. C.S.P. is a CNPq research fellow. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Kopp BL, Wick D, Herman JP. Differential effects of homotypic vs. heterotypic chronic stress regimens on microglial activation in the prefrontal cortex. *Physiol Behav* 2013;122:246–52.
- Magarinos AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience* 1995;69:83–8.
- Flak JN, Solomon MB, Jankord R, Krause EG, Herman JP. Identification of chronic stress-activated regions reveals a potential recruited circuit in rat brain. *Eur J Neurosci* 2012;36:2547–55.
- Grippo AJ. Mechanisms underlying altered mood and cardiovascular dysfunction: the value of neurobiological and behavioral research with animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 2009;33:171–80.
- Herman JP. Neural control of chronic stress adaptation. *Front Behav Neurosci* 2013;7:61.
- Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 2005;52:90–110.
- Bhatnagar S, Huber R, Nowak N, Trotter P. Lesions of the posterior paraventricular thalamus block habituation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to repeated restraint. *J Neuroendocrinol* 2002;14:403–10.
- Chen X, Herbert J. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. *Neuroscience* 1995;64:675–85.
- Daubert DL, McCowan M, Erdos B, Scheuer DA. Nucleus of the solitary tract catecholaminergic neurons modulate the cardiovascular response to psychological stress in rats. *J Physiol* 2012;590:4881–95.
- Marin MT, Cruz FC, Planeta CS. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav* 2007;90:29–35.
- Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24:417–63.
- Casey BJ, Jones RM, Hare TA. The adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1124:111–26.
- Andersen SL. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 2003;27:3–18.
- Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP. Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Physiol Behav* 2009;97:484–94.
- Jankord R, Solomon MB, Albertz J, Flak JN, Zhang R, Herman JP. Stress vulnerability during adolescent development in rats. *Endocrinology* 2011;152:629–38.
- Stone EA, Quartermain D. Greater behavioral effects of stress in immature as compared to mature male mice. *Physiol Behav* 1997;63:143–5.
- Dahl RE. Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1021:1–22.
- Andersen SL, Teicher MH. Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. *Trends Neurosci* 2008;31:183–91.
- Buwalda B, Geerdink M, Vidal J, Koolhaas JM. Social behavior and social stress in adolescence: a focus on animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 2011;35:1713–21.
- Grippo AJ, Moffitt JA, Johnson AK. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282:R1333–41.
- Grippo AJ, Moffitt JA, Johnson AK. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. *Psychosom Med* 2008;70:435–43.
- Grippo AJ, Santos CM, Johnson RF, Beltz TG, Martins JB, Felder RB, Johnson AK. Increased susceptibility to ventricular arrhythmias in a rodent model of experimental depression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H619–26.
- Conti LH, Shannon MH, Murry JD, Printz MP. Repeated restraint stress-induced increase in baroreceptor reflex sensitivity: role of corticotropin-releasing factor. *Neuropeptides* 2001;35:71–81.
- Porter JP, Phillips A, Rich J, Wright D. Effect of chronic stress on the cardiac baroreflex in the post-weanling rat. *Life Sci* 2004;75:1595–607.
- Cordellini S, Vassilief VS. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. *Gen Pharmacol* 1998;30:79–83.
- d'Audiffret AC, Frisbee SJ, Stapleton PA, Goodwill AG, Isingrini E, Frisbee JC. Depressive behavior and vascular dysfunction: a link between clinical depression and vascular disease? *J Appl Physiol* (1985) 2010;108:1041–51.
- Isingrini E, Surget A, Belzung C, Freslon JL, Frisbee J, O'Donnell J, Camus V, d'Audiffret A. Altered aortic vascular reactivity in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice: UCMS causes relaxation impairment to ACh. *Physiol Behav* 2011;103:540–6.
- Neves VJ, Moura MJ, Tamascia ML, Ferreira R, Silva NS, Costa R, Montemor PL, Narvaes EA, Bernardes CF, Novaes PD, Marcondes FK. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. *Stress* 2009;12:320–7.
- Cruz FC, Marin MT, Leao RM, Planeta CS. Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. *Int J Dev Neurosci* 2012;30:19–23.
- Negrão CE, Moreira ED, Santos MC, Farah VM, Krieger EM. Vagal function impairment after exercise training. *J Appl Physiol* (1985) 1992;72:1749–53.
- Sanches IC, Sartori M, Jorge L, Irigoyen MC, De Angelis K. Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:942–8.
- Engi SA, Cruz FC, Leao RM, Correa FM, Planeta CS, Crestani CC. Effect of the single or combined administration of cocaine and testosterone on cardiovascular function and baroreflex activity in unanesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012;59:231–40.
- Crestani CC, Alves FH, Busnardo C, Resstel LB, Correa FM. *N*-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. *Neurosci Res* 2010;67:317–26.
- Samyai Z, Biro E, Penke B, Telegdy G. The cocaine-induced elevation of plasma corticosterone is mediated by endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in rats. *Brain Res* 1992;589:154–6.

35. Flak JN, Jankord R, Solomon MB, Krause EG, Herman JP. Opposing effects of chronic stress and weight restriction on cardiovascular, neuroendocrine and metabolic function. *Physiol Behav* 2011;104:228–34.
36. Grippo AJ, Sullivan NR, Damjanoska KJ, Crane JW, Carrasco GA, Shi J, Chen Z, Garcia F, Muma NA, Van de Kar LD. Chronic mild stress induces behavioral and physiological changes, and may alter serotonin 1A receptor function, in male and cycling female rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;179:769–80.
37. Isgor C, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. *Hippocampus* 2004;14:636–48.
38. Krugel U, Fischer J, Radicke S, Sack U, Himmerich H. Anti-depressant effects of TNF-alpha blockade in an animal model of depression. *J Psychiatr Res* 2013;47:611–6.
39. Marti O, Marti J, Armario A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav* 1994;55:747–53.
40. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 1997;134:319–29.
41. McDougall SJ, Paull JR, Widdop RE, Lawrence AJ. Restraint stress: differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000;35:126–9.
42. McDougall SJ, Lawrence AJ, Widdop RE. Differential cardiovascular responses to stressors in hypertensive and normotensive rats. *Exp Physiol* 2005;90:141–50.
43. Canese R, Adriani W, Marco EM, De Pasquale F, Lorenzini P, De Luca N, Fabi F, Podo F, Laviola G. Peculiar response to methylphenidate in adolescent compared to adult rats: a phMRI study. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;203:143–53.
44. Ristuccia RC, Spear LP. Autonomic responses to ethanol in adolescent and adult rats: a dose-response analysis. *Alcohol* 2008;42:623–9.
45. Carney RM, Freedland KE, Rich MW, Smith LJ, Jaffe AS. Ventricular tachycardia and psychiatric depression in patients with coronary artery disease. *Am J Med* 1993;95:23–8.
46. Dyer AR, Persky V, Stamler J, Paul O, Shekelle RB, Berkson DM, Lepper M, Schoenberger JA, Lindberg HA. Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 1980;112:736–49.
47. Palatini P, Julius S. Association of tachycardia with morbidity and mortality: pathophysiological considerations. *J Hum Hypertens* 1997;11(suppl 1):S19–27.
48. Maslova LN, Bulygina VV, Markel AL. Chronic stress during prepubertal development: immediate and long-lasting effects on arterial blood pressure and anxiety-related behavior. *Psychoneuroendocrinology* 2002;27:549–61.
49. Lui P, Padow VA, Franco D, Hall BS, Park B, Klein ZA, Romeo RD. Divergent stress-induced neuroendocrine and behavioral responses prior to puberty. *Physiol Behav* 2012;107:104–11.
50. Romeo RD, Bellani R, Karatsoreos IN, Chhua N, Vernov M, Conrad CD, McEwen BS. Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic-pituitary-adrenal axis plasticity. *Endocrinology* 2006;147:1664–74.
51. Tsory M, Cohen H, Richter-Levin G. Juvenile stress induces a predisposition to either anxiety or depressive-like symptoms following stress in adulthood. *Eur Neuropsychopharmacol* 2007;17:245–56.
52. Grippo AJ, Beltz TG, Johnson AK. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiol Behav* 2003;78:703–10.
53. Grassi G, Trevano FQ, Seravalle G, Scopelliti F, Mancia G. Baroreflex function in hypertension: consequences for antihypertensive therapy. *Prog Cardiovasc Dis* 2006;48:407–15.
54. Honzikova N, Fiser B. Baroreflex sensitivity and essential hypertension in adolescents. *Physiol Res* 2009;58:605–12.
55. Grassi G, Seravalle G, Dell'Oro R, Facchini A, Ilardo V, Mancia G. Sympathetic and baroreflex function in hypertensive or heart failure patients with ventricular arrhythmias. *J Hypertens* 2004;22:1747–53.
56. Tang EH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? *Pflugers Arch* 2010;459:995–1004.
57. Chang HR, Lee RP, Wu CY, Chen HI. Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: a comparison between rats with normotension and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:275–80.
58. Laurent S, Juillerat L, London G, Nussberger J, Brunner H, Safar M. Hyperreactivity of the humeral artery to noradrenaline in essential hypertension patients. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1987;80:826–31.
59. Isingrini E, Belzung C, Freslon JL, Machet MC, Camus V. Fluoxetine effect on aortic nitric oxide-dependent vasorelaxation in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice. *Psychosom Med* 2012;74:63–72.
60. Bouzinova EV, Moller-Nielsen N, Boedtkjer DB, Broegger T, Wiborg O, Aalkjaer C, Matchkov VV. Chronic mild stress-induced depression-like symptoms in rats and abnormalities in catecholamine uptake in small arteries. *Psychosom Med* 2012;74:278–87.