



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



**“Comparação do tratamento crônico com inibidor da síntese de óxido nítrico ou fluoxetina sobre as alterações cardiovasculares e do tipo depressivas induzidas pelo estresse crônico variável em ratos.”**

**Jeferson de Almeida**

**São Carlos-SP  
2014**



**“Comparação do tratamento crônico com inibidor da síntese de óxido nítrico ou fluoxetina sobre as alterações cardiovasculares e do tipo depressivas induzidas pelo estresse crônico variável em ratos.”**

**Jeferson de Almeida**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) UFSCar/UNESP, como requisito para obtenção do **Título de Mestre em Ciências Fisiológicas**, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani.

**São Carlos-SP  
2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

A447ct

Almeida, Jeferson de.

Comparação do tratamento crônico com inibidor da síntese de óxido nítrico ou fluoxetina sobre as alterações cardiovasculares e do tipo depressivas induzidas pelo estresse crônico variável em ratos / Jeferson de Almeida. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

66 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Estresse. 2. Depressão mental. 3. Óxido nítrico. 4. Função cardiovascular. I. Título.

CDD: 612.11822 (20<sup>a</sup>)

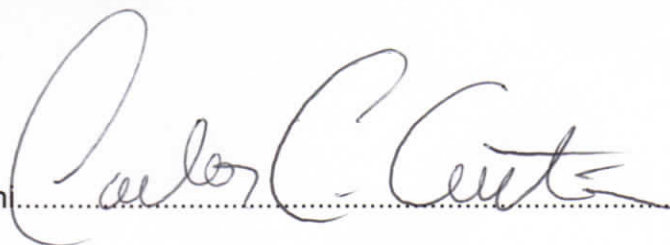
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Jeferson de Almeida

Dia 05/09/2014

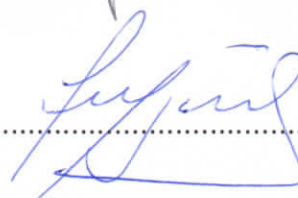
Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani.....



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carina Aparecida Fabrício de Andrade.....



Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Côrrea.....



## **DEDICATÓRIA**

Eu dedico esse trabalho primeiramente a Deus e toda a minha família, que sempre me deram forças nos momentos mais difíceis em que eu passei.

A minha esposa Michele que não há palavras para falar o que ela significa para mim e a Sophia que é a principal razão de tudo isso.

E todos os meus amigos que sempre estão comigo conversando e me apoiando a sempre continuar.

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente agradeço a Deus pela oportunidade de uma vida abundante. Aos meus pais, por estarem sempre ao meu lado acreditando em meu sucesso profissional.

À minha esposa por ter acreditado em meu potencial e compreendido a minha ausência em alguns momentos importantes de nossa vida e sempre que pode me deu novas energias e “acendeu muitas luzes no fim do túnel”.

Agradeço de coração aos meus irmãos, que sempre me deram força para continuar mais e mais, e sempre ser um vencedor convicto.

Ao professor Carlos Cesar Crestani, que dedicou horas e horas de seu precioso tempo para orientar-me a construir esse maravilhoso trabalho.

Aos professores do curso, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório Leandro, Ricardo, Josiane, Jonas, Sheila, Ana Cláudia, Lígia, Ariela, Matheus, Paula, Adrielle, Mariane, Lucas entre outros.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas, UFSCar e UNESP pela oportunidade de participar e contribuir para esse excelente programa.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação, pela disponibilidade, atendimento e orientações.

Às técnicas do laboratório Elisabete Z.P. Lepera e Rosana F.P. Silva por serem fundamentais nessa conquista.

E a todas as pessoas, que apesar de não estarem citadas aqui, estiveram presentes e me auxiliando na realização deste trabalho.

## **EPIGRAFE**

**“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”**

**Charles Chaplin**

# SUMÁRIO

<b>1) INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1) Modelo experimental para avaliar interação entre depressão e função cardiovascular .....	16
1.2) Óxido nítrico e depressão .....	16
1.3) nNOS e função cardiovascular.....	18
<b>2) OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3) MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
3.1) Animais.....	22
3.2) Estresse crônico variável.....	22
3.3) Teste de nado forçado.....	23
3.4) Tratamento farmacológico.....	23
3.5) Canulação da artéria e veia femorais.....	23
3.6) Registro da pressão arterial e frequência cardíaca .....	24
3.7) Avaliação da atividade barorreflexa.....	24
3.8) Análise da reatividade vascular.....	26
3.9) Avaliação da atividade simpática e parassimpática cardíaca.....	26
3.10) Medição de corticosterona plasmática.....	27
3.11) Soluções e drogas.....	27
3.12) Análise estatística.....	28
<b>4) PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</b> .....	29
<b>5) RESULTADOS</b> .....	32
5.1) Efeito do estresse crônico variável e tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI no comportamento do tipo depressivo.....	32
5.2) Efeitos do estresse crônico variável e do tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI nos parâmetros somáticos e nos níveis de corticosterona plasmática.....	34
5.3) Efeitos do estresse crônico variável e tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI sobre parâmetros cardiovasculares basais.....	37
5.4) Efeitos do estresse crônico variável e tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI na atividade autonômica e FC intrínseca.....	39
5.5) Efeitos do estresse crônico variável e tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI sobre a atividade do barorreflexo.....	44



5.6) Efeitos do estresse crônico variável e tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI na reatividade vascular a agentes vasoativos.....	49
<b>6) DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>7) CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Registros representativos ilustrando a resposta reflexa de bradicardia causada por elevações na pressão arterial e a taquicardia reflexa.....	24
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática ilustrando os parâmetros analisados na curva sigmoide do barorreflexo.....	25
<b>Figura 3.</b> Protocolo experimental para estudo do efeito do estresse crônico variável e do tratamento farmacológico sobre o comportamento no teste de nado forçado e a função cardiovascular.....	30
<b>Figura 4.</b> Protocolo experimental sobre o nível de corticosterona plasmática e a função cardiovascular.....	30
<b>Figura 5.</b> Protocolo experimental do segundo dia de registro cardiovascular.....	31
<b>Figura 6.</b> O tempo de imobilidade no teste de natação forçada (TNF).....	33
<b>Figura 7.</b> O peso corporal nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV).....	35
<b>Figura 8.</b> O peso relativo do coração, glândulas adrenais e do timo; e nível de corticosterona plasmática nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV).....	35
<b>Figura 9.</b> A PAM, PAS, PAD e FC nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV).....	38
<b>Figura 10.</b> Atividade autonômica e FC intrínseca (FCI) nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV).....	40
<b>Figura 11.</b> A análise espectral de potência do intervalo de pulso (IP) nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV).....	41
<b>Figura 12.</b> A análise espectral de potência da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV).....	42
<b>Figura 13.</b> A análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV).....	45
<b>Figura 14.</b> A análise de regressão não linear e linear da atividade do barorreflexo nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV).....	46
<b>Figura 15.</b> Parâmetros derivados da análise de regressão não-linear do barorreflexo nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV).....	47
<b>Figura 16.</b> Parâmetros derivados da análise de regressão linear do barorreflexo nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV).....	48
<b>Figura 17.</b> $\Delta$ PAM evocada por concentrações crescentes de fenilefrina (Fenil), acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS) no grupo controle e estresse crônico variável (ECV).....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Tabela do estresse crônico variável (ECV).....	22
<b>Tabela 2.</b> Peso do coração, adrenal e do timo no grupo controle e estresse crônico variável (ECV).....	36
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros espectrais de intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS), calculados a partir das séries temporais usando a análise espectral de potência auto-regressiva nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV).....	43
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros derivados da análise de regressão não-linear (G, P1, P2, faixa de FC e BP50) e linear ( slope bradicardia e slope taquicardia ) do barorreflexo no controle e estresse crônico variável grupos (CVS).....	51
<b>Tabela 5.</b> Comparação do efeito do tratamento crônico com fluoxetina ou 7-nitroindazole nos parâmetros somáticos, funções fisiológicas e nas respostas comportamentais.....	57

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

AF – Alta frequência

BF – Baixa frequência

BP<sub>50</sub> – Valor da pressão arterial que promove 50% da variação na frequência cardíaca

Ca<sup>+2</sup> – Cálcio

DMSO – Dimetil sulfóxido

ECV – estresse crônico variável

ED<sub>50</sub> – Dose que promove 50% da resposta máxima

E<sub>max</sub> – Resposta máxima

eNOS – Óxido nítrico sintetase endotelial

EPM – Erro padrão da média

FC – Frequência cardíaca

FCI – Frequência cardíaca intrínseca

FLX – Fluoxetina

G – Ganho

GMPc – Guanosina monofosfato cíclico

GTP – Guanosina trifosfato

Hz – Hertz

IP – Intervalo de pulso

ISRS – Inibidores seletivos da recaptção de serotonina

L-NAME – N (G)-nitro-L-arginina éster metílico

NaCl – Solução salina

NMDA – N-metil D-Aspartato

nNOS – Óxido nítrico sintetase neuronal

NO – Óxido nítrico

NPS – Nitroprussiato de sódio

P<sub>1</sub> – Platô mínimo de frequência cardíaca

P<sub>2</sub> – Platô máximo de frequência cardíaca

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM – Pressão arterial média

PAS – Pressão arterial sistólica

PBS – Tampão fosfato salina

Range FC – ΔPressão, batimento por minuto, diferença entre P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub>

SBE – Sensibilidade do barorreflexo espontâneo

7-NI – 7-nitroindazole

$\Delta$ FC – Delta de frequência cardíaca

$\Delta$ PAM – Delta da pressão arterial média

## RESUMO

No presente estudo nós comparamos os efeitos do tratamento crônico com 7-nitroindazole (7-NI) (inibidor preferencial da nNOS) com aqueles evocados pelo antidepressivo convencional fluoxetina sobre as respostas do tipo depressivas (imobilidade no teste de natação forçada (TNF), diminuição do ganho de peso corporal e aumento da corticosterona plasmática) e as alterações cardiovasculares provocadas pelo estresse crônico variável (ECV) em ratos. Para isso, ratos Wistar foram expostos a um protocolo de ECV por 14 dias, e tratados concomitantemente com 7-NI ou fluoxetina. A fluoxetina e o 7-NI impediram o aumento da imobilidade no TNF induzida pelo ECV e reduziu a corticosterona plasmática nos ratos estressados. Ambos os tratamentos também inibiram a redução evocada pelo ECV nas respostas depressoras a agentes vasodilatadores e as mudanças na atividade do barorreflexo. No entanto, nenhum dos tratamentos farmacológicos afetaram a redução do peso corporal induzida pelo ECV. Além disso, a fluoxetina reduziu o ganho de peso nos animais controle. A fluoxetina e o bloqueio da nNOS também induziram alterações cardiovasculares independente da exposição ao estresse, que incluíram: aumento no tônus parassimpático cardíaco, frequência cardíaca intrínseca e modulação simpática vascular; redução da atividade simpática para o coração e da resposta pressora a agentes vasoconstritores e diminuição da atividade do barorreflexo. Estes resultados fornecem evidências de que a fluoxetina e o 7-NI previnem as alterações comportamentais do tipo depressivas e as disfunções cardiovasculares associados ao ECV. Além disso, ambos os tratamentos farmacológicos causaram alterações cardiovasculares independentes de exposição ao estresse, sendo algumas benéficas e outras potencialmente aumentando a vulnerabilidade para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No entanto, a redução de peso corporal induzida pelo tratamento com fluoxetina é especialmente importante, considerando a perda de peso relacionada com a depressão.

Palavras-chave: estresse, depressão, pressão arterial, frequência cardíaca, atividade autonômica, óxido nítrico, comorbidade, serotonina.

## ABSTRACT

Here we compared effects of chronic treatment with the preferential nNOS inhibitor 7-nitroindazole (7-NI) with those evoked by the conventional antidepressant fluoxetine on alterations taken as markers of depression (immobility in the forced swimming test(FST), decreased body weight gain, and increased plasma corticosterone) and cardiovascular changes evoked by the chronic variable stress (CVS) in rats. For this, male rats were exposed to a 14-days CVS protocol while being concurrently treated with either 7-NI or fluoxetine. Fluoxetine and 7-NI prevented increased immobility in the FST induced by CVS and reduced plasma corticosterone in stressed rats. Both treatments also prevented CVS-evoked reduction on depressor response to vasodilator agents and baroreflex changes. Nevertheless, none of pharmacological treatments affected body weight reduction induced by CVS. Furthermore, fluoxetine reduced body weight gain in unstressed animals. Fluoxetine and nNOS blockade also induced cardiovascular changes independent of stress exposure, including increase on cardiac parasympathetic tone, intrinsic heart rate, and vascular sympathetic modulation; reduction in sympathetic activity to the heart and the pressor response to vasoconstrictor agents, and impairment of baroreflex activity. These findings provide evidence that both fluoxetine and 7-NI prevent depression-like behavioural changes and cardiovascular dysfunctions associated with CVS. Furthermore, both pharmacological treatments caused cardiovascular changes that were independent of stress exposure, some being beneficial and other potentially increasing vulnerability to development of cardiovascular diseases. Nevertheless, the body weight reduction induced by fluoxetine treatment is especially important considering the weight loss related to depression.

**Keywords:** stress, depression, blood pressure, heart rate, autonomic activity, nitric oxide, comorbidity, serotonin.

## 1. INTRODUÇÃO

As patologias cardiovasculares e a depressão estão entre as principais doenças incapacitantes no mundo (World Health Organization, 2004; Murray et al., 2012; Vos et al., 2012). Apesar de cada uma destas patologias representarem problemas individuais de saúde pública, estudos epidemiológicos e evidências experimentais indicam extensa comorbidade entre depressão e problemas cardiovasculares (Glassman, 2007; Grippo, 2009). Nestes sentidos, vários estudos tem apontado que sintomas depressivos são fatores de risco para morbidade e mortalidade cardiovascular (Penninx et al., 2001; Wulsin & Singal, 2003; Dauphinot et al., 2012). A associação entre transtornos de humor e complicações cardiovasculares são independentes de fatores de risco cardiovasculares tradicionais (por exemplo: dislipidemia, sedentarismo e obesidade), e tem sido observado em indivíduos com ou sem histórico prévio de patologia cardiovascular (Penninx, 2001; Carney & Freedland, 2003; Wulsin & Singal, 2003). Além da influência de sintomas depressivos na incidência de patologias cardiovasculares, alguns resultados tem sugerido que complicações cardiovasculares também podem aumentar a prevalência de sintomas depressivos (Grippo, 2009; Carney et al., 2003; Van der Kooy et al., 2007), sugerindo que a ligação entre depressão e patologias cardiovasculares seja bidirecional.

Apesar das evidências de comorbidade entre depressão e problemas cardiovasculares, os mecanismos que explicam esta associação ainda são pouco compreendidos. Além disso, uma vez que indivíduos deprimidos apresentam aumento na probabilidade de apresentarem problemas cardiovasculares, é importante considerar tratamentos terapêuticos para a depressão que não tenham efeitos adversos cardiovasculares. No entanto, comprometimento na função cardiovascular tem sido relatado após a exposição aos principais antidepressivos utilizados no tratamento clínico da depressão. Por exemplo, os antidepressivos tricíclicos podem ser seguros para pacientes deprimidos sem histórico de problemas cardiovasculares, mas os efeitos cardioprotóxicos destes fármacos limitam a sua utilização em pacientes deprimidos com histórico de doença cardiovascular (Glassman & Shapiro, 1998). O desenvolvimento de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) ganhou atenção especial devido a uma suposta vantagem destes fármacos sobre os antidepressivos tricíclicos com relação ao perfil de risco cardiovascular (Gram, 1994; Pacher et al., 2004). Entretanto, resultados clínicos e pré-clínicos recentes tem apontado efeitos negativos do ISRS sobre a função cardiovascular (Sheline et al., 1997; Pacher et al., 2004; Dawood et al., 2007; Crestani et al., 2011; Henze et al., 2013). Diante disso, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para o tratamento da depressão que forneçam melhoras no perfil de risco cardiovascular seria claramente vantajoso.



### **1.1 Modelo experimental para avaliar interação entre depressão e função cardiovascular**

É bem estabelecido na literatura que o estresse é o principal fator ambiental capaz de levar a distúrbios depressivos (Kendler et al., 1999; Pittenger & Duman, 2008). Neste sentido, vários testes experimentais que envolvem a exposição de animais de laboratório a situações de estresse vem sendo utilizados como ferramentas experimentais para o estudo da neurobiologia da depressão (Nestler & Hyman, 2010). Um desses modelos, denominado estresse crônico variável, envolve a exposição repetida de roedores a estressores inescapáveis e imprevisíveis, no qual produz várias alterações comportamentais e neurobiológicas que são similares a depressão em humanos (Willner, 1997, 2005; Hill et al., 2012). O foco inicial deste modelo experimental foi a avaliação da anedonia através do teste de consumo e preferência para sacarose/sacarina (Willner et al., 1987). Entretanto, atualmente tem sido investigado os efeitos deste modelo sobre o comportamento em testes que avaliam outras facetas da depressão. Por exemplo, a exposição ao estresse crônico variável aumentou a imobilidade no teste de nado forçado, induziu o desenvolvimento de desamparo aprendido, diminuiu a frequência de comportamentos sexuais e agressivos em roedores machos e diminuiu o comportamento de autolimpeza (“*grooming*”) e a atividade locomotora (Willner, 2005). Todas as alterações comportamentais desencadeadas pelo estresse crônico variável são revertidos após o tratamento com várias classes de fármacos antidepressivos (Willner, 2005).

Resultados recentes tem demonstrado que as respostas comportamentais desencadeados pelo estresse crônico variável são acompanhadas por importantes alterações na função cardiovascular e autonômica, que incluem taquicardia de repouso, elevação no tônus simpático cardíaco, redução na variabilidade da frequência cardíaca, alterações na atividade barorreflexa, resposta cardiovascular exacerbada a estressores ambientais novos (i.e., diferentes daqueles utilizados no protocolo crônico), redução no limiar para arritmias cardíacas e alterações na reatividade vascular a agentes vasoativos (Grippe et al., 2002, 2004, 2008; d'Audiffret et al., 2010; Flak et al., 2011; Isingrini et al., 2011). Estes efeitos cardiovasculares são consistentes com as alterações autonômicas e cardiovasculares observadas na depressão em humanos (Grippe, 2009). Deste modo, tem sido proposto que o estresse crônico variável é um modelo útil para investigar interação entre respostas comportamentais e alterações cardiovasculares (Grippe, 2009).

### **1.2 Óxido nítrico e depressão**

O tratamento farmacológico clínico da depressão baseia-se em fármacos que promovem seu efeito terapêutico através da ação em mecanismos monoaminérgicos no sistema nervoso central. Estes fármacos inibem a recaptção ou o metabolismo de

monoaminas (principalmente serotonina e noradrenalina) ou atuam em seus receptores (Charney, 1998; Hirschfeld, 2000; Lucki & O'Leary, 2004). Estas evidências terapêuticas fundamentaram a hipótese de que o estado depressivo resulte de disfunções no sistema monoaminérgico encefálico (“Teoria Monoaminérgica Clássica da Depressão”) (Charney, 1998; Hirschfeld, 2000; Lucki & O'Leary, 2004). Entretanto, apesar de até o momento esta ainda ser a teoria mais aceita para explicar a neurobiologia da depressão, uma parte dos indivíduos (~40%) não apresentam melhoras do quadro depressivo com o tratamento com fármacos que atuam através de mecanismos monoaminérgicos, mesmo após a combinação de diferentes fármacos (Kessler et al., 2003; Kiss, 2008). Além disso, esta teoria não explica a latência para o aparecimento do efeito antidepressivo (2-3semanas), uma vez que os efeitos farmacológicos sobre mecanismos monoaminérgicos são agudos, e nem o fato de a depleção aguda de monoaminas não induzir quadro depressivo em humanos, apesar de comprometer a resposta ao tratamento farmacológico (Henninger et al., 1996). Deste modo, novas propostas sugerem que outros neurotransmissores e neuromoduladores, como o glutamato e o óxido nítrico, também estão envolvidos na fisiopatologia da depressão e no mecanismo de ação de fármacos antidepressivos (Maeng & Zareta, 2007; Dhir & Kulkarni, 2011).

O óxido nítrico age no sistema nervoso central como uma molécula de sinalização, e tem sido considerado um neurotransmissor atípico (Prast and Philippu, 2001; Garthwaite, 2008). Garthwaite e colaboradores (1988) demonstraram que a ativação de receptores glutamatérgico NMDA em neurônios pós-sinápticos resulta na formação de óxido nítrico, através de um mecanismo dependente de  $Ca^{+2}$ . Deste modo, uma das formas de síntese de óxido nítrico no sistema nervoso central envolve a ativação de receptores NMDA e consequente aumento nas concentrações intracelulares de  $Ca^{+2}$ , o que acarreta a ativação da isoforma neuronal da enzima sintase do óxido nítrico (nNOS) (Garthwaite, 2008). O óxido nítrico possui diversas vias de sinalização, sendo que a principal envolve a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Garthwaite, 2008). O óxido nítrico se difunde rapidamente e modula, principalmente através de mecanismos dependente de GMPc, a função neuronal e a liberação de neurotransmissores, incluindo monoaminas, em numerosas regiões no sistema nervoso central (Prast and Philippu, 2001; Garthwaite, 2008).

Estudos pré-clínicos tem consistentemente demonstrado que o tratamento sistêmico com antagonistas de receptores NMDA possui efeito do tipo antidepressivo (Tokita et al., 2012). Estes resultados fundamentaram a hipótese de um papel do óxido nítrico na neurobiologia da depressão. Neste sentido, estudos clínicos demonstraram que pacientes deprimidos apresentaram aumento nos níveis séricos de metabólitos do óxido nítrico e

aumento na expressão de nNOS no hipocampo (Suzuki et al., 2001; Lee et al., 2006; Oliveira et al., 2008). Dados pré-clínicos tem demonstrado que o tratamento sistêmico com inibidores da síntese de óxido nítrico reduziu o tempo de imobilidade no teste de nado forçado em ratos (Jeferys & Funder, 1996). Este efeito parece ser devido a inibição da isoforma nNOS, uma vez que o tratamento sistêmico com inibidores mais seletivo para esta isoforma também induziu efeito do tipo antidepressivo no teste de nado forçado (Yldiz et al., 2000; Heiberg et al., 2002; Joca & Guimarães, 2006). O tratamento sistêmico com inibidores seletivos da nNOS também suprimiu as alterações comportamentais induzidas pelo estresse crônico variável observadas nos testes de consumo e preferência a sacarose/sacarina, nado forçado e suspensão pela cauda e preveniram a redução no comportamento de autolimpeza, (Zhou et al., 2007; Yazir et al., 2012). A ideia de um envolvimento do óxido nítrico na neurobiologia da depressão é reforçada por dados demonstrando que o bloqueio sistêmico da enzima guanilato ciclase solúvel (principal receptor fisiológico do óxido nítrico) promoveu efeito do tipo antidepressivo em modelos animais de depressão (Heiberg et al., 2002), incluindo o estresse crônico variável (Yazir et al., 2012), além de promover melhora do humor em pacientes deprimidos (Naylor et al., 1987).

Os resultados descritos acima claramente evidenciam um efeito do tipo antidepressivo do tratamento sistêmico com inibidores da nNOS no comportamento de roedores em vários modelos experimentais, incluindo o modelo de estresse crônico variável. Entretanto, nenhum estudo investigou se os efeitos protetores destes fármacos sobre o comportamento são acompanhados por alterações nas consequências cardiovasculares desencadeadas pelo estresse crônico variável.

### **1.3 nNOS e função cardiovascular**

A nNOS é expressa em regiões bulbares e supra-bulbares do sistema nervoso central envolvidas no controle da função cardiovascular, e ações excitatórias e inibitórias do óxido nítrico nestas regiões tem sido relatadas (Zanzinger, 2002; Stern, 2004; Forstermann et al., 2012). Foi demonstrado um envolvimento do óxido nítrico formado a partir da nNOS no sistema nervoso central nas respostas autonômicas observadas durante situações aversivas (Resstel et al., 2008). Além disso, alterações em mecanismos nitrérgicos no sistema nervoso central parecem estar envolvidas na fisiopatologia de complicações cardiovasculares como hipertensão e insuficiência cardíaca (De Wardener, 2001; Patel & Zheng, 2012). Deste modo, mecanismos nitrérgicos no sistema nervoso central desempenham um importante papel no controle da função cardiovascular.

Além da presença no sistema nervoso central, estudos tem identificado a expressão de nNOS em fibras nervosas periféricas que inervam a musculatura lisa e o tecido cardíaco, bem como em células não-neurais como os miócitos cardíaco e esquelético (Kobzik et al., 1994; Danson et al., 2005), células da mácula densa no rim e em células musculares lisas e endoteliais na parede vascular (Boulangier et al., 1998; Danson et al., 2005; Bachetti et al., 2004; Melikian et al., 2009). O óxido nítrico é considerado uma molécula protetora do sistema cardiovascular por meio de suas ações nos vasos sanguíneos e no coração (Lei et al., 2013; Tang et al., 2014). Estudos têm demonstrado um papel do óxido nítrico formado pela nNOS no controle do tônus vascular em alguns leitos vasculares específicos (por exemplo, leitos renais e cutâneos) e na regulação da função cardíaca (Danson et al., 2005; Melikian et al., 2009; Toda & Okamura, 2011; Tang et al., 2014). Além disso, foi demonstrado em indivíduos saudáveis que o tratamento com um inibidor seletivo da nNOS reduziu a resposta vasodilatadora periférica observada durante um protocolo de estresse psicológico (Melikian et al., 2009).

Apesar das evidências de um envolvimento do óxido nítrico formado a partir da nNOS no controle local da função vascular e cardíaca, vários resultados *in vivo*, incluindo alguns de nosso grupo (Camargo et al., 2013), tem demonstrado que o tratamento sistêmico (agudo ou crônico) com inibidores seletivos da nNOS não afeta os parâmetros basais de pressão arterial (Moore et al., 1993; Murakami et al., 1998; Wangenstein et al., 2006; Camargo et al., 2013). Estes resultados contrastam com o efeito hipertensivo, hipertrofia cardíaca e da parede arterial, o aumento da contractilidade vascular, e inibição do relaxamento derivado do endotélio bem descrito na literatura observado após o tratamento sistêmico (agudo ou crônico) com inibidores não-seletivos da síntese de óxido nítrico (por exemplo, L-NAME) (Zatz & Baylis, 1998). Deste modo, a isoforma eNOS parece ter um papel proeminente na manutenção tônica da pressão arterial. Esta ideia é reforçado por dados demonstrando que animais deficientes para a enzima eNOS (eNOS<sup>-/-</sup>) apresentaram pressão arterial e frequência cardíaca elevada, ao passo que a deficiência da nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>) não acarretou em alterações nos parâmetros cardiovasculares basais (Kurihara et al., 1998; Barouch et al., 2002).

Apesar das evidências de ausência de influência da nNOS na manutenção tônica cardiovascular, foi demonstrado que o tratamento com 7-nitroindazole (7-NI) (inibidor preferencial da nNOS) por seis semanas causou hipotrofia cardíaca e vascular (artérias carótida, mesentérica e coronária) e reduziu a eficiência contrátil das artérias aorta e mesentérica *in vitro* (Canayiova et al., 2009; Kristek et al., 2009). Este efeito é oposto ao observado após tratamento crônico com L-NAME (inibidor não-seletivo), no qual a elevação

da pressão arterial e frequência cardíaca decorrente do tratamento repetido com este fármaco é acompanhada de hipertrofia da parede vascular e aumento na resposta contráctil vascular (Zatz & Baylis, 1998). Uma vez que o óxido nítrico (independente da fonte) possui um efeito anti-proliferativo no sistema cardiovascular (Jeremy et al., 1999), é possível que o efeito hipotrófico do 7-NI decorra de uma interação do óxido nítrico oriundo da nNOS com outros sistemas. Neste sentido, foi demonstrado que o óxido nítrico produzido pela nNOS nas células da mácula densa age como um regulador positivo da secreção de renina (Beierwaltes, 1995). De maneira oposta ao óxido nítrico, a angiotensina II tem um potente efeito proliferativo e hipertrófico no sistema cardiovascular (Naftilan, 1992). Além disso, alterações no sistema renina-angiotensina estão envolvidas na patogênese de várias patologias cardiovasculares, e drogas que inibem este sistema são amplamente utilizadas na clínica para tratamento da hipertensão e outras complicações cardiovasculares (Verdecchia et al., 2012). Deste modo, o efeito hipotrófico do 7-NI pode estar associado com uma redução na atividade do sistema renina-angiotensina.

Portanto, os dados apresentados acima indicam que o bloqueio da nNOS interage com mecanismos periféricos associados com a patogênese de complicações cardiovasculares. Além disso, grande parte das estruturas encefálicas envolvidas na neurobiologia da depressão também são importantes no controle autonômico e cardiovascular, o que sugere que alterações em mecanismos nitrérgicos no sistema nervoso central podem ser um mecanismo comum envolvido na etiologia de transtornos de humor e patologias cardiovasculares. Deste modo, no presente estudo nós nos propomos a testar a hipótese de que os efeitos protetores do bloqueio da nNOS sobre as respostas comportamentais induzidas pelo estresse crônico variável são acompanhados de inibição das alterações cardiovasculares observadas neste modelo experimental. Nós também comparamos os efeitos do 7-NI com aqueles desencadeados pelo tratamento com o antidepressivo convencional fluoxetina (inibidor seletivo da receptação de serotonina).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi investigar se o efeito protetor do tratamento com inibidores da nNOS sobre as repostas comportamentais induzidas pelo estresse crônico variável são acompanhados de inibição das alterações cardiovasculares observadas neste modelo. Para tanto, os objetivos específicos são:

- Avaliar o efeito do tratamento com o antidepressivo convencional fluoxetina (inibidor seletivo da receptação de serotonina) e compará-lo com um inibidor preferencial da nNOS (7-NI) sobre a imobilidade no teste de nado forçado, o peso corporal, os parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca, a atividade do barorreflexo, a reatividade vascular, o balanço autonômico cardíaco e o nível de corticosterona plasmática em animais não estressados.
- Investigar o efeito dos mesmos tratamentos acima (fluoxetina e 7-NI) sobre o aumento da imobilidade no teste de nado forçado, as alterações no peso corporal, bem como nas alterações dos parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca, da atividade do barorreflexo, da reatividade vascular, do balanço autonômico cardíaco e do nível de corticosterona plasmática induzidos pelo estresse crônico variável.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar com 200 gramas. 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. O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR/UNESP (Protocolo nº 06/ 2013).

#### 3.2. Estresse crônico variável

O estresse crônico variável, modificado de Marin e colaboradores (2007), foi realizado mediante a exposição diária a diferentes estressores, alternando os estressores, durante 14 dias consecutivos. A Tabela 1 apresenta o protocolo completo do estresse crônico variável. Os animais controle foram mantidos em repouso, exceto no período de limpeza das caixas, no Biotério do Laboratório de Farmacologia da FCFAR/UNESP pelo mesmo período que os animais submetidos aos protocolos de estresse crônico.

**Tabela 1** Protocolo de estresse crônico variável

<b>Dia</b>	<b>Tipo de estresse e cronograma</b>
1	9:00 h <u>estresse de restrição</u> por 2 horas; 18:00 h, <u>serragem úmida</u> durante a noite
2	12:00 h, <u>frio (4°C)</u> por 60 min; 18:00 h, <u>luz acesa</u> durante a noite
3	9:00 h, <u>luz apagada</u> por 3 horas; 17:00 h, <u>labirinto em cruz aberto</u> por 5 minutos
4	08:00 h, <u>serragem úmida</u> durante o dia; 18:00 h, <u>isolamento</u> durante a noite
5	15:00 h, <u>estresse de restrição</u> por 60 min; 18:00 h, <u>privação de alimento/água</u> durante a noite
6	16:00 h, <u>frio (4°C)</u> por 60 min 17:00 h, <u>campo aberto</u> por 5 minutos
7	8:00 h, <u>serragem húmida</u> durante o dia; 18:00 h, <u>luz acesa a noite</u>
8	9:00 h, <u>labirinto aberto</u> por 10 minutos; 15:00 h, <u>luz apagada</u> por 2 horas
9	8:00 h, <u>estresse de restrição</u> por 30 minutos; 18:00 h, <u>isolamento</u> durante a noite
10	9:00 h, <u>campo aberto</u> por 15 minutos; 18:00 h, <u>privação de alimento/água</u> durante a noite
11	10:00 h, <u>frio (4°C)</u> e <u>isolamento</u> por 15 min; 18:00 h, <u>luz acesa a noite</u>
12	8:00 h, <u>estresse de restrição</u> por 60 minutos; 17:00 h, <u>labirinto aberto</u> por 5 minutos
13	8:00 h, <u>serragem húmida</u> durante o dia; 18:00 h, <u>isolamento</u> durante a noite
14	15:00 h, <u>estresse de restrição</u> por 2 horas; 18:00 h, <u>luz acesa</u> durante a noite

### **3.3. Teste de nado forçado**

O teste de nado forçado foi utilizado para avaliar o comportamento do tipo depressivo. Os procedimentos foram semelhantes àqueles inicialmente descritos por Porsolt e colaboradores (1977). Deste modo, os animais foram colocados individualmente num cilindro de plástico (30 cm de diâmetro por 40 centímetros de altura) completo com 30 centímetros de água a  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos (primeira sessão). Em seguida, os animais foram removidos e deixados secar numa gaiola separada antes de regressar às suas gaiolas de origem. Vinte e quatro horas mais tarde, os animais foram novamente colocados no cilindro durante 5 minutos (segunda sessão) (Crestani et al., 2010b). As duas sessões foram gravadas em vídeo e o tempo de imobilidade (definida como a falta de movimento de todo o corpo, exceto pelos pequenos movimentos necessários para a flutuação) foi registrado por um experimentador que desconhecia os grupos experimentais. A água foi trocado entre os animais em ambas as sessões. Estudos mostram que o estresse crônico variável aumenta o tempo de imobilidade, e este efeito é reduzido pelo tratamento com fluoxetina ou 7-NI (Griebel et al., 2002; Zhou et al., 2007; Jankord et al., 2011).

### **3.4. Tratamento farmacológico**

O tratamento farmacológico com fluoxetina (inibidor seletivo da receção de serotonina) ou 7-NI (inibidor preferencial da nNOS) foi realizado por 15 dias consecutivos no mesmo horário (12:00 horas) e coincidiu com o protocolo de estresse crônico variável. A última injeção foi administrada 1 hora antes da primeira sessão do teste de nado forçado. Durante o período de tratamento, os animais receberam uma injeção diária de fluoxetina (10 mg/kg, i.p.) ou 7-NI (30 mg/kg, i.p.). As soluções foram administradas num volume de 1 ml/kg (Yildiz et al., 2006; Grippo et al., 2006; Zhou et al., 2007; Crestani et al., 2011). Tem sido demonstrado que esta dose de 7-NI bloqueia de maneira preferencial a nNOS (Zhou et al., 2007). A fluoxetina foi dissolvida em salina (NaCl 0,9%) + 0,2% de Tween-80 e o 7-NI em salina (NaCl 0,9%) + 20% dimetil sulfóxido (DMSO).

### **3.5. Canulação da artéria e veia femorais**

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol na dose de 250 mg/Kg (i.p.) e foi implantado um cateter na artéria para registro dos parâmetros cardiovasculares e outro na veia femoral para infusão de fármacos. Após implantação dos cateteres, estes foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. Os animais foram mantidos em caixas individuais após a cirurgia. Como medida profilática, após a cirurgia os animais receberam 80.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fontoura-Wyeth,



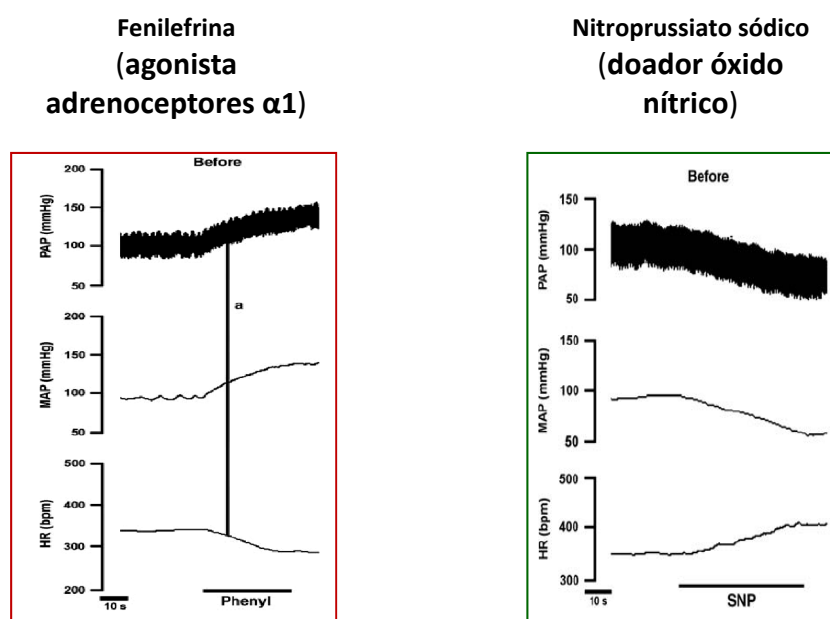
Brasil) aplicados em 0,2 mL (i.m.). Os animais também receberam 2,5 mg/kg (s.c.) do analgésico não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) para analgesia pós-operatória.

### 3.6. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

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

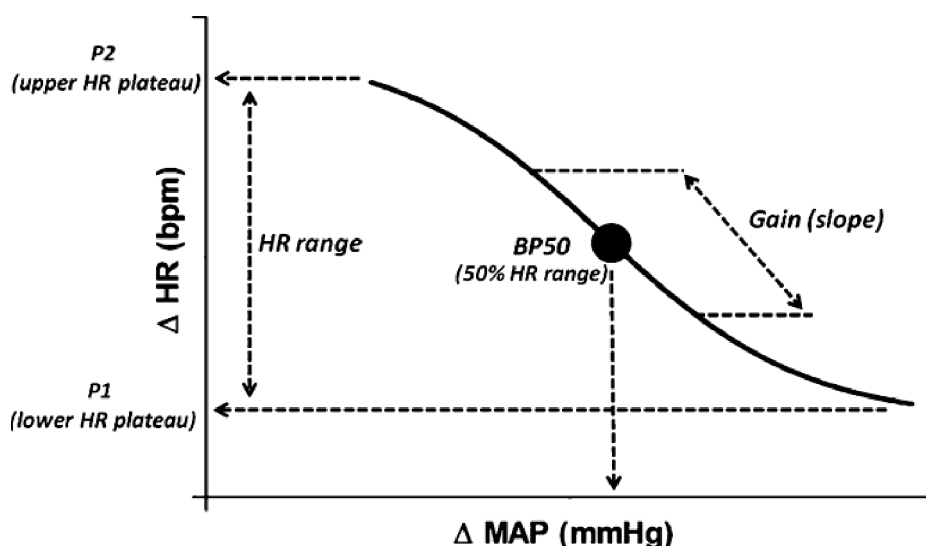
### 3.7. Avaliação da atividade barorreflexa

A atividade do barorreflexo foi avaliada através de alterações na pressão arterial média (PAM) induzidas pela infusão intravenosa de fenilefrina (agonista seletivo dos adrenoreceptores  $\alpha_1$ ) (50 $\mu$ g/mL a 0.32 mL/min/kg) ou de nitroprussiato de sódio (NPS) (doador de óxido nítrico) (70 $\mu$ g/mL a 0.8 mL/min/kg), utilizando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, EUA) (Crestani et al., 2011; Engi et al., 2012). Fenilefrina e NPS causam aumento e redução na pressão arterial, respectivamente.



**Figura 1** – Registros representativos ilustrando a resposta reflexa de bradicardia causada por elevações na pressão arterial (esquerda) e a taquicardia reflexa observada durante reduções na pressão arterial (direita) (modificado de Crestani et al., 2010c). PAP – pressão arterial pulsátil, MAP – pressão arterial média, HR – frequência cardíaca.

A análise foi feita relacionando a variação da PAM (10, 20, 30 e 40 mmHg) 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 (Head & McCarty, 1987; Crestani et al., 2010b). A avaliação da curva sigmóide foi feita com base em cinco parâmetros: 1- platô mínimo da frequência cardíaca ( $P_1$ , bpm); 2- platô máximo da frequência cardíaca ( $P_2$ , bpm); 3- variação da FC ( $\Delta P$ , bpm, diferença entre  $P_1$  e  $P_2$ ); 4- pressão arterial média ( $BP_{50}$ , mmHg, valor de PAM que promove 50% de variação na FC) e 5- Ganho (G, bpm/ mmHg, que é a inclinação média da porção linear entre as curvas 1 e -1 desvios padrões da  $BP_{50}$ ) (Head & McCarty, 1987; Crestani et al., 2010a). 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 na pressão arterial (Crestani et al., 2010b, 2011).



**Figura 2** – Representação esquemática ilustrando os parâmetros analisados na curva sigmoide do barorreflexo (modificado de Crestani et al., 2010b).

A atividade barorreflexa durante as flutuações espontâneas da pressão arterial (sem estímulo farmacológico) também foi avaliada utilizando o método de sequência. Para isso, usando o software Cardioseries v2.4 (disponível no <https://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>), valores de PAS e intervalo de pulso (IP) foram analisadas batimento a batimento para a identificação de quatro valores ou mais de sequência consecutivos em que os aumentos da PAS foram associados ao alongamento do IP (sequência para cima) ou diminuições PAS foram associados com encurtamento do IP (sequência para baixo). Uma sequência do barorreflexo só foi usada quando o coeficiente de

correlação ( $r$ ) entre a PAS e o IP foi maior do que 0,8. A sensibilidade do barorreflexo espontâneo foi avaliada pela inclinação (ms/mmHg) da regressão linear entre a PAS e o IP.

### **3.8. Análise da reatividade vascular**

As alterações na PAM causada pelas concentrações crescentes de fenilefrina (50  $\mu\text{g/mL/kg}$  a 0.34 mL/min), NPS (70  $\mu\text{g/mL/kg}$  a 0.8 mL/min) e acetilcolina (10  $\mu\text{g/mL/kg}$  a 1.2 mL/min) produzida pela infusão intravenosa destes agentes foram utilizadas para gerar curvas dose-resposta (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 foi realizada com base em dois parâmetros: 1- resposta máxima da PAM ( $E_{\text{max}}$ ); 2- Dose que promove 50% da resposta máxima ( $ED_{50}$ ) (Crestani et al., 2011; Engi et al., 2012).

### **3.9. Avaliação da atividade simpática e parassimpática**

A atividade parassimpática e simpática cardíaca, bem como a FC intrínseca, foram avaliadas através da análise do efeito sobre a FC da administração intravenosa de metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) (3 mg/ml/kg) e propranolol (antagonista de adrenoceptores  $\beta$ ) (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 receberam 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 autônomos cardíacos, mas na ordem oposta ao tratamento recebido no dia 1.

A atividade simpática cardíaca foi determinada através da análise da diferença entre a FC basal e a FC após tratamento com propranolol. A atividade parassimpática cardíaca foi determinada através da análise da diferença entre a FC basal e a FC após tratamento com metilatropina. A FC intrínseca foi analisada no dia 1 e no dia 2 após o tratamento combinado com propranolol e metilatropina, e a média das duas medidas foi calculada para cada animal.

A análise espectral de potência da PAS e do intervalo de pulso (IP) também foi empregada para analisar a atividade autonômica que controla os vasos sanguíneos e o coração, respectivamente (Malliani et al., 1991). Para isso, séries temporais de PAS e IP

foram extraídas batimento a batimento do sinal de pressão arterial pulsátil. Usando o software Cardioseries v2.4 (disponível no <https://www.sites.google.com/site/cardioseries/home>), a variabilidade global destas séries foram calculadas no domínio do tempo e da frequência (através da transformação rápida de Fourier). A análise no domínio do tempo consistiu no cálculo da variância durante todo o trecho analisado. Para a análise no domínio da frequência, os componentes oscilatórios foram quantificados em duas faixas de frequência: baixa frequência (BF, 0,20-0,75 Hz) e alta frequência (AF, 0,75-3,0 Hz). Oscilações menores do que 0,20 Hz não foram quantificados. Oscilações da PAS e IP na faixa de BF são representativos dos efeitos moduladores da atividade simpática no controle do tônus vascular e da atividade cardíaca, respectivamente (Malliani et al., 1991). As oscilações de PAS e IP na faixa de AF está associada com uma modulação respiratória e parassimpático dos vasos sanguíneos e do coração, respectivamente (Malliani et al., 1991).

### **3.10. Medição de corticosterona plasmática**

A concentração de corticosterona plasmática foi medida pela técnica de radioimunoensaio. O método foi adaptado daquele descrito anteriormente (Sarnyai et al., 1992). Brevemente, o sangue (200µl) foi colhido pela artéria femoral e armazenado em tubos plásticos com 5µL de heparina. Vinte µl de plasma foram diluídas 50 vezes com 0,01 M PBS e colocada num banho de água a 75°C durante 1 hora para inativação térmica da corticosterona ligada à globulina plasmática. 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 <sup>3</sup>H-corticosterona (New England Nuclear; Boston, MA, EUA) (10.000 – 20.000 cpm/ml) foram adicionados a cada amostra, misturado e incubado a 4°C durante a noite. O carvão revestido com dextrano foi usado para adsorver o esteróide livre após a incubação. Os tubos foram centrifugados a 2000 × g durante 15 min a 4°C, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para frascos de cintilação e a radioatividade foi quantificada por espectrometria de cintilação líquida. As curvas padrão foram construídas utilizando 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 e 2000 pg/100µl de corticosterona (Sigma-Aldrich, EUA). Após diluição, todas as concentrações das amostras de corticosterona foram dentro do intervalo linear da curva padrão. A variação inter- e intra-ensaios foi de 4,1 e 7,1%, respectivamente.

### **3.11. Soluções e drogas**

Cloridrato de propranolol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), metilbrometo de atropina (metilatropina) (Sigma-Aldrich), cloridrato de fenilefrina (Sigma-

Aldrich), nitroprussiato de sódio di-hidratado (Sigma-Aldrich), acetilcolina (Sigma-Aldrich) e tribromoetanol (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em solução salina (0,9% NaCl). A fluoxetina (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) + 0,2% de Tween-80. O 7-NI (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em solução salina + 20% de dimetilsulfóxido (DMSO). Meglumina Flunixin (Banamine ®, Schering-Plough, Cotia, SP, Brasil) e a preparação de poli-antibiótico (Pentabiotico ®, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) foram utilizados como fornecido pelo fabricante.

### **3.12. Análise estatística**

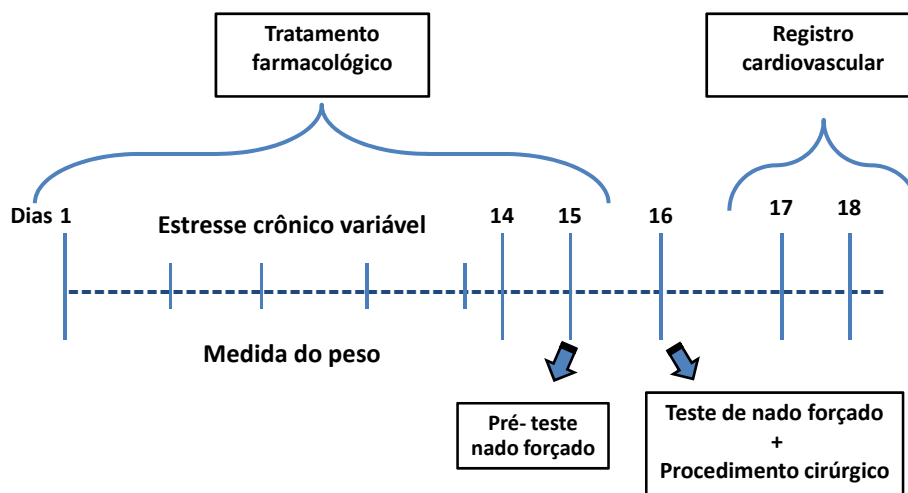
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) através dos programas GraphPad Prism® e Statistica. A análise do peso corporal e da imobilidade durante a primeira sessão do teste de nado forçado foram realizadas utilizando a análise de variância ANOVA trifatorial seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar variações entre os grupos, com estresse (controle vs ECV) e tratamento (veículos, fluoxetina, ou 7-NI) como fatores independentes e tempo como a medida repetida. A análise dos outros parâmetros foi realizada por meio da análise de variância ANOVA bifatorial seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparar variações entre os grupos, com o estresse e tratamento como fatores independentes. Os resultados dos testes estatísticos com  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

#### 4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em oito grupos experimentais:

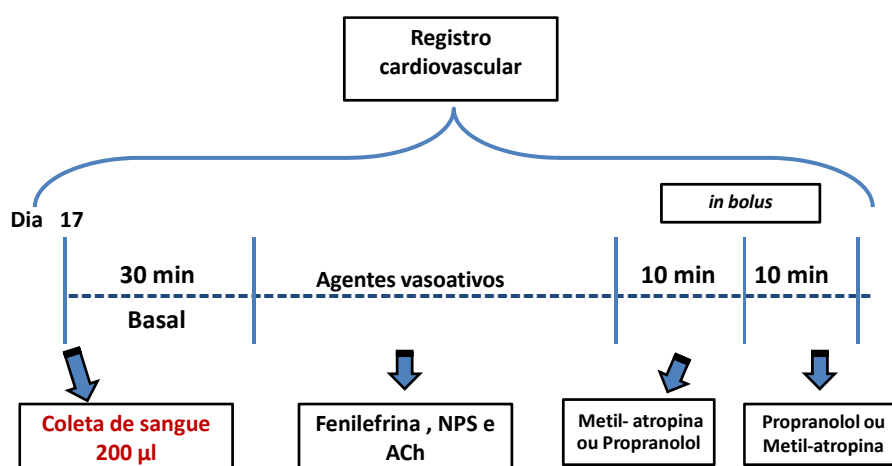
- |                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1) <i>Controle + veí (FLX)</i>  | 5) <i>Estresse + veí (FLX)</i>  |
| 2) <i>Controle + veí (7-NI)</i> | 6) <i>Estresse + veí (7-NI)</i> |
| 3) <i>Controle + FLX</i>        | 7) <i>Estresse + FLX</i>        |
| 4) <i>Controle + 7-NI</i>       | 8) <i>Estresse + 7-NI</i>       |

Os animais dos grupos estresse (grupos 5-8) foram submetidos aos 14 dias do protocolo de estresse crônico variável. No 15<sup>o</sup> dia após o início do protocolo de estresse crônico, foi realizada a última injeção do tratamento farmacológico, e 1 hora após todos os animais foram submetidos a primeira sessão do teste de nado forçado. Vinte e quatro horas após foi realizada a segunda sessão do teste de nado forçado. O procedimento cirúrgico para implantação de cateter na artéria e veia femoral foi realizado após o encerramento da segunda sessão de nado forçado. Vinte e quatro horas após a preparação cirúrgica, 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 do registro cardiovascular. No primeiro dia, foram colhidas amostras de sangue (200 µl) a partir do cateter implantado na artéria femoral para a determinação da concentração de corticosterona plasmática. Em seguida, cada animal foi conectado ao sistema de registro em sua respectiva caixa e foi realizado registro cardiovascular basal por um período de no mínimo 30 minutos. Após este período, foram realizadas infusões randomizadas de fenilefrina, NPS e acetilcolina para determinação da atividade barorreflexa e análise da reatividade vascular a estes agentes vasoativos (Crestani et al., 2011; Engi et al., 2012), como descritos nos itens 3.7 e 3.8. 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 (ver item 3.9). No final das experiências, os animais foram sacrificados por overdose de anestesia (uretana, 2,5 g/kg, ip) e o seu coração, glândulas supra-renais e o timo foram removidos e pesados. A Figura 3 resume todo o protocolo experimental.



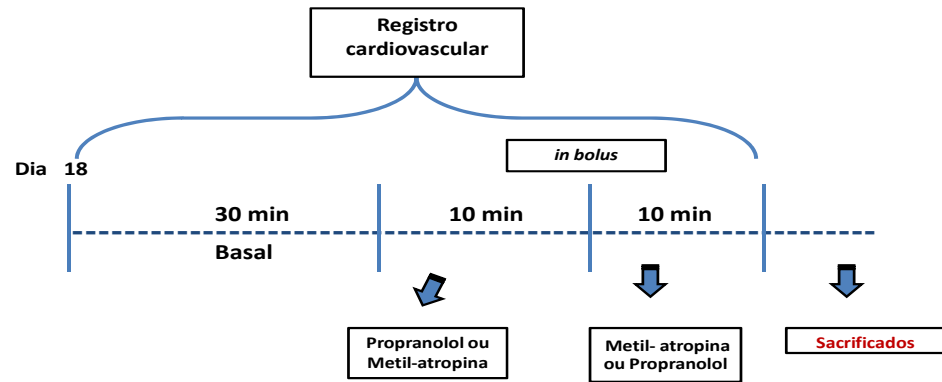
**Figura 3** – Protocolo experimental para estudo do efeito do estresse crônico variável e do tratamento farmacológico com fluoxetina e 7-NI sobre o comportamento no teste de nado forçado e a função cardiovascular.

A Figura 4 resume o primeiro dia do registro cardiovascular.



**Figura 4** – Protocolo experimental para estudo do efeito do estresse crônico variável e do tratamento farmacológico com fluoxetina e 7-NI sobre o nível de corticosterona plasmática e a função cardiovascular.

A Figura 5 resume o segundo dia do registro cardiovascular.



**Figura 5** – Protocolo experimental para estudo do efeito do estresse crônico variável e do tratamento farmacológico com fluoxetina e 7-NI sobre a função cardiovascular.

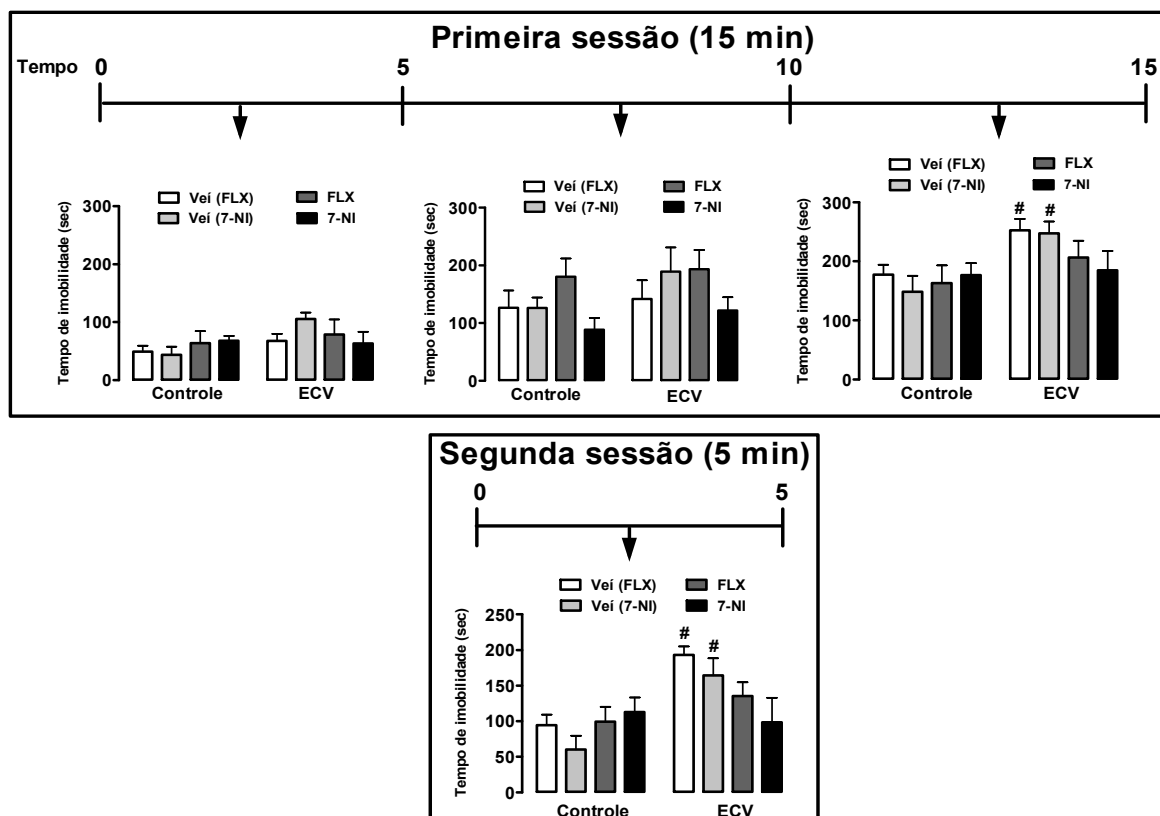


## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efeito do estresse crônico variável e do tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI no comportamento do tipo depressivo.

A análise temporal do tempo de imobilidade a cada 5 min durante a primeira sessão do teste de nado forçado indicou efeito significativo do estresse ( $F_{(1,41)}=7$ ,  $P<0.01$ ) e tempo ( $F_{(2,82)}=83$ ,  $P<0.0001$ ), mas sem a influência do tratamento ( $F_{(3,41)}=1$ ,  $P>0.05$ ). A análise indicou interação do tratamento x tempo ( $F_{(6,82)}=3$ ,  $P<0.004$ ) (Fig. 4). O pós-teste revelou que o estresse crônico variável aumentou o tempo imobilidade nos últimos cinco minutos da sessão nos grupos veículos ( $P<0.05$ ), mas não nos animais tratados com fluoxetina ( $P>0.05$ ) ou 7-NI ( $P>0.05$ ) (Fig. 6).

A análise do tempo de imobilidade durante a segunda sessão do teste de nado forçado indicou efeito do estresse ( $F_{(1,44)}=12$ ,  $P<0.001$ ) e interação estresse x tratamento ( $F_{(3,44)}=4$ ,  $P<0.01$ ), mas sem a influência do tratamento ( $F_{(3,44)}=1$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 6). Análise pós-teste revelou que o ECV aumentou o tempo de imobilidade nos grupos veículos ( $P<0.05$ ), mas não nos animais tratados com fluoxetina ( $P>0.05$ ) ou 7-NI ( $P>0.05$ ) (Fig. 6).



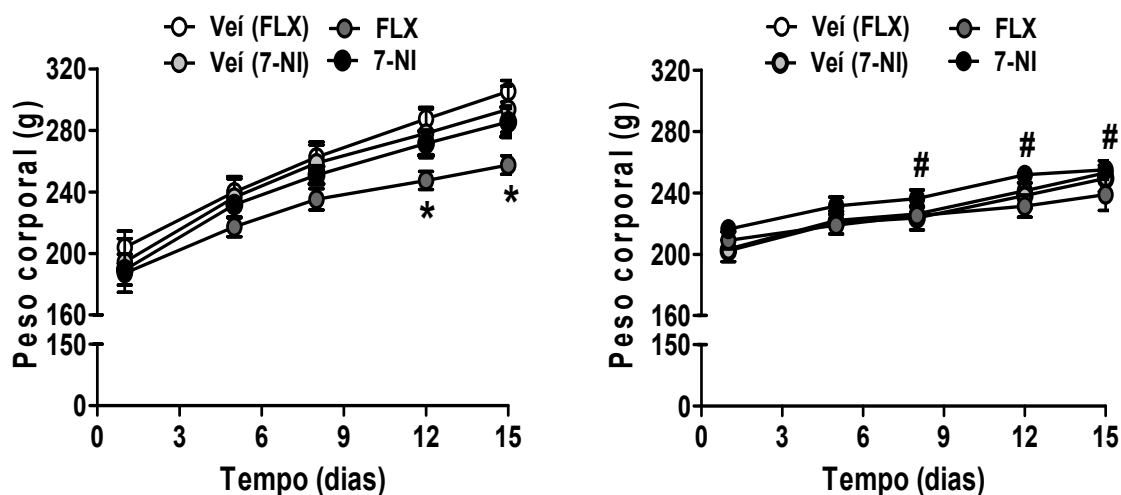
**Figura 6** - Tempo de imobilidade no teste de natação forçada nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina (FLX) (barras cinza escuro), 7-NI (barras pretas) ou respectivos grupos veículos (veí (FLX): barras brancas; veí (7-NI): barras cinza claro). **(Superior)** Tempo total de imobilidade a cada 5 minutos durante a primeira sessão do teste de nado forçado. As barras representam a média  $\pm$  EPM. #  $P < 0,05$  vs respectivo grupo controle. ANOVA trifatorial. **(Inferior)** Tempo de imobilidade total durante a segunda sessão do teste de nado forçado. As barras representam a média  $\pm$  EPM. #  $P < 0,05$  vs respectivo grupo controle. ANOVA bifatorial.

## 5.2. Efeitos do estresse crônico variável e do tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI nos parâmetros somáticos e nos níveis de corticosterona plasmática.

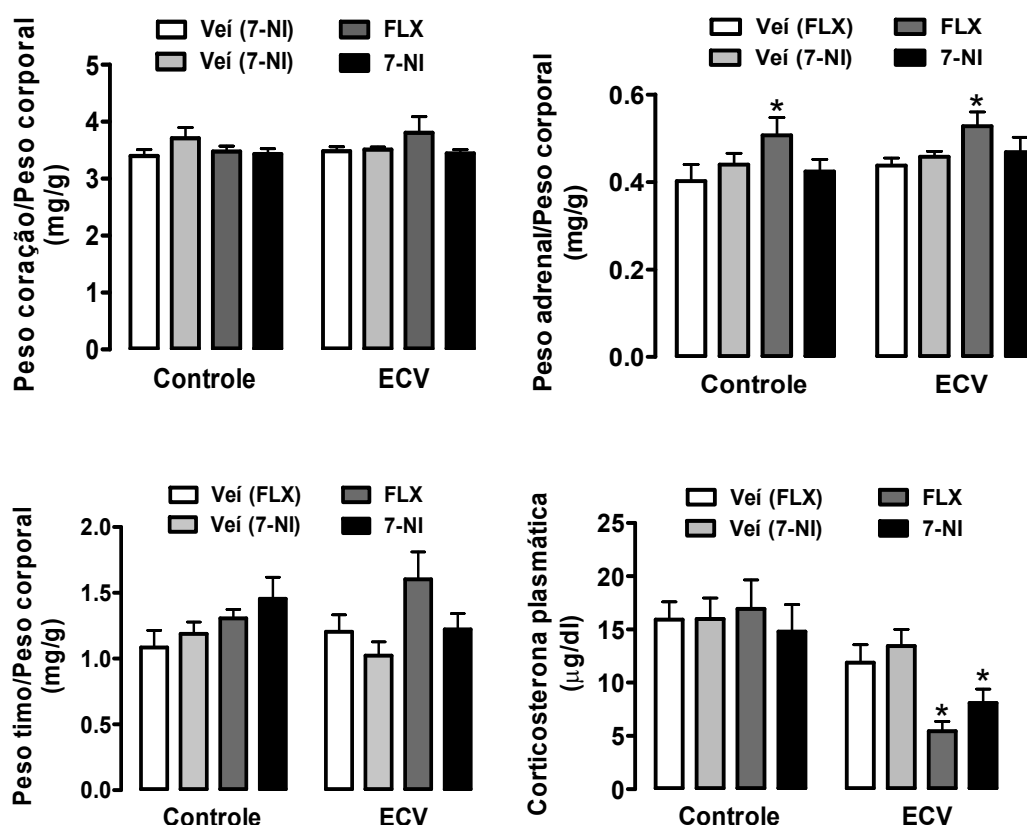
A análise do peso corporal indicou um efeito do estresse ( $F_{(1,44)}=7$ ,  $P<0.01$ ), do tratamento ( $F_{(3,44)}=4$ ,  $P<0.03$ ) e do tempo ( $F_{(4,149)}=208$ ,  $P<0.0001$ ); bem como interação estresse x tempo ( $F_{(4,149)}=32$ ,  $P<0.0001$ ) e tratamento x tempo ( $F_{(4,149)}=2$ ,  $P<0.07$ ) (Fig.7). A análise pós-teste revelou que o tratamento crônico com fluoxetina reduziu o peso corporal nos animais controle a partir no 12° ( $P<0.05$ ) e 15° ( $P<0.05$ ) dias depois do início do experimento (Fig.7). Além disso, o ECV reduziu o ganho do peso corporal nos dias 8, 12 e 15 nos grupos veículo ( $P<0.05$ ) e 7-NI ( $P<0.05$ ), mas não em animais tratados com fluoxetina ( $P>0.05$ ) (Fig.7).

A análise do peso do coração e timo (absoluto e relativo) não indicou efeito do ECV ( $P>0.05$ ) nem dos tratamentos farmacológicos ( $P>0.05$ ) (Fig. 8, Tab. 2). A comparação do peso da adrenal também não indicou efeito do ECV ( $P>0.05$ ) (Fig. 8, Tab. 2). No entanto, o peso relativo da adrenal, mas não os valores absolutos ( $P>0.05$ ), foi aumentado com o tratamento com fluoxetina nos animais do grupo controle ( $P<0.05$ ) e EVC ( $P<0.05$ ) (Fig. 8, Tab. 2).

A análise dos níveis de corticosterona plasmática indicou um efeito principal do estresse ( $F_{(1,44)}=21$ ,  $P<0.0001$ ), mas sem influência do tratamento ( $F_{(3,44)}=1$ ,  $P<0.05$ ) e da interação tratamento x estresse ( $F_{(3,44)}=2$ ,  $P>0.05$ ). Entretanto, a análise pós-teste não mostrou um impacto do ECV nos níveis de corticosterona ( $P>0.05$ ) (Fig.8). No entanto, tanto a fluoxetina ( $P<0.05$ ) e o 7-NI reduziram os níveis de corticosterona plasmática nos animais expostos ao ECV ( $P<0.05$ ) (Fig.8).



**Figura 7** – Peso corporal nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina (FLX) (símbolos cinza escuro), 7-NI (símbolos pretos) ou respectivos veículos (veí (FLX): barras brancas; veí (7-NI): barras cinza claro). Os círculos representam a média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  vs respectivo grupo de veículo na mesma condição, #  $P < 0,05$  vs respectivo grupo controle. ANOVA trifatorial.



**Figura 8** – Peso relativo (peso do órgão/peso corporal) do coração, glândulas adrenais e do timo; e nível de corticosterona plasmática nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina (FLX) (símbolos cinza escuro), 7-NI (símbolos pretos) ou respectivos veículos (veí (FLX): barras brancas; veí (7-NI): barras cinza claro). As barras representam a média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  vs grupo de veículo respectivo no mesmo estado. ANOVA bifatorial.

**Tabela 2** – Peso do coração, adrenal e do timo no grupo controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina, 7-NI ou os respectivos veículos.

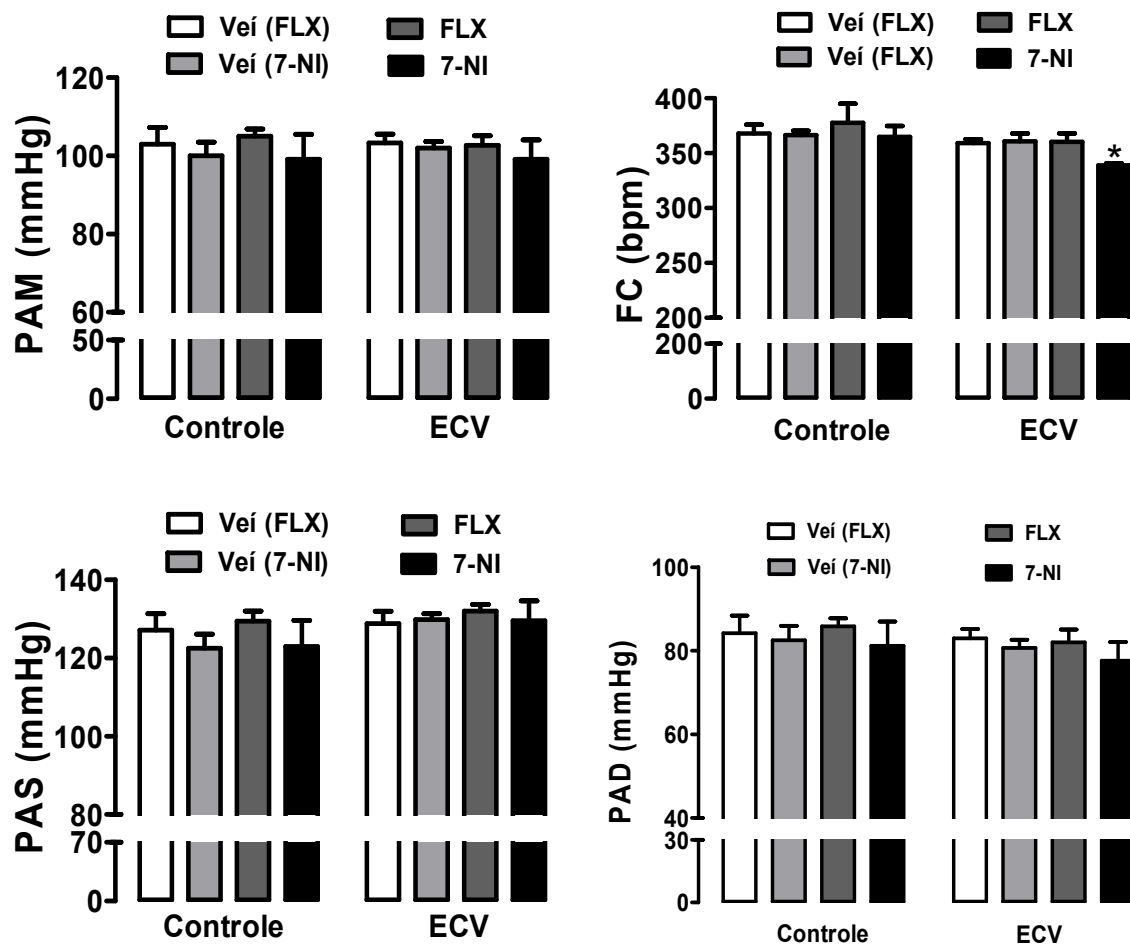
Grupos	n	Coração		Adrenais		Timo	
		Peso absoluto (mg)	Peso relativo <sup>a</sup>	Peso absoluto (mg)	Peso relativo <sup>a</sup>	Peso absoluto (mg)	Peso relativo <sup>a</sup>
<b>Controle</b>							
Veí (FLX)	6	983±51	3.4±0.11	121±13	0.40±0.03	326±42	1.08±0.13
Veí (7-NI)	6	1065±22	3.7±0.18	134±11	0.44±0.02	366±33	1.18±0.09
FLX	7	895±37	3.4±0.09	131±12	0.50±0.03*	337±22	1.30±0.06
7-NI	7	978±39	3.4±0.09	120±5	0.42±0.02	417±54	1.45±0.16
<b>ECV</b>							
Veí (FLX)	6	889±31	3.4±0.07	113±3	0.43±0.01	310±34	1.20±0.12
Veí (7-NI)	6	891±39	3.5±0.04	115±4	0.45±0.01	321±37	1.02±0.10
FLX	7	946±38	3.8±0.28	130±10	0.52±0.03*	400±51	1.60±0.20
7-NI	7	878±25	3.4±0.06	118±7	0.46±0.03	312±33	1.22±0.12
<i>Interação</i>		$F_{(3,44)}=3.35$ $P<0.02$	$F_{(3,44)}=1.33$ $P>0.05$	$F_{(3,44)}=0.39$ $P>0.05$	$F_{(3,44)}=0.07$ $P>0.05$	$F_{(3,44)}=1.56$ $P>0.05$	$F_{(3,44)}=1.83$ $P>0.05$
<i>Estresse</i>		$F_{(1,44)}=9.38$ $P<0.003$	$F_{(1,44)}=0.38$ $P>0.05$	$F_{(1,44)}=1.28$ $P>0.05$	$F_{(1,44)}=1.7$ $P>0.05$	$F_{(1,44)}=0.83$ $P>0.05$	$F_{(1,44)}=0.001$ $P>0.05$
<i>Tratamento</i>		$F_{(3,44)}=0.95$ $P>0.05$	$F_{(3,44)}=1.44$ $P>0.05$	$F_{(3,44)}=0.77$ $P>0.05$	$F_{(3,44)}=3.3$ $P<0.02$	$F_{(3,44)}=0.67$ $P>0.05$	$F_{(3,44)}=3.13$ $P<0.03$

<sup>a</sup> Peso do órgão (mg)/Peso corporal (g).

\*  $P<0.05$  vs respectivo grupo veículo na mesma condição.  
ANOVA bifatorial seguindo pelo pós-teste de Bonferroni.

### **5.3. Efeitos do estresse crônico variável e tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI sobre parâmetros cardiovasculares basais.**

A análise da PAM, PAS e PAS não indicou qualquer efeito tratamento (PAM:  $F_{(3,44)}=0.6$ ,  $P>0.05$ ; PAS:  $F_{(3,44)}=0.5$ ,  $P>0.05$ ; PAD:  $F_{(3,44)}=0.6$ ,  $P>0.05$ ) ou estresse (PAM:  $F_{(1,44)}=0.1$ ,  $P>0.05$ ; PAS:  $F_{(1,44)}=3$ ,  $P>0.05$ ; PAD:  $F_{(1,44)}=1$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 9). A análise da FC indicou efeito do estresse ( $F_{(1,44)}=5$ ,  $P<0.03$ ), mas sem influência do tratamento ( $F_{(3,44)}=1$ ,  $P>0.05$ ) e de interação do tratamento x estresse ( $F_{(3,44)}=0.5$ ,  $P>0.05$ ). A análise pós-teste não revelou um impacto do estresse crônico na FC ( $P>0.05$ ). No entanto, o 7-NI diminuiu a FC nos animais expostos ao ECV ( $P<0.05$ ) (Fig. 9).



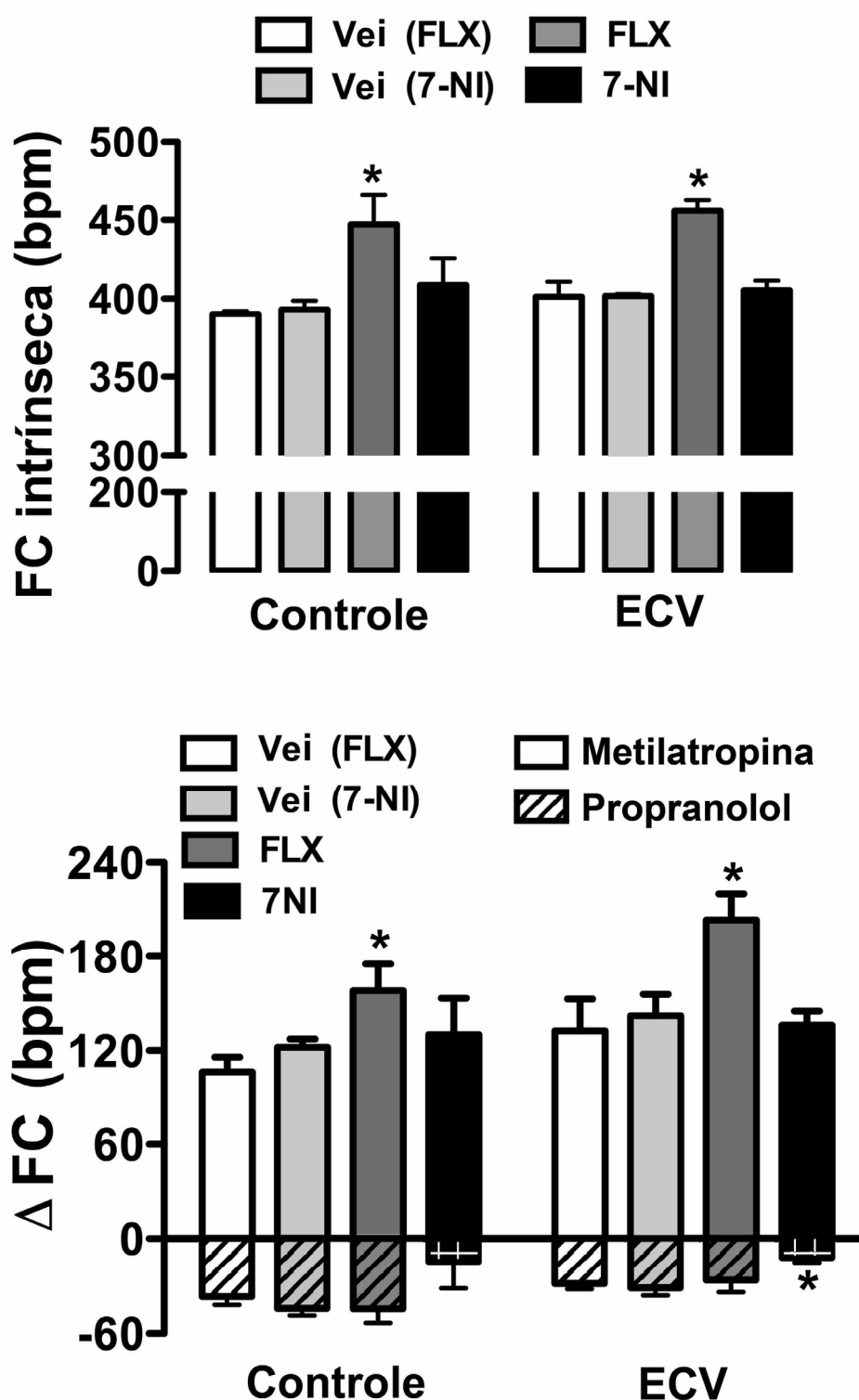
**Figura 9** – A PAM, PAS, PAD e FC nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina (FLX) (barras cinza escuro), 7-NI (barras pretas) ou respectivos veículos (veí (FLX): barras brancas; veí (7-NI): barras cinza claro). As barras representam a média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  vs respectivo grupo na mesma condição. ANOVA bifatorial.

#### 5.4. Efeitos do estresse crônico variável e do tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI na atividade autonômica e FC intrínseca.

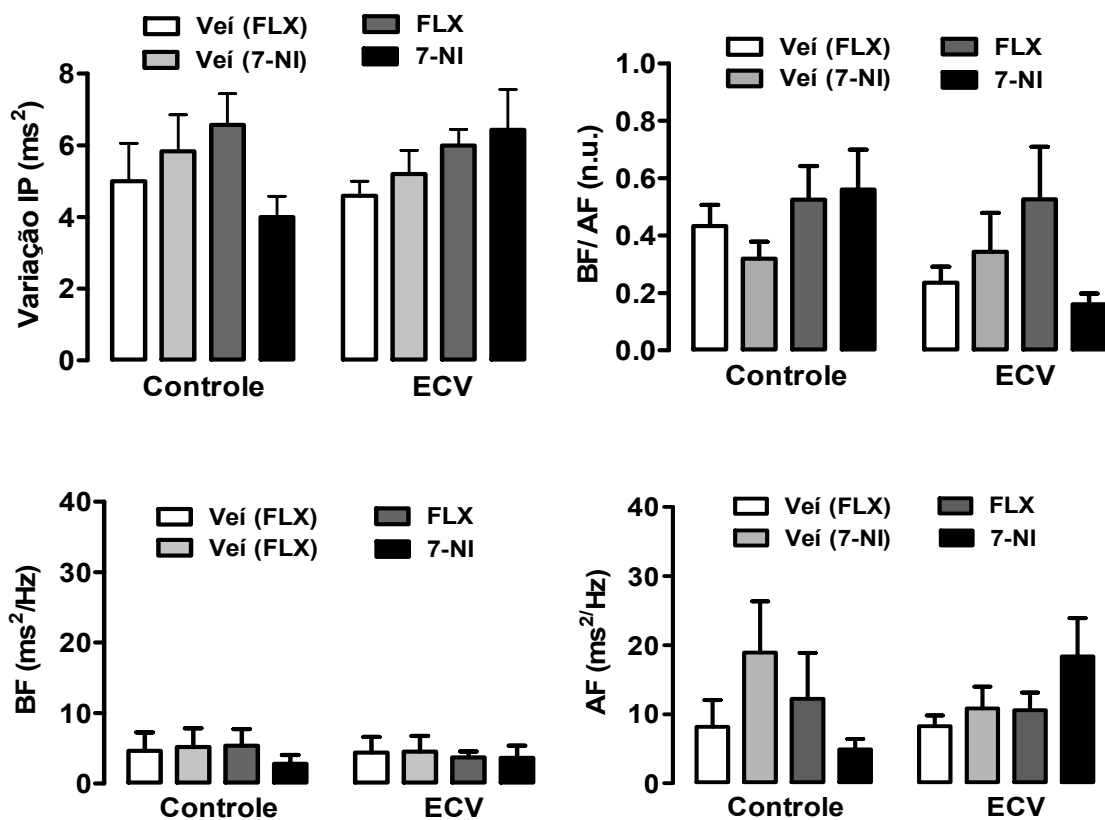
A análise da variação da FC induzida pela administração intravenosa de propranolol (atividade simpática) indicou efeito significativo do tratamento ( $F_{(3,44)}=4$ ,  $P<0.02$ ), mas sem o efeito do estresse ( $F_{(1,44)}=2$ ,  $P>0.05$ ) e interação tratamento x estresse ( $F_{(3,44)}=0.3$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 10). A análise pós-teste mostrou que o 7-NI reduziu a resposta do propranolol nos animais ECV ( $P<0,05$ ) (Fig. 10). A análise da variação da FC induzida pela administração intravenosa de metilatropina (atividade parassimpática) também indicou efeito significativo do tratamento ( $F_{(3,44)}=6$ ,  $P<0.008$ ), mas sem efeito do estresse ( $F_{(1,44)}=4$ ,  $P>0.05$ ) e interação tratamento x estresse ( $F_{(3,44)}=0.5$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 10). A análise pós-teste mostrou que a fluoxetina aumentou a resposta da metilatropina nos animais dos grupos controle ( $P<0,05$ ) e ECV ( $P<0.01$ ) (Fig. 10). A análise dos valores de FC após o tratamento combinado com propranolol e metilatropina (FC intrínseca) mostrou efeito significativo do tratamento ( $F_{(3,44)}=12$ ,  $P<0.0001$ ), mas sem efeito do estresse ( $F_{(1,44)}=0.6$ ,  $P>0.05$ ) e de interação tratamento x estresse ( $F_{(3,44)}=0.2$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 10). A análise pós-teste revelou que o tratamento crônico com fluoxetina aumentou a FC intrínseca nos animais do grupo controle ( $P<0,01$ ) e ECV ( $P<0,01$ ) (Fig. 10).

A análise de variação nas oscilações nas faixas BF e AF do IP não mostrou efeito de qualquer tratamento ( $P>0.05$ ) ou estresse ( $P>0.05$ ) (Fig. 11, Tab. 3). Além disso, a análise da razão BF/AF (um índice do balanço simpático/parassimpático cardíaco) não indicou um impacto do tratamento ( $P>0.05$ ) e estresse ( $P>0.05$ ) (Fig. 11, Tab. 3). No entanto, a fluoxetina aumentou a variância da PAS, tanto nos animais controle ( $P<0.001$ ) e ECV ( $P<0.01$ ) (Fig. 12, Tab. 3). Análise de oscilação na faixa de BF e AF da PAS mostrou que a fluoxetina aumentou a magnitude das oscilações de BF nos animais do grupo controle ( $P<0.01$ ) e ECV ( $P<0.05$ ), ao passo que as oscilações na faixa de AF não foram afetadas pelo ECV ( $P>0.05$ ) ou tratamento ( $P>0.05$ ) (Fig. 12, Tab. 3).

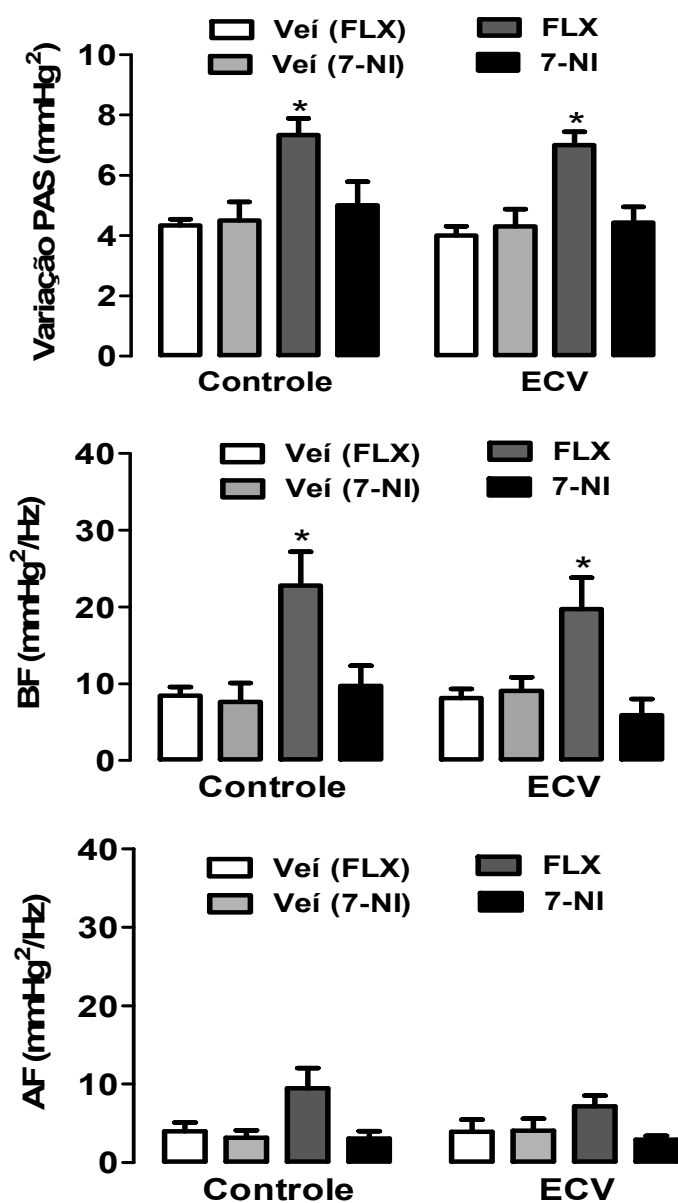




**Figura 10** – Frequência cardíaca intrínseca (FC intrínseca) (gráfico superior) e variação da FC induzida pela administração intravenosa de propranolol (atividade simpática) e metilatropina (atividade parassimpática) (gráfico inferior) nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina (FLX) (barras cinza escuro), 7-NI (barras pretas) ou respectivo veículo (veí (FLX): barras brancas; veí (7-NI): barras cinza claro). (Superior) Valores de FC após tratamento combinado com metilatropina e propranolol (FC intrínseca). (Inferior)  $\Delta$ HR evocada pela administração de metilatropina (valores positivos, barras abertas) ou propranolol (valores negativos, barras hachuradas).



**Figura 11** - Análise espectral de potência do intervalo de pulso (IP) nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina (FLX) (barras cinza escuro), 7-NI (barras pretas) ou respectivo veículo (veí (FLX): barras brancas; veí (7-NI): barras cinza claro). Os gráficos apresentam a variação do intervalo de pulso e oscilação BF/AF (em cima) e oscilação na faixa de BF e AF (parte inferior). As barras representam a média  $\pm$  EPM. ANOVA bifatorial.



**Figura 12** - Análise espectral de potência da pressão arterial sistólica (PAS) nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina (FLX) (barras cinza escuro), 7-NI (barras pretas) ou respectivo veículo (veí (FLX): barras brancas; veí (7-NI): barras cinza claro). Os gráficos apresentam a variação da PAS (em cima), oscilação na faixa de BF (meio) e AF (parte inferior). As barras representam a média  $\pm$ EPM. \*  $P < 0,05$  vs respectivo grupo veículo na mesma condição. ANOVA bifatorial.

**Tabela 3** - Parâmetros da análise espectral do intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS) calculados a partir das séries temporais usando a análise espectral de potência auto-regressiva nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com ou fluoxetina, 7-NI ou respectivo veículos.

Grupos	IP				PAS		
	Variação (ms <sup>2</sup> )	BF (ms <sup>2</sup> /Hz)	AF (ms <sup>2</sup> /Hz)	BF/AF (n.u.)	Variação (ms <sup>2</sup> /Hz)	BF (ms <sup>2</sup> /Hz)	AF (ms <sup>2</sup> /Hz)
<b>Control</b>							
Vei (FLX)	5±1	5±3	9±4	0.4±0.1	4±0.2	8±1	4±1
Vei (7-NI)	6±1	5±3	18±7	0.3±0.1	5±0.6	8±2	3±1
FLX	6±0.8	5±2	12±7	0.5±0.1	7±0.6*	23±4*	9±2
7-NI	4±0.6	3±1	5±1	0.5±0.1	5±0.7	9±3	3±1
<b>ECV</b>							
Vei (FLX)	5±0.4	4±2	8±2	0.3±0.1	4±0.3	8±1	4±2
Vei (7-NI)	5±0.6	5±2	11±3	0.3±0.1	4±0.6	9±2	4±1
FLX	6±0.4	4±1	11±3	0.6±0.2	7±0.5*	20±4*	7±1
7-NI	7±1	4±2	18±6	0.1±0.1	4±0.5	6±2	3±1
<i>Interação</i>	$F_{(3,42)}=1$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=0.1$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=2$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=2$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=0.1$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=0.4$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=0.5$ $P>0.05$
<i>Estresse</i>	$F_{(1,42)}=0.1$ , $P>0.05$	$F_{(1,42)}=0.1$ , $P>0.05$	$F_{(1,42)}=0.1$ , $P>0.05$	$F_{(1,42)}=2$ , $P>0.05$	$F_{(1,42)}=1$ $P>0.05$	$F_{(1,42)}=0.5$ $P>0.05$	$F_{(1,42)}=0.5$ $P>0.05$
<i>Tratamento</i>	$F_{(3,42)}=1$ , $P>0.05$	$F_{(3,42)}=0.3$ , $P>0.05$	$F_{(3,42)}=0.6$ , $P>0.05$	$F_{(3,42)}=1$ , $P>0.05$	$F_{(3,42)}=12$ , $P<0.0001$	$F_{(3,42)}=11$ $P<0.0001$	$F_{(3,42)}=6$ $P<0.001$

Valores expressos como média ± (EPM).

\*  $P<0.05$  vs respectivo grupo veículo na mesma condição.

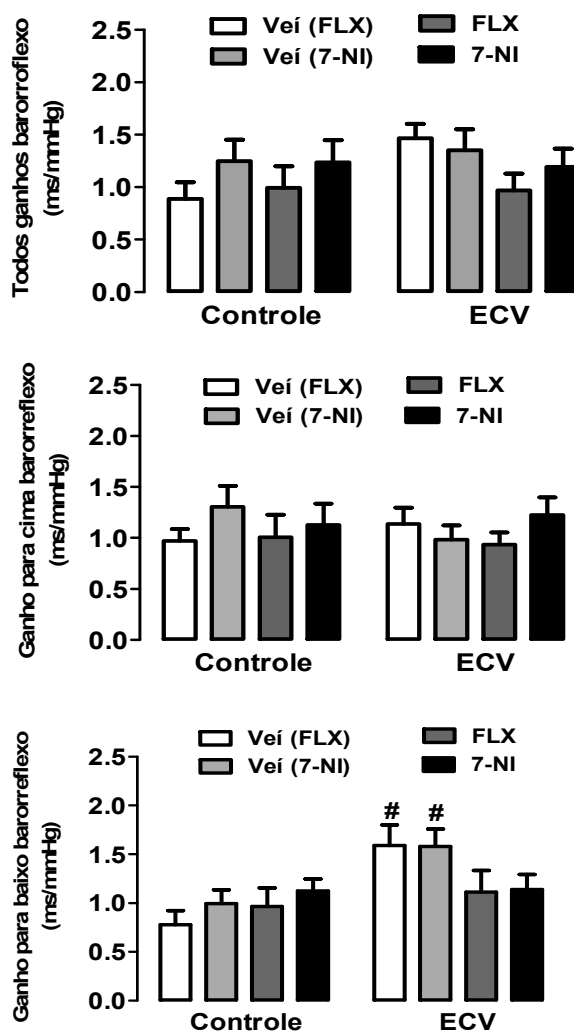
ANOVA bifatorial seguindo pelo pós-teste de Bonferroni.

### 5.5. Efeitos do estresse crônico variável e do tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI sobre a atividade do barorreflexo.

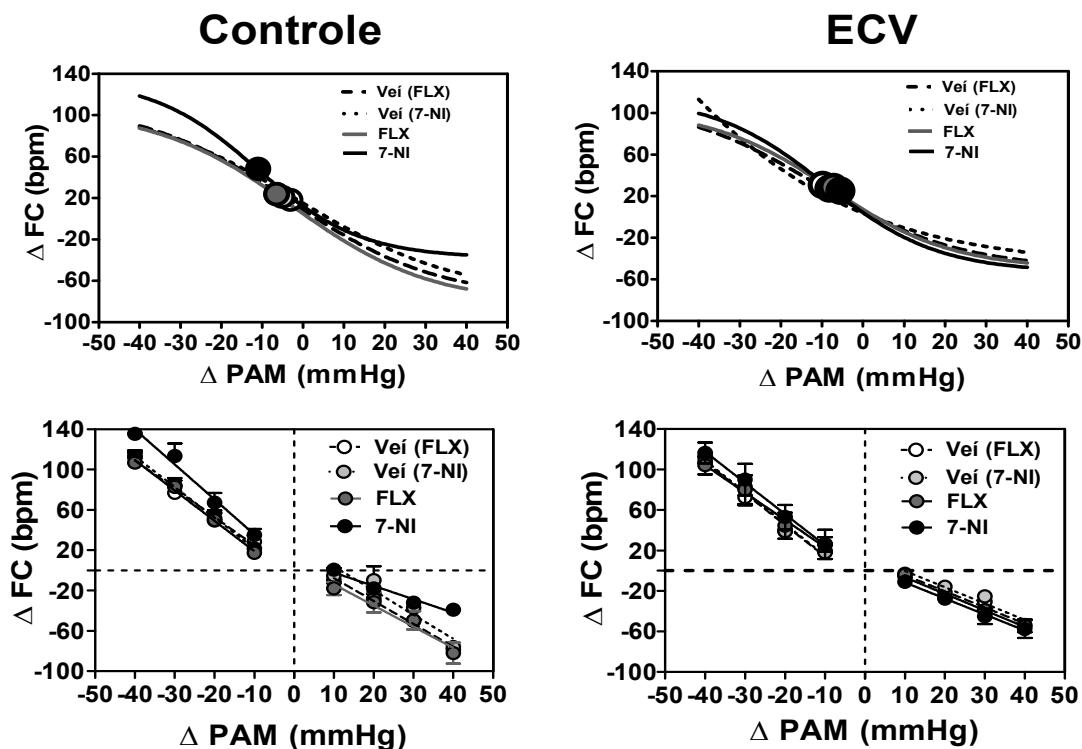
A atividade do barorreflexo avaliada pela técnica de análise de sequência não indicou efeito do estresse (para cima:  $F_{(1,40)}=0.1$ ,  $P>0.05$ ; no total:  $F_{(1,40)}=1$ ,  $P>0.05$ ) nem do tratamento (para cima:  $F_{(3,40)}=0.6$ ,  $P>0.05$ ; no total:  $F_{(3,40)}=1$ ,  $P>0.05$ ) na inclinação das sequências para cima e na média de todos os ganhos (média dos valores das inclinações das sequências para cima e para baixo) (Fig. 13). No entanto, a análise do ganho de sequências para baixo mostrou efeito do estresse ( $F_{(1,40)}=10$ ,  $P<0.003$ ), mas sem a influência do tratamento ( $F_{(3,40)}=0.7$ ,  $P>0.05$ ) e de interação tratamento x estresse ( $F_{(3,40)}=2$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 13). A análise pós-teste mostrou que o ECV aumentou a inclinação de sequências para baixo ( $P<0.05$ ) nos grupos veículo, mas não em animais tratados com fluoxetina ( $P>0.05$ ) ou 7-NI ( $P>0.05$ ) (Fig. 13).

Os resultados da análise de regressão não-linear e linear da atividade do barorreflexo são apresentados nas figuras 14, 15 e 16. A análise não-linear da atividade do barorreflexo mostrou que o ECV reduziu o  $P_1$  ( $P<0.05$ ), variação da FC ( $P<0.05$ ) e a  $BP_{50}$  ( $P<0.05$ ), e reduziu o G ( $P<0.05$ ) nos grupos veículo. A redução evocada pelo ECV no  $P_1$  ( $P<0.05$ ) e na variação da FC ( $P<0.05$ ) também foi detectada nos animais tratados com fluoxetina. O tratamento crônico com 7-NI aumentou o G ( $P<0.05$ ) e o  $P_2$  ( $P<0.05$ ) e reduziu o  $P_1$  ( $P<0.001$ ) e a  $BP_{50}$  ( $P<0.05$ ) nos animais controle. Além disso, 7-NI aumentou o G ( $P<0.001$ ) nos animais submetidos ao ECV, e os valores de  $P_2$  nos animais exposto ao ECV tratados com 7-NI foi reduzido quando comparado com o respectivo grupo controle ( $P<0.05$ ).

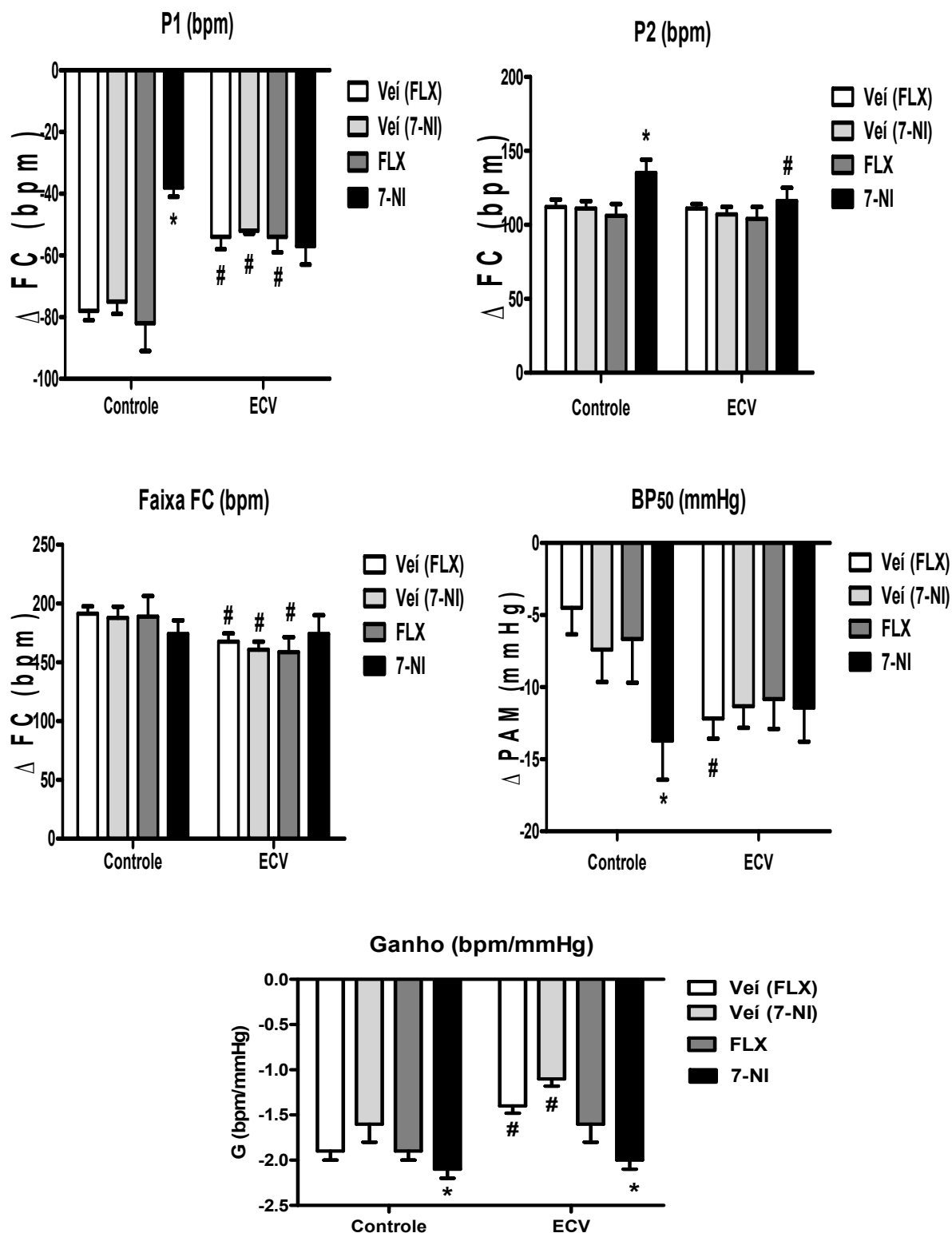
O efeito de aumento ou diminuição da PAM sobre a FC foi também analisada separadamente por meio da regressão linear. O ECV reduziu a resposta de bradicardia nos grupos veículo ( $P<0.05$ ), mas não nos animais tratados com fluoxetina ( $P>0.05$ ) e 7-NI ( $P>0.05$ ). Além disso, o tratamento crônico com 7-NI reduziu a bradicardia reflexa nos animais do grupo controle ( $P<0.01$ ). A análise da resposta de taquicardia reflexa não mostrou efeito do ECV ( $P>0.05$ ) ou dos tratamentos farmacológicos ( $P>0.05$ ).



**Figura 13** – Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo (SBE) nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina (barras cinza escuro), 7-NI (barras pretas) ou respectivos veículos (veí (FLX): barras brancas; veí (7-NI): barras cinza claro). A sensibilidade do barorreflexo espontâneo foi determinada pela técnica de análise de sequência. Os gráficos apresentam a média de todas as inclinações (barorreflexo todos os ganhos, sequências de inclinações para cima e para baixo) (Superior) e as inclinações para baixo (barorreflexo ganho para cima, gráfico do meio) e sequências para baixo (barorreflexo ganho para baixo, gráfico inferior). As barras representam a média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  vs respectivo grupo controle. ANOVA bifatorial.

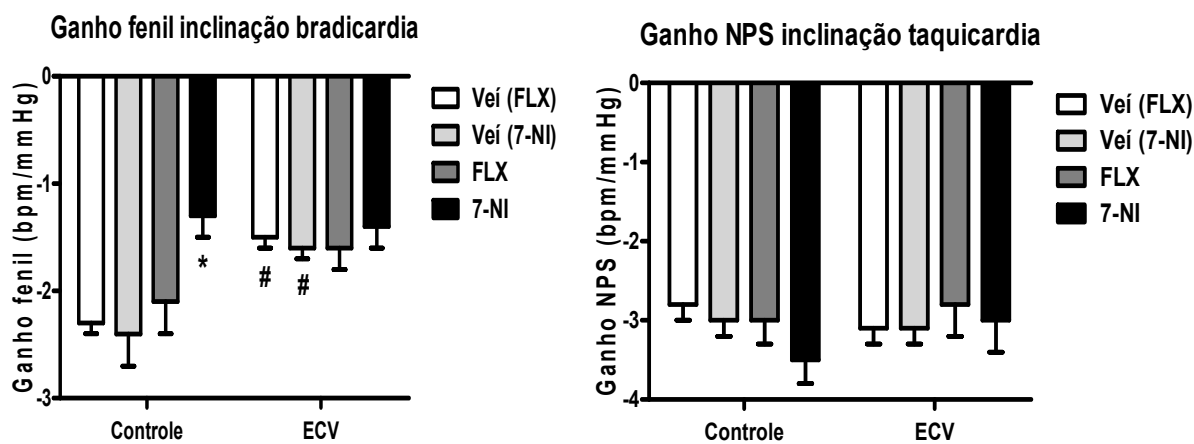


**Figura 14** – Análise de regressão não-linear e linear da atividade do barorreflexo nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina (FLX) (barras cinza escuro), 7-NI (barras pretas) ou respectivos veículos (veí (FLX): barras brancas; veí (7-NI): barras cinza claro). A análise de regressão não-linear (Superior) e linear (Inferior) do barorreflexo realizada correlacionando  $\Delta PAM$  evocadas por infusão intravenosa de fenilefrina e de NPS e a resposta reflexa FC ( $\Delta FC$ ). Símbolos nas curvas sigmóides indicam a  $BP_{50}$ .



**Figura 15** - Parâmetros derivados da análise de regressão não-linear do barorreflexo nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina (FLX) (barras cinza escuro), 7-NI (barras pretas) ou respectivos veículos (veí (FLX): barras brancas; veí (7-NI): barras cinza claro). \* $P < 0.05$  vs respectivo grupo veículo na mesma condição. # $P < 0.05$  vs respectivo grupo controle. ANOVA bifatorial seguido pelo pós-teste de Bonferroni.





**Figura 16** - Parâmetros derivados da análise de regressão linear do barorreflexo nos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina (FLX) (barras cinza escuro), 7-NI (barras pretas) ou respectivos veículos (veí (FLX): barras brancas; veí (7-NI): barras cinza claro). \* $P < 0.05$  vs respectivo grupo veículo na mesma condição. # $P < 0.05$  vs respectivo grupo controle. ANOVA bifatorial seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

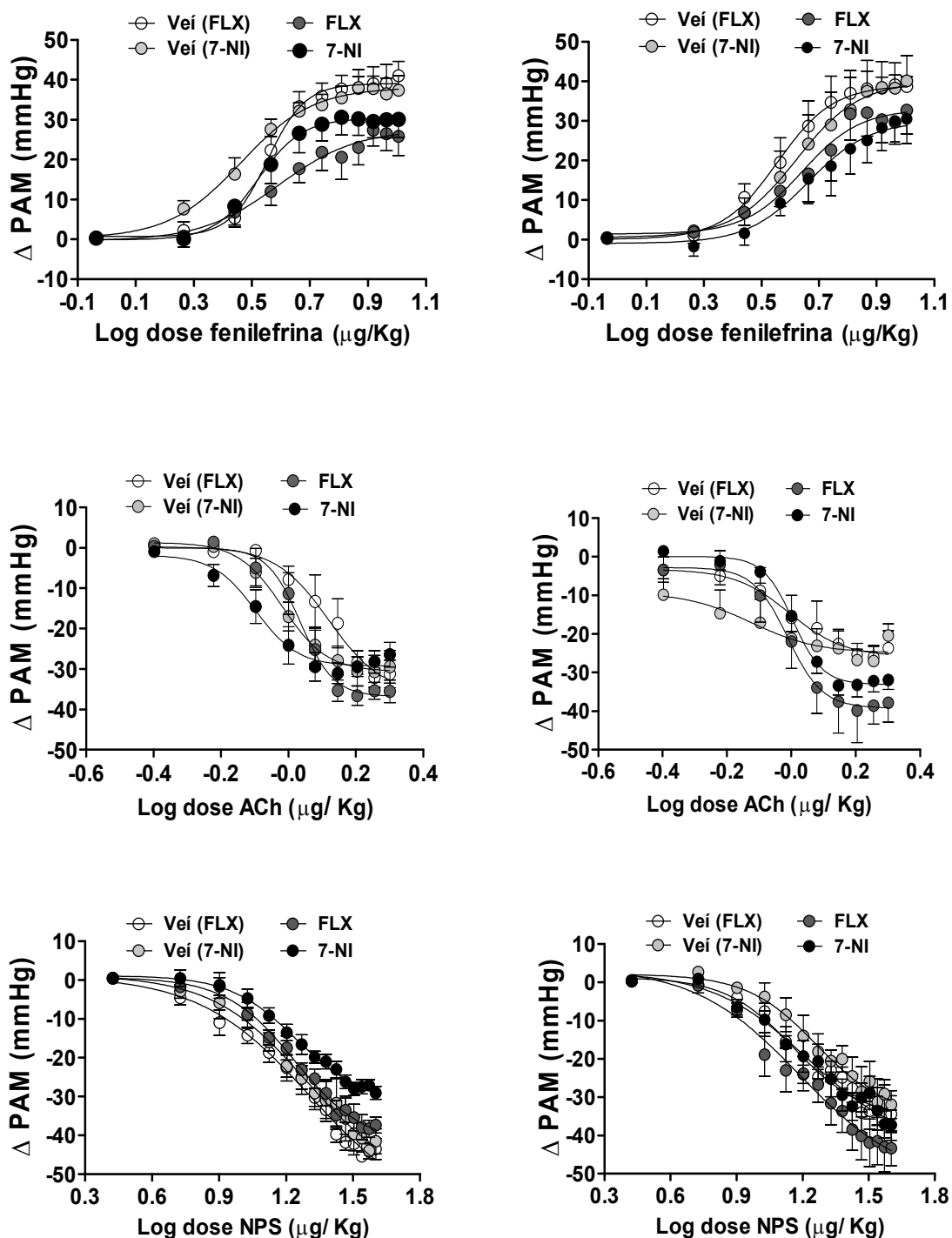
## **5.6. Efeitos do estresse crônico variável e do tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI na reatividade vascular a agentes vasoativos.**

Os resultados de reatividade vascular aos agentes vasoativos são apresentados na Figura 17 e na Tabela 4.

**Fenilefrina** – A análise da resposta pressora evocada pela infusão intravenosa de fenilefrina (agonista seletivo do adrenoceptor  $\alpha_1$ ) não indicou o efeito do ECV ( $P > 0.05$ ). No entanto, tanto a fluoxetina ( $P < 0.01$ ) quanto o 7-NI ( $P < 0.05$ ) reduziram a  $E_{max}$  da curva dose-resposta nos grupos controle.

**Acetilcolina** – A análise da resposta depressora evocada pela infusão intravenosa de acetilcolina indicou que o ECV reduziu a  $E_{max}$  da curva dose-resposta nos grupos veículo ( $P < 0.05$ ). O tratamento com fluoxetina ( $P < 0.01$ ) ou 7-NI ( $P < 0.01$ ) aumentou a  $E_{max}$  nos animais de exposto ao ECV.

**Nitroprussiato de sódio** – A análise da resposta depressora evocada pela infusão intravenosa de NPS (doador de óxido nítrico) mostrou que o ECV reduziu a  $E_{max}$  da curva dose-resposta nos grupos veículos ( $P < 0.05$ ). O tratamento crônico com fluoxetina aumentou a  $E_{max}$  nos animais exposto ao ECV ( $P < 0.01$ ).



**Figura 17** – Variação da PAM ( $\Delta$ PAM) evocada pela infusão de concentrações crescentes de fenilefrina (Fenil, superior), acetilcolina (ACh, meio) e nitroprussiato de sódio (NPS, inferior) no grupo controle (esquerda) e estresse crônico variável (ECV) (à direita) tratados diariamente por 15 dias consecutivos com fluoxetina (FLX) (círculos cinza escuro), 7-NI (círculos pretos) ou respectivos veículos (veí (FLX): barras brancas; veí (7-NI): barras cinza claro). Os círculos representam a média  $\pm$  EPM.

**Tabela 4** - Efeito máximo (E<sub>max</sub>) e dose no 50% da variação de PAM (ED<sub>50</sub>) das curvas dose-resposta de fenilefrina (fenil), acetilcolina (ACh), e de nitroprussiato de sódio (NPS) dos grupos controle e estresse crônico variável (ECV) tratados durante 15 dias consecutivos com fluoxetina, 7-NI, ou respectivos veículos.

Grupos	Fenil		ACh		NPS	
	ED <sub>50</sub>	E <sub>max</sub>	ED <sub>50</sub>	E <sub>max</sub>	ED <sub>50</sub>	E <sub>max</sub>
<b>Controle</b>						
Veí (FLX)	0.56±0.02	41±3	0.10±0.03	-32±3	1.17±0.04	-44±2
Veí (7-NI)	0.44±0.05	37±3	-0.01±0.04	-30±3	1.22±0.06	-42±3
FLX	0.55±0.07	25±4*	0.02±0.02	-35±2	1.20±0.03	-38±2
7-NI	0.53±0.05	28±3*	-0.11±0.05	-27±3	1.19±0.06	-30±2*
<b>ECV</b>						
Veí (FLX)	0.57±0.05	39±2	-0.08±0.10	-23±2 <sup>#</sup>	1.16±0.03	-34±3 <sup>#</sup>
Veí (7-NI)	0.63±0.07	40±5	0.11±0.09	-20±3 <sup>#</sup>	1.24±0.06	-31±3 <sup>#</sup>
FLX	0.56±0.07	32±5	-0.001±0.06	-38±4*	1.14±0.05	-44±4*
7-NI	0.67±0.07	31±3	0.004±0.03	-33±2*	1.19±0.05	-38±3
<i>Interação</i>	$F_{(3,42)}=1$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=0.5$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=2$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=4$ $P<0.01$	$F_{(3,42)}=0.2$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=8$ $P<0.003$
<i>Estresse</i>	$F_{(1,42)}=4$ $P<0.05$	$F_{(1,42)}=1$ $P>0.05$	$F_{(1,42)}=2$ $P>0.05$	$F_{(1,42)}=2$ $P>0.05$	$F_{(1,42)}=0.1$ $P>0.05$	$F_{(1,42)}=1$ $P>0.05$
<i>Tratamento</i>	$F_{(3,42)}=0.5$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=6$ $P<0.003$	$F_{(3,42)}=1$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=6$ $P<0.002$	$F_{(3,42)}=0.6$ $P>0.05$	$F_{(3,42)}=3$ $P<0.04$

Valores expressos como média ± (EPM).

\* $P<0.05$  vs respectivo grupo veículo na mesma condição. <sup>#</sup> $P<0.05$  vs respectivo grupo controle.

ANOVA bifatorial seguindo pelo pós-teste de Bonferroni.

## 6. DISCUSSÃO

Dada a extensa comorbidade entre depressão e doenças cardiovasculares (Glassman, 2007) é relevante o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos para depressão que não prejudicam a função cardiovascular. Os modelos animais de depressão têm se baseado na observação de que o estresse é um importante fator de risco para o desenvolvimento de transtornos do humor (Nestler et al., 2010). Deste modo, o ECV tem sido descrito como um modelo para o estudo da depressão (Willner, 2005; Nestler et al., 2010). Além disso, com base em inúmeras alterações cardiovasculares e autonômicas evocadas pelo ECV, foi proposto que esse modelo pré-clínico é válido e confiável para estudar a associação entre transtornos de humor e doenças cardiovasculares (Grippo, 2009). Assim, o presente estudo fornece a primeira evidência de que a prevenção das alterações comportamentais do tipo depressiva evocado pelo ECV com o tratamento crônico com 7-NI (inibidor preferencial da nNOS) é acompanhada por alterações cardiovasculares e autonômicas relevantes, que são comparáveis àquelas evocadas pelo tratamento crônico com o antidepressivo convencional fluoxetina.

Para avaliar o estado tipo depressivo, foi avaliado uma série de alterações frequentemente utilizados como marcadores de depressão em roedores, incluindo: imobilidade no teste de nado forçado, diminuição do ganho de peso corporal e o aumento dos níveis de corticosterona plasmática (Willner, 2005; Pariante et al., 2008; Yazir et al., 2012). Deste modo, o ECV aumentou o tempo imobilidade no teste de nado forçado e reduziu o ganho de peso corporal, o que está em consonância com estudos anteriores (Willner, 2005; Yazir et al., 2012). O tratamento crônico com 7-NI preveniu as alterações comportamentais no teste de nado forçado, e o efeito foi comparável àquele observado após o tratamento com o antidepressivo de referência fluoxetina. A supressão do aumento do tempo de imobilidade no teste de nado forçado após o tratamento crônico com 7-NI corroboram com estudos anteriores que demonstram que as mudanças comportamentais do tipo depressivas após a exposição ao ECV foram inibidas tanto em camundongos deficientes do gene da nNOS (nNOS<sup>-/-</sup>) quanto em roedores cronicamente tratados com inibidores da nNOS (Zhou et al., 2007; Mutlu et al., 2009; Yazir et al., 2012). No entanto, o 7-NI, assim como a fluoxetina, não bloquearam as alterações no peso corporal. Foi demonstrado que o tratamento com 7-NI durante 7 dias reverteu os efeitos do ECV sobre o peso corporal quatro semanas após o final do tratamento, mas não 24 horas ou duas semanas após o término do tratamento (Zhou et al., 2007), indicando que a ação do 7-NI sobre o peso corporal é tardia. Aumento do nível de corticosterona plasmática não tem sido observado de forma consistente em estudos

envolvendo o ECV (Grippe et al., 2005; Flak et al., 2011), o que suporta os nossos achados no presente estudo.

As alterações do tipo depressivas induzidas pelo ECV foi seguido por alterações cardiovasculares específicas. O ECV reduziu as respostas depressoras dos agentes vasodilatadores acetilcolina e NPS. Estes resultados corroboram com estudos anteriores *in vitro* demonstrando diminuição das respostas vasorrelaxantes em anéis de aorta após a exposição ao ECV (d'Audiffret et al., 2010; Isingrini et al., 2011), e também são consistentes com a demonstração de disfunção endotelial em pacientes deprimidos (Rajagopalan et al., 2001). Observamos também mudanças na atividade do barorreflexo após a exposição ECV. Este resultado está de acordo com estudos anteriores que relatam que as mudanças comportamentais evocadas pelo ECV são seguidas por alterações na função do barorreflexo (Grippe et al., 2008), bem como com evidência clínica em pacientes deprimidos (Broadley et al., 2005). Corroborando com resultados anteriores (Grippe et al., 2002; Bouzinova et al., 2012), o ECV não afetou a pressão arterial. No entanto, relatos anteriores descreveram uma taquicardia de repouso e uma mudança no balanço simpátovagal cardíaco em direção à predominância do simpático após a exposição ao ECV (Grippe et al., 2002; Bouzinova et al., 2012), o que contrasta com a ausência de mudanças da FC e atividade autonômica observadas no presente estudo. No entanto, alterações da FC foram observadas após exposição a protocolos de ECV de maior duração (4-8 semanas) do que os usados neste estudo (2 semanas) (Grippe et al., 2002; Bouzinova et al., 2012).

Inesperadamente, a técnica de análise de sequência e a abordagem farmacológica clássica identificaram diferentes impactos do ECV sobre a atividade do barorreflexo. Embora a sensibilidade do barorreflexo espontâneo indicasse que o ECV aumentou a inclinação de sequências para baixo, o ECV reduziu a bradicardia reflexa ao aumento da pressão arterial causada pela infusão de fenilefrina. Foi demonstrado que a ablação aguda de regiões específicas do sistema nervoso central afeta diferentemente as respostas do barorreflexo avaliadas pela abordagem farmacológica clássica e a técnica de análise de sequências (Crestani et al., 2010a; De Andrade et al., 2014). Portanto, diferenças nos circuitos neurais envolvidos nas respostas reflexas durante a estreita faixa de variações fisiológicas da pressão arterial e durante as alterações de pressão arteriais mais pronunciadas poderiam explicar o impacto específico do ECV sobre a atividade do barorreflexo. Esta ideia é suportado por nossos achados demonstrando que embora o tratamento crônico com fluoxetina ou 7-NI aboliram as mudanças evocadas pelo ECV na sensibilidade do barorreflexo espontâneo, as alterações nas respostas observadas utilizando a abordagem

farmacológica de avaliação barorreflexa não foram afetados pelos tratamentos farmacológicos.

O aumento da sensibilidade do barorreflexo espontâneo pelo ECV corrobora com recentes achados demonstrando aumento do tônus vagal para o coração após exposição a protocolos de estresse crônico (Carnevali et al., 2011; Carnevali et al., 2014), e pode, portanto, ser considerada uma resposta compensatória (Carnevali et al., 2014). Assim, a reversão das modificações provocadas pelo ECV com fluoxetina e 7-NI na sensibilidade dos barorreflexo espontâneo pode constituir um efeito negativo sobre a função cardiovascular. A análise do barorreflexo através da abordagem farmacológica também demonstrou que o 7-NI reduziu a bradicardia reflexa e facilitou a resposta taquicardia nos animais não estressados. Comprometimento na atividade do barorreflexo está envolvida no desenvolvimento e progressão da hipertensão, além de estar associado com prognóstico negativo em uma variedade de doenças cardiovasculares (Grassi et al., 2006; Rovere et al., 2008). Além disso, respostas de taquicardia exacerbadas são consideradas um fator de risco para isquemia do miocárdio e morte súbita (Palatini et al., 1997). Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam uma influência negativa da fluoxetina e do 7-NI sobre a atividade do barorreflexo, o que pode potencialmente aumentar a vulnerabilidade para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Tanto a fluoxetina quanto o 7-NI revertem a redução da resposta depressora da acetilcolina e do NPS induzidas pelo ECV. Estes dados são consistentes com a demonstração de que o tratamento crônico com fluoxetina reverte os danos evocados pelo ECV no relaxamento dependente de NO em anéis da aorta (Isingrini et al., 2012). O tratamento farmacológico com fluoxetina ou 7-NI também diminuiu a resposta pressora à fenilefrina em animais não estressados. Algumas condições cardiovasculares (por exemplo, hipertensão) são associadas com disfunção vascular, que, entre outras alterações, é caracterizada por aumento da resposta vascular a agentes vasoconstritores (Laurent et al., 1987; Chang et al., 2002; Tang et al., 2010). Portanto, nossos resultados fornecem evidências de que a fluoxetina e o 7-NI previnem as disfunções vasculares que acompanham as alterações comportamentais induzidas pelo ECV, bem como evoca efeitos benéficos sobre a função vascular que são independentes da exposição ao estresse.

Efeitos importantes independentes da exposição ao ECV foram detectadas na atividade autonômica cardíaca e vascular após os tratamentos farmacológicos. Por exemplo, o tratamento crônico com 7-NI reduziu o tônus simpático para o coração que, por sua vez, levou a bradicardia de repouso nos animais estressados. Além disso, a fluoxetina elevou o tônus parassimpático no coração, na qual foi compensada por um aumento na FC

intrínseca, resultando, assim, em ausência de mudanças da FC basal. Mudança no balanço simpátovagal com um aumento da contribuição vagal tem sido reconhecido como um índice de saúde cardíaca (Carnevali et al., 2014). Deste modo, nossos achados indicam efeitos cardioprotetores tanto da fluoxetina quanto do 7-NI. No entanto, nós observamos um aumento da variância da PAS com um aumento na potência do componente de BF nos animais tratados com fluoxetina, o que indica um aumento da modulação vasomotora simpática da PAS (Malliani et al., 1991). Este resultado é consistente com resultados anteriores reportando o desenvolvimento de hipertensão após o tratamento com fluoxetina por 21 dias (Crestani et al., 2011). As alterações evocadas pela fluoxetina na modulação simpática vascular foram seguidas por redução da reatividade vascular a agentes vasoconstritores, na qual pode constituir um ajuste que evita a elevação da pressão arterial associada a um aumento da atividade simpática. No entanto, esta alteração na reatividade vascular parece não ser suficiente para evitar o desenvolvimento de hipertensão durante o tratamento por períodos mais longos (por exemplo, 21 dias), (Crestani et al., 2011).

O tratamento com fluoxetina também reduziu o peso do corpo nos animais não estressados. Estudos clínicos também têm relatado uma perda de peso transiente durante o tratamento com fluoxetina (Serretti et al., 2010). Além disso, vários estudos têm demonstrado que o tratamento crônico com fluoxetina reduz a ingestão de alimentos e o peso corporal em roedores (Yen et al., 1992; Crestani et al., 2011). Este é um efeito relevante para o tratamento da depressão, uma vez que os pacientes deprimidos muitas vezes apresentam perda de peso (Fernstrom., 1989). Além disso, considerando-se a evidência de hiperatividade do eixo HPA na depressão (Pariante et al., 2008), a hipertrofia adrenal identificada nos animais tratados com fluoxetina também pode constituir um importante efeito somático. No entanto, tanto a fluoxetina quanto o 7-NI reduziram a concentração de corticosterona plasmática nos animais exposto ao ECV, o que pode estar relacionado com o efeito antidepressivo induzido por essas substâncias (Pariante et al., 2008).



## 7. CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo indicam que 2 semanas de tratamento com fluoxetina ou 7-NI administrados concorrentemente com a exposição ao ECV previnem tanto a expressão do comportamento do tipo depressivo quanto as alterações cardiovasculares induzidas pelo ECV. Ambos os tratamentos farmacológicos causaram alterações cardiovasculares que foram independentes da exposição ao estresse, sendo algumas benéficas e outras potencialmente aumentando a suscetibilidade para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No entanto, a redução de peso corporal induzido pelo tratamento com fluoxetina é especialmente importante, considerando a perda de peso muitas vezes observada em pacientes deprimidos. A Tabela 5 resume as vantagens e desvantagens do tratamento com fluoxetina e 7-NI. Tomados em conjunto, podemos constatar que a fluoxetina e o 7-NI afetam de maneira semelhante as alterações do tipo depressivas e a função cardiovascular, mas a ausência de efeito *per se* no peso corporal pode constituir uma importante vantagem de inibidores da NOS.

**Tabela 5** – Comparação do efeito do tratamento crônico com fluoxetina ou 7-nitroindazole nos parâmetros somáticos, funções fisiológicas e nas respostas comportamentais.

	<u>FLUOXETINA</u>	<u>7-NITROINDAZOLE</u>
	<b>Comportamento</b>	¶ Eficaz na prevenção do comportamento tipo depressivo.
	<b>Eixo HPA</b>	¶ Redução da corticosterona plasmática (animais ECV).
<b>Vantagens</b>	<b>Função cardiovascular</b>	¶ Redução da resposta vascular ao agente vasoconstritor. ¶ Reversão do dano induzido pelo estresse crônico variável na resposta vascular ao agente vasodilatador.
	<b>Atividade autonômica</b>	¶ Aumento do tônus parassimpático cardíaco.
	<b>Parâmetros somáticos</b>	† Redução no ganho do peso corporal. † Hipertrofia adrenal.
<b>Desvantagens</b>	<b>Função cardiovascular</b>	† Redução na resposta vasodilatadora ao NPS.
	<b>Atividade autonômica</b>	† Aumento da modulação vasomotora simpática. † Prejuízo da atividade do barorreflexo.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BACHETTI T, COMINI L, CURELLO S, BASTIANON D, PALMIERI M, BRESCIANI G, et al., Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. **J Mol Cell Cardiol.** 37(5): 939-945, 2004.

BAROUCH LA, HARRISON RW, SKAF MW, ROSAS GO, CAPPOLA TP, KOBEISSI ZA, HOBAN IA, LEMMON CA, BURNETT AL, O'ROURKE B, RODRIGUEZ ER, HUANG PL, LIMA JA, BERKOWITZ DE, HARE JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. **Nature.** 416(6878):337-9, 2002.

BEIERWALTES WH. Selective neuronal nitric oxide synthase inhibition blocks furosemide-stimulated renin secretion in vivo. **Am. J. Physiol.** 269: F134–F139, 1995.

BOULANGER CM, HEYMES C, BENESSIONO J, GESKE RS, LEVY BI, VANHOUTTE PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. **Circ Res.** 83(12): 1271-1278, 1998.

BOUZINOVA EV, MOLLER-NIELSEN N, BOEDTKJER DB, BROEGGER T, WIBORG O, AALKJAER C, et al., Chronic mild stress-induced depression-like symptoms in rats and abnormalities in catecholamine uptake in small arteries. **Psychosom Med.** 74(3): 278-287, 2012.

BROADLEY AJ, FRENNEAUX MP, MOSKVINA V, JONES CJ, KORSZUN A. Baroreflex sensitivity is reduced in depression. **Psychosom Med.** 67(4): 648-651, 2005.

CACANYIOVA S, KRISTEK F, GEROVA M, KRENEK P, KLIMAS J. Effect of chronic nNOS inhibition on blood pressure, vasoactivity, and arterial wall structure in Wistar rats. **Nitric Oxide.** 20(4):304-10, 2009.

CAMARGO LH, ALVES FH, BIOJONE C, CORREA FM, RESSEL LB, CRESTANI CC. Involvement of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor and nitric oxide in cardiovascular responses to dynamic exercise in rats. **Eur J Pharmacol.** 713(1-3): 16-24, 2013.

CARNEVALI L, BONDARENKO E, SGOIFO A, WALKER FR, HEAD GA, LUKOSHKOVA EV, et al. Metyrapone and fluoxetine suppress enduring behavioral but not cardiac effects of subchronic stress in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 301(4): R1123-1131, 2011.

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

CARNEY RM, FREEDLAND KE. Depression, mortality, and medical morbidity in patients with coronary heart disease. **Biol Psychiatry.** 54(3):241-7, 2003.

- 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.** 29(4): 275-280, 2002.
- CHARNEY DS. Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. **J Clin Psychiatry.** 59 Suppl 14:11-4, 1998.
- CRESTANI CC, ALVES FH, CORREA FM, GUIMARÃES FS, JOCA SR. Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test. **Behav Brain Funct.** 6:30, 2010a.
- CRESTANI, C.C.; ALVES, F.H.; BUSNARDO, C.; RESSTEL, L.B. CORREA, F.M. N-Methyl-d-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. **Neurosci Res.** 67(4): 317-26. 2010b.
- CRESTANI, C.C.; TAVARES, R.F.; ALVES, F.H.; RESSTEL, L.B.; CORREA, F.M. Effect of acute restraint stress on bradycardiac and tachycardiac responses of the baroreflex in rats. **Stress.** 13(1):61-72, 2010c.
- CRESTANI CC, TAVARES RF, GUIMARÃES FS, CORREA FM, JOCA SR, RESSTEL LB. Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. **Eur J Pharmacol.** 670(2-3):527-33, 2011.
- DANSON EJ, CHOATE JK, PATERSON DJ. Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function. **Pharmacol Ther.** 106(1):57-74, 2005.
- 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.** 108(5):1041-51, 2010.
- DAUPHINOT V, ROUCH I, KOSSOVSKY MP, PICHOT V, DOREY JM, KROLAK-SALMON P, LAURENT B, ROCHE F, BARTHÉLÉMY JC. Depressive symptoms and autonomic nervous system dysfunction in an elderly population-based study: the PROOF study. **J Affect Disord.** 143(1-3):153-9, 2012.
- DAWOOD T, LAMBERT EA, BARTON DA, LAUDE D, ELGHOZI JL, ESLER MD, HAIKERWAL D, KAYE DM, HOTCHKIN EJ, LAMBERT GW. Specific serotonin reuptake inhibition in major depressive disorder adversely affects novel markers of cardiac risk. **Hypertens Res.** 30(4):285-93, 2007.
- de ANDRADE O, BORGHI SM, DE SOUZA HC, FONTES MA, MARTINS-PINGE MC. Paraventricular nucleus of hypothalamus participates in the sympathetic modulation and spontaneous fluctuation of baroreflex during head up tilt in unanesthetized rats. **Neurosci Lett.** 558: 1-7, 2014.

- De WARDENER HE. The hypothalamus and hypertension. **Physiol Rev.** 81(4):1599-658, 2001.
- DHIR A, KULKARNI SK. Nitric oxide and major depression. **Nitric Oxide.** 24(3):125-31, 2011.
- ENGI SA, CRUZ FC, LEÃO RM, CORRÊA 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.** 59(3): 231-40, 2012.
- FERNSTROM MH. Depression, antidepressants, and body weight change. **Ann N Y Acad Sci.** 575: 31-39; discussion 39-40, 1989.
- 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.** 104(2):228-34, 2011.
- FORSTERMANN U, SESSA WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J.** 33(7): 829-837, 837a-837d, 2012.
- GARTHWAITE J, CHARLES SL, CHESS-WILLIAMS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature.** 336(6197):385-8, 1988.
- GARTHWAITE J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **Eur J Neurosci.** 27(11):2783-802, 2008.
- GLASSMAN AH, SHAPIRO PA. Depression and the course of coronary artery disease. **Am J Psychiatry.** 155(1):4-11, 1998.
- GLASSMAN AH. Depression and cardiovascular comorbidity. **Dialogues Clin Neurosci.** 9(1):9-17, 2007.
- GRAM, L. Fluoxetine. **N. Engl. J. Med.** 331, 1354–1361, 1994.
- GRASSI G, TREVANO FQ, SERAVALLE G, SCOPELLITI F, MANCIA G. Baroreflex function in hypertension: consequences for antihypertensive therapy. **Prog Cardiovasc Dis.** 48(6): 407-415, 2006.
- GRIEBEL G, SIMIAND J, SERRADEIL-LE GAL C, WAGNON J, PASCAL M, SCATTON B, MAFFRAND JP, SOUBRIE P. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 99(9):6370-5, 2002.
- GRIPPO AJ, MOFFITT JA, JOHNSON AK. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 282(5):R1333-41, 2002.

- 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.** 286(2):H619-26, 2004.
- GRIPPO AJ, SULLIVAN NR, DAMJANOSKA KJ, CRANE JW, CARRASCO GA, SHI J, et al. Chronic mild stress induces behavioral and physiological changes, and may alter serotonin 1A receptor function, in male and cycling female rats. **Psychopharmacology (Berl).** 179(4): 769-780, 2005.
- GRIPPO AJ, BELTZ TG, WEISS RM, JOHNSON AK. The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia. **Biol Psychiatry.** 59(4): 309-316, 2006.
- GRIPPO AJ, MOFFITT JA, JOHNSON AK. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. **Psychosom Med.** 70(4):435-43, 2008.
- GRIPPO AJ. Mechanisms underlying altered mood and cardiovascular dysfunction: the value of neurobiological and behavioral research with animal models. **Neurosci Biobehav Rev.** 33(2):171-80, 2009.
- HEAD GA, McCARTY R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **J Auton Nerv Syst.** 21(2-3):203-13, 1987.
- HEIBERG IL, WEGENER G, ROSENBERG R. Reduction of cGMP and nitric oxide has antidepressant-like effects in the forced swimming test in rats. **Behav Brain Res.** 134(1-2):479-84, 2002.
- HENINGER GR, DELGADO PL, CHARNEY DS. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. **Pharmacopsychiatry.** 29(1):2-11, 1996.
- HENZE M, TINIAKOV R, SAMAREL A, HOLMES E, SCROGIN K. Chronic fluoxetine reduces autonomic control of cardiac rhythms in rats with congestive heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 304(3): H444-454, 2013.
- HIRSCHFELD RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **J Clin Psychiatry.** 61 Suppl 6:4-6, 2000.
- 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.** 103(5):540-6, 2011.

- 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.** 74(1): 63-72, 2012.
- JANKORD R, SOLOMON MB, ALBERTZ J, FLAK JN, ZHANG R, HERMAN JP. Stress vulnerability during adolescent development in rats. **Endocrinology.** 152(2):629-38, 2011.
- JEFFERYS D, FUNDER J. Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats. **Eur J Pharmacol.** 295(2-3):131-5, 1996.
- JEREMY JY, ROWE D, EMSLEY AM, NEWBY AC. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. **Cardiovasc Res.** 43(3):580-94, 1999.
- JOCA, S.R; GUIMARÃES, F.S. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. **Psychopharmacology (Berl).** 185: 298–305, 2006.
- KENDLER KS, KARKOWSKI LM, PRESCOTT CA. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. **Am J Psychiatry.** 156(6):837-41, 1999.
- KESSLER RC, BERGLUND P, DEMLER O, JIN R, KORETZ D, MERIKANGAS KR, RUSH AJ, WALTERS EE, WANG PS; national comorbidity survey replication. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA.** 289(23):3095-105, 2003.
- KISS JP. Theory of active antidepressants: a nonsynaptic approach to the treatment of depression. **Neurochem Int.** 52(1-2):34-9, 2008.
- KOBZIK L, REID MB, BREDDT DS, STAMLER JS. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature.** 372(6506): 546-548, 1994.
- KURIHARA N, ALFIE ME, SIGMON DH, RHALEB NE, SHESELY EG, CARRETERO OA. Role of nNOS in blood pressure regulation in eNOS null mutant mice. **Hypertension.** 32(5): 856-861, 1998.
- KRISTEK F, CACANYIOVA S, GEROVA M. Hypotrophic effect of long-term neuronal NO-synthase inhibition on heart and conduit arteries of the Wistar rats. **J Physiol Pharmacol.** 60(2):21-7, 2009.
- LA ROVERE MT, PINNA GD, RACZAK G. Baroreflex sensitivity: measurement and clinical implications. **Ann Noninvasive Electrocardiol.** 13(2): 191-207, 2008.
- 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.** 80(6): 826-831, 1987.
- LEE BH, LEE SW, YOON D, LEE HJ, YANG JC, SHIM SH, et al. Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. **Neuropsychobiology.** 53(3): 127-132, 2006.

- LEI J, VODOVOTZ Y, TZENG E, BILLIAR TR. Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. **Nitric Oxide**. 35: 175-185, 2013.
- LUCKI I, O'LEARY OF. Distinguishing roles for norepinephrine and serotonin in the behavioral effects of antidepressant drugs. **J Clin Psychiatry**. 65 Suppl 4:11-24, 2004.
- MAENG S, ZARATE CA Jr. The role of glutamate in mood disorders: results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. **Curr Psychiatry Rep**. 9(6):467-74, 2007.
- MALLIANI A, PAGANI M, LOMBARDI F, CERUTTI S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**. 84(2): 482-492, 1991.
- MARIN MT, CRUZ FC, PLANETA CS. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavioral, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiology Behavior**. 90(1): 29-35, 2007.
- MELIKIAN N, SEDDON MD, CASADEI B, CHOWIENCZYK PJ, SHAH AM. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. **Trends Cardiovasc Med**. 19(8):256-62, 2009.
- MOORE PK, WALLACE P, GAFFEN Z, HART SL, BABBEDGE RC. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. **Br J Pharmacol**. 110(1):219-24, 1993.
- MURAKAMI H, LIU JL, YONEYAMA H, NISHIDA Y, OKADA K, KOSAKA H, MORITA H, ZUCKER IH. Blockade of neuronal nitric oxide synthase alters the baroreflex control of heart rate in the rabbit. **Am J Physiol**. 274(1 Pt 2):R181-6, 1998.
- MURRAY CJ, VOS T, LOZANO R, NAGHAVI M, FLAXMAN AD, MICHAUD C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**. 380(9859): 2197-2223, 2012.
- MUTLU O, ULAK G, LAUGERAY A, BELZUNG C. Effects of neuronal and inducible NOS inhibitor 1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] imidazole (TRIM) in unpredictable chronic mild stress procedure in mice. **Pharmacol Biochem Behav**. 92(1): 82-87, 2009.
- NAFTILAN AJ. The role of angiotensin II in vascular smooth muscle cell growth. **J Cardiovasc Pharmacol**. 20(Suppl 1): S37-S40, 1992.
- NAYLOR GJ, SMITH AH, CONNELLY P. A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness. **Biol Psychiatry**. 22(5):657-9, 1987.
- NEGRAO CE, MOREIRA ED, SANTOS MC, FARAH VM, KRIEGER EM. Vagal function impairment after exercise training. **J Appl Physiol**. 72(5):1749-53, 1992.



- NESTLER EJ, HYMAN SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nat Neurosci.** 13(10): 1161-9, 2010.
- OLIVEIRA, R.M; GUIMARÃES, F.S; DEAKIN, J.F. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders, **Braz. J. Med. Biol. Res.** 41: 333–341, 2008.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. The global burden of disease: 2004 update. Genebra: WHO, 2004. Disponível: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/2004\\_report\\_update/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html) (acessado 04/02/2013).
- PACHER P, KECSKEMETI V. Cardiovascular side effects of new antidepressants and antipsychotics: new drugs, old concerns? **Curr Pharm Des.** 10(20):2463-75, 2004.
- PALATINI P, JULIUS S. Association of tachycardia with morbidity and mortality: pathophysiological considerations. **J Hum Hypertens.** 11 Suppl 1: S19-27, 1997.
- PARIANTE CM, LIGHTMAN SL. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. **Trends Neurosci.** 31(9): 464-468, 2008.
- PATEL KP, ZHENG H. Central neural control of sympathetic nerve activity in heart failure following exercise training. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 302(3):H527-37, 2012.
- PENNINX BW, BEEKMAN AT, HONIG A, DEEG DJ, SCHOEVERS RA, VAN EIJK JT, VAN TILBURG W. Depression and cardiac mortality: results from a community-based longitudinal study. **Arch Gen Psychiatry.** 58(3):221-7, 2001.
- PITTENGER C, DUMAN RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology.** 33(1):88-109, 2008.
- PORSOLT RD, LE PICHON M, JALFRE M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature.** 266(5604): 730-732, 1977.
- PRAST, H., PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Prog Neurobiol.** 64, 51-68, 2001.
- RAJAGOPALAN S, BROOK R, RUBENFIRE M, PITT E, YOUNG E, PITT B. Abnormal brachial artery flow-mediated vasodilation in young adults with major depression. **Am J Cardiol.** 88(2): 196-198, A197, 2001.
- RESSTEL LB, CORRÊA FM, GUIMARÃES FS. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. **Cereb Cortex.** 18(9): 2027-35, 2008.
- SANCHES IC, SARTORI M, JORGE L, IRIGOYEN MC, ANGELIS K. Tonic and reflex cardiovascular autonomic control in trained-female rats. **Braz J Med Biol Res.** 42(10): 942-948, 2009.

- SARNYAI 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.** 589(1): 154-156, 1992.
- SERRETTI A, MANDELLI L. Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis. **J Clin Psychiatry.** 71(10): 1259-1272, 2010.
- SOUZA, HC, BALLEJO G, SALGADO MC, Da SILVA VJ, SALGADO HC. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 280: H844–H850, 2001.
- SHELIN YI, FREEDLAND KE, CARNEY RM. How safe are serotonin reuptake inhibitors for depression in patients with coronary heart disease? **Am J Med.** 102(1): 54-59, 1997.
- STERN JE. Nitric oxide and homeostatic control: an intercellular signalling molecule contributing to autonomic and neuroendocrine integration? **Prog Biophys Mol Biol.** 84(2-3):197-215, 2004.
- SUZUKI, E; G. YAGI, G; NAKAKI, T; KANBA, S; ASAI, M. Elevated plasma nitrate levels in depressive states. **J. Affect Disord.** 63: 221–224, 2001.
- TANG EH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? **Pflugers Arch.** 459(6): 995-1004, 2010.
- TANG L, WANG H, ZIOLO MT. Targeting NOS as a therapeutic approach for heart failure. **Pharmacol Ther.** 142(3): 306-315, 2014.
- TODA N, OKAMURA T. Modulation of renal blood flow and vascular tone by neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **J Vasc Res.** 48(1):1-10, 2011.
- TOKITA K, YAMAJI T, HASHIMOTO K. Roles of glutamate signaling in preclinical and/or mechanistic models of depression. **Pharmacol Biochem Behav.** 100(4):688-704, 2012.
- VAN DER KOOY K, VAN HOUT H, MARWIJK H, MARTEN H, STEHOUWER C, BEEKMAN A. Depression and the risk for cardiovascular diseases: systematic review and meta analysis. **Int J Geriatr Psychiatry.** 22(7): 613-626, 2007.
- VERDECCHIA P, GENTILE G, ANGELI F, REBOLDI G. Beyond blood pressure: evidence for cardiovascular, cerebrovascular, and renal protective effects of renin-angiotensin system blockers. **Ther Adv Cardiovasc Dis.** 6(2):81-91, 2012.
- VOS T, FLAXMAN AD, NAGHAVI M, LOZANO R, MICHAUD C, EZZATI M, et al., Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet.** 380(9859): 2163-2196, 2012.

- WANGENSTEEN R, RODRÍGUEZ-GÓMEZ I, MORENO JM, ALVAREZ-GUERRA M, OSUNA A, VARGAS F. Effects of chronic treatment with 7-nitroindazole in hyperthyroid rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 291(5):R1376-82, 2006.
- WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, SOPHOKLEOUS S, MUSCAT R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacology (Berl).** 93(3):358-64, 1987.
- WILLNER P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology (Berl).** 134(4):319-29, 1997.
- WILLNER P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology.** 52(2):90-110, 2005.
- WULSIN LR, SINGAL BM. Do depressive symptoms increase the risk for the onset of coronary disease? A systematic quantitative review. **Psychosom Med.** 65(2):201-10, 2003.
- YAZIR Y, UTKAN T, ARICIOGLU F. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase prevents depression-like behaviour in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 111(3):154-60, 2012.
- YEN TT, FULLER RW. Preclinical pharmacology of fluoxetine, a serotonergic drug for weight loss. **Am J Clin Nutr.** 55(1 Suppl): 177S-180S, 1992.
- YILDIZ, F; ERDEN, B.F; ULAK, G; UTKAN, T; GACAR, N. Antidepressant-like effect of 7 nitroindazole in the forced swimming test in rats. **Psychopharmacology (Berl).** 149: 41-44, 2000.
- ZANZINGER J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. **Auton Neurosci.** 98(1-2):24-7, 2002.
- ZATZ R, BAYLIS C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. **Hypertension.** 32(6):958-64, 1998.
- ZHOU QG, HU Y, HUA Y, HU M, LUO CX, HAN X, ZHU XJ, WANG B, XU JS, ZHU DY. Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. **J Neurochem.** 103(5):1843-54, 2007.