



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



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA LABORATÓRIO  
DE FARMACOLOGIA

## **Habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em ratos**

Ricardo Benini

Araraquara-SP

2019

Ricardo Benini

## **Habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em ratos**

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

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani.**

Araraquara -SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Ricardo Benini, realizada em 02/08/2019:

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani  
UNESP

Profa. Dra. Sandra Lídia do Amaral Cardoso  
UNESP

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza  
UNESP

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Correa  
USP

Prof. Dr. Bruno Rodrigues  
UNICAMP

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais Alexandre e Rose, por me apoiarem e me ajudarem durante estes anos; aos meus irmãos Carolina e Alexandre Filho, pelo amor e carinho; e a minha esposa Sarah, pelo amor, paciência e atenção em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela oportunidade, saúde e força na realização deste trabalho.

A minha família, pelo amor, apoio, compreensão e dedicação por toda a minha vida, obrigado por sempre acreditarem em mim.

A Sarah Vargas, pelo amor, companheirismo, atenção e incentivo durante a realização desta pesquisa. Por estar sempre ao meu lado, me ouvindo e aconselhando nos momentos mais difíceis.

Ao professor Carlos Cesar Crestani, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por acreditar e confiar no meu trabalho e contribuir com seus ensinamentos que ajudaram no meu amadurecimento profissional e pessoal.

As agências de fomento Capes, pela concessão de bolsa, FAPESP e CNPq, pelo suporte financeiro ao projeto.

A todos integrantes do laboratório neuropsicofarmacologia, em especial Leandro Augusto de Oliveira, Lucas Gomes de Souza por participar da execução do projeto e amizade, Ligia Cury Casula, Celina Ferrari Laverde, Lucas Barretto de Souza, Patrícia Rodela, Willian Costa Ferreira, Rodrigo Tomeo pelas ajudas e momentos de descontração.

As técnicas Rosana Finoti Pupim Silva e Elizabete Zocal P. Lepera pelos ensinamentos e contribuições, com dedicação e paciência.

E por fim, mas não com menor importância, aos examinadores de qualificação, Dra. Patrícia Maria de Paula, Dr. Marcelo Tadeu Marins e Dr. Ricardo Nunes de Souza e de os de defesa, Dr. Fernando Aguiar Morgan, Dra. Sandra Lia do Amaral, Dr. Ricardo Nunes de Souza e Dr. Bruno Rodrigues pelas pertinentes contribuições para a elaboração desta pesquisa e Tese.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram com a minha formação e amadurecimento profissional para que eu pudesse me manter firme nesta jornada, para se encerrar mais uma fase da minha vida e ter início a uma nova, o meu muito obrigado!

## EPÍGRAFE

*“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”*

*“A persistência é o menor caminho para o êxito.”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

A habituação refere-se a qualquer diminuição na responsividade fisiológica e comportamental a um estímulo repetido, enquanto a sensibilização é uma hiperresponsividade desencadeada pelo mesmo estímulo ou por outros estímulos. Apesar da habituação das respostas neuroendócrinas ao estresse ser bem descrita na literatura, uma redução progressiva das respostas cardiovasculares durante a exposição repetida ao mesmo estímulo aversivo ainda é controversa. Portanto, no presente estudo nós testamos a hipótese de que as respostas cardiovasculares habituem durante a exposição repetida ao estresse de restrição em ratos, e esse efeito é influenciado pela duração, frequência e número de sessões de restrição; pela exposição a outros estressores e ao treinamento físico; bem como pelo sexo, idade e linhagem dos animais. A habituação da resposta de corticosterona ao estresse de restrição repetido também foi avaliada. Nós observamos que o aumento sérico de corticosterona foi diminuído durante o estresse e o período de recuperação da 10ª sessão de restrição, quando comparada com a resposta durante uma sessão aguda. Com relação às respostas cardiovasculares, foi identificado um retorno mais rápido da frequência cardíaca (FC) aos valores basais durante o período pós-estresse da 10ª sessão de 60 min de estresse de restrição em ratos e ratas Wistar adultos, em ratos Wistar idosos e em ratos Holtzman adultos. Sessões diárias de 120 minutos diminuíram os valores de pressão arterial e FC durante a recuperação da 10ª sessão em ratos Wistar adultos. Ratos Wistar adolescentes apresentaram redução na resposta de pressão arterial e FC durante a 10ª sessão de estresse de restrição. Ratos espontaneamente hipertensos (do inglês, SHR) e Long-Evans não apresentaram nenhum sinal de habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. Em relação à frequência, a taquicardia durante a 10ª sessão foi aumentada em ratos Wistar adultos submetidos a 60 minutos de restrição apresentados em dias alternados, e diminuídos em ratos submetidos ao protocolo de 5 sessões diárias seguidas de 2 dias de descanso. A exposição a outros estressores crônicos, incluindo o estresse crônico variado e o estresse de isolamento social, bem como a um protocolo de treinamento físico em esteira inibiram o processo de habituação da resposta de FC observado durante a 10ª sessão de 60 minutos de estresse de restrição. O estresse crônico variado e o isolamento social também facilitaram as respostas de, respectivamente, pressão arterial e FC ao estresse de restrição. Estes resultados fornecem evidências de habituação das respostas cardiovasculares após exposição repetida ao estresse de restrição, e esse efeito é dependente da duração, frequência e número de exposições; além de ser influenciada pelo sexo, período da vida e linhagem dos animais. O processo de habituação também foi inibido pela exposição a outros eventos estressores crônicos e pelo treinamento físico.

## ABSTRACT

Habituation refers to any decrease in physiological and behavioral responsiveness to a repeated stimulus, while sensitization is a hyperresponsiveness triggered by the same stimulus or other stimuli. Although the habituation of neuroendocrine responses to stress is well described in the literature, a progressive reduction of cardiovascular responses during repeated exposure to the same aversive stimulus is still controversial. Therefore, in the present study we have tested the hypothesis that cardiovascular responses habituate during repeated exposure to restraint stress in rats, and this effect is influenced by the length, frequency and number of aversive sessions; exposure to other stressors and physical training; as well as the sex, age and lineage of the animals. The habituation of corticosterone response to repeated restraint stress was also evaluated. We observed that serum corticosterone increase was decreased during stress and the recovery period of the 10th restraint session when compared to the response during an acute session. Regarding cardiovascular responses, a faster heart rate (HR) return was observed at baseline during the post-stress period of the 10th 60-min restraint stress session in male and female adult Wistar rats, in elderly Wistar rats, and in Holtzman adult rats. Daily 120-minute sessions decreased blood pressure and HR values during the recovery of the 10th session in adult Wistar rats. Adolescent Wistar rats presented a reduction in HR response during the 10th restraint session. Spontaneously hypertensive rats (SHR) and Long-Evans did not show any sign of habituation of cardiovascular responses to restraint stress. Regarding the frequency, tachycardia during the 10th session was increased in adult Wistar rats submitted to 60 minutes of restraint presented on alternate days, and decreased in rats submitted to the protocol of 5 daily sessions followed by 2 days of rest. Exposure to other chronic stressors including chronic varied stress and social isolation stress as well as a treadmill physical training protocol inhibited the process of habituation of the HR response observed during the 10th session of 60 minutes of restraint stress. The chronic varied stress and social isolation also facilitated the responses of, respectively, blood pressure and HR to restraint stress. These results provide evidence of habituation of cardiovascular responses after repeated exposure to restraint stress, and this effect is dependent on duration, frequency and number of exposures; besides being influenced by the sex, period of the life and lineage of the animals. The habituation process was also inhibited by exposure to other chronic stressors and by physical training.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental da influência da duração da sessão de estresse de restrição na resposta de habituação. ....	27
Figura 2 – Desenho experimental da influência do número sessões da resposta de habituação ao estresse.....	28
Figura 3 – Desenho experimental da influência da frequência de exposição ao estresse nas respostas de habituação .....	29
Figura 4- Desenho experimental da influência da exposição previa ao estresse crônico variado na resposta de habituação .....	30
Figura 5- Desenho experimental da influência do isolamento social nas respostas de habituação .....	31
Figura 6- Desenho experimental da influência do treinamento em esteira nas resposta de habituação ao estresse de restrição .....	32
Figura 7 - Desenho experimental da influência do sexo na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.....	34
Figura 8 Desenho experimental da influência da idade dos ratos na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.....	35
Figura 9 – Desenho experimental da influência da linhagem dos ratos na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição .....	37
Figura 10- Habituação da resposta da corticosterona sérica ao estresse de restrição.....	39
Figura 11-Influência da duração das sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares.....	42
Figura 12- Influência da duração das sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares.....	43
Figura 13-Influência do número de sessões de estresse de restrição (volume) na habituação das respostas cardiovasculares.....	45
Figura 14-Influência da frequência de exposição ao estresse de restrição na habituação de respostas cardiovasculares.....	47
Figura 15 - Influência do estresse crônico variado (ECV) na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.....	50
Figura 16 - Influência do isolamento social na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. ....	53

Figura 17 - Velocidade máxima de corrida (km/h) em testes máximos de exercício em esteira. .....	55
Figura 18 -Influência do treinamento físico em esteira na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.....	58
Figura 19 - Figura representativa da fase do ciclo estral das ratas.....	59
Figura 20 - Influência do sexo na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. ....	62
Figura 21 - Influência da idade do animal na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em ratos.....	66
Figura 22 -Valores basais de pressão arterial media (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda em diferentes linhagens de ratos. ....	68
Figura 23 - Influência da linhagem do animal na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em ratos.....	71

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de estresse crônico variável.....	22
Tabela 2- Média dos Parâmetros basais pressão arterial (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (T).....	41
Tabela 3 – Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (T).....	49
Tabela 4 – Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (T).....	60
Tabela 5– Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (T).....	63

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1 Critérios de habituação das respostas ao estresse .....	12
1.1.1 Critério ou característica 1 .....	13
1.1.2 Critério ou característica 2 .....	13
1.1.3 Critério ou característica 3 .....	13
1.1.4 Critério ou característica 4 .....	14
1.1.5 Critério ou característica 5 .....	14
1.1.6 Critério ou característica 6 .....	14
1.1.7 Critério ou característica 7 .....	14
1.1.8 Critério ou característica 8 .....	15
1.1.9 Critério ou característica 9 .....	15
1.1.10 Critério ou característica 10 .....	15
1.2 Neuroplasticidade ao estresse .....	16
1.3 Respostas cardiovasculares ao estresse crônico .....	17
2. OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
2.2.1 Bloco1: estudos da influência da duração, número de sessões e frequência de exposição ao estresse de restrição no processo de habituação do sistema cardiovascular .....	19
2.2.2 Bloco 2: estudo da influência da exposição a outros estressores no processo de habituação do sistema cardiovascular ao estresse de restrição .....	20
2.2.3 Bloco 3: estudo da influência de características individuais dos animais (sexo, idade e linhagem) no processo de habituação do sistema cardiovascular ao estresse de restrição .....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1 Animais .....	21
3.2 Estressores .....	21
3.2.1 Estresse de restrição .....	21
3.2.2 Estresse de isolamento social .....	21
3.2.3 Estresse crônico variado .....	22
3.3 Treinamento físico em esteira .....	23
3.4 Preparação cirúrgica .....	23
3.5 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca .....	24
3.6 Registro da temperatura cutânea da cauda .....	24

3.7	Dosagem corticosterona sérica.....	25
3.8	Análise dos dados.....	25
4.	PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS .....	26
4.1	Habituação da resposta de corticosterona sérica durante a exposição repetida ao estresse de restrição .....	26
4.2	Bloco 1:.....	26
4.2.1	Estudo da influência da duração da sessão do estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares .....	26
4.2.2	Estudo da influência do número de sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares .....	27
4.2.3	Estudo da influência da frequência de apresentação do estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares .....	28
4.3	Bloco 2:.....	30
4.3.1	Estudo da influência da exposição a outros estressores ou ao treinamento físico em esteira nas habituações das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.....	30
4.4	Bloco 3.....	33
4.4.1	Estudo da influência do sexo na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição .....	33
4.4.2	Estudo da influência da idade dos animais (adolescentes, adultos e idosos) na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.....	34
4.4.3	Estudo da influência da linhagem dos ratos na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.....	36
5.	RESULTADOS .....	38
5.1	Habituação da resposta de corticosterona sérica após exposição repetida ao estresse de restrição .....	38
5.2	Bloco 1: influência da duração, do número e da frequência das sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares .....	40
5.2.1	Influência da duração das sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares .....	40
5.2.2	Influência do número de sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares.....	44
5.2.3	Influência da frequência de apresentação das sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares .....	46
5.3	Bloco 2: influência da exposição a outros estressores na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição .....	48
5.3.1	Influência do estresse crônico variado na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição .....	48
5.3.2	Influência do isolamento social na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição .....	51

5.3.3	Influência do treinamento físico em esteira na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.....	54
5.4	Bloco 3: influência do sexo, da idade e da linhagem na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em fêmeas.....	59
5.4.1	Influência do sexo na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em fêmeas.....	59
5.4.2	Influência da idade na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição	63
5.4.3	Influência da linhagem na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição	67
6.	DISCUSSÃO .....	72
6.1	Bloco 1: influência da duração, volume e frequência do estímulo estressor na habituação das respostas cardiovasculares .....	74
6.2	Bloco 2: influência da exposição a outros estressores e do treinamento físico em esteira na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.....	78
6.3	Bloco 3: Influência do sexo, da linhagem e da idade na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição .....	82
7.	CONCLUSÃO .....	87
	REFERÊNCIAS .....	88

## 1. INTRODUÇÃO

Ajustes fisiológicos, incluindo alterações nas funções neuroendócrinas (por exemplo, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal - HPA) e cardiovasculares (por exemplo, aumento da pressão arterial e frequência cardíaca-FC) são evocados durante situações aversivas (CRESTANI, 2016; DAMPNEY, 2015; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009). No curto prazo, esses ajustes fisiológicos constituem importantes respostas adaptativas, mantendo a homeostase e garantindo a sobrevivência (STERLING, 2012). Entretanto, a exposição frequente e/ou prolongada a essas respostas, como ocorre durante a exposição repetida a situações aversivas (isto é, estresse crônico), pode levar a danos nos tecidos e desenvolvimento de doenças (DANESE; MCEWEN, 2012; HERMAN, 2013; MCEWEN, 1998a). Nesse sentido, o processo de habituação tem sido descrito como um mecanismo adaptativo proeminente durante a exposição a estressores crônicos (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; HERMAN, 2013; MCCARTY, 2016). O termo "habituação" é usado para descrever a redução progressiva na magnitude das respostas fisiológicas e comportamentais após exposição repetida ao mesmo estressor (isto é, estressor homotípico) (MCCARTY, 2016; RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966). De fato, tem sido proposto que a adaptação ao estresse crônico é amplamente determinada pelo processo de habituação, que limita o impacto a longo prazo do estresse, diminuindo as implicações deletérias para a sobrevivência e bem-estar (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; HERMAN, 2013; MCCARTY, 2016). Além disso, a capacidade de habituar-se a um estressor repetitivo conserva energia na geração de respostas a estímulos aversivos que não ameaçam a vida, aumentando assim a probabilidade de sobrevivência com um desafio futuro inesperado (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; MCCARTY, 2016).

Em relação aos ajustes fisiológicos provocados pelo estresse, a habituação das respostas neuroendócrinas, como o eixo HPA e a ativação do sistema medular simpático-adrenal, após exposição repetida a diversos estressores, vem sendo descrita há várias décadas (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; MCCARTY, 2016). No entanto, a habituação das respostas cardiovasculares ainda é contorversa (CRESTANI, 2016). Por exemplo, alguns resultados forneceram evidências de diminuição das respostas de aumento da pressão arterial e FC após exposição repetida ao estresse por restrição (BECHTOLD et al., 2009; CHEN; HERBERT, 1995), mas vários outros estudos relataram respostas cardiovasculares similares ao longo de exposições repetidas a esse estressor (CONTI et al., 2001; DAUBERT et al., 2012;

MCDUGALL et al., 2000; STAMP; HERBERT, 1999). A habituação de respostas cardiovasculares a outros estressores (por exemplo, derrota social) também é inconsistente (CARNEVALI et al., 2013; COSTOLI et al., 2004; FINNELL et al., 2017; SGOIFO et al., 2002). Alguns autores propuseram que variáveis fisiológicas não relacionadas ao eixo HPA, incluindo parâmetros cardiovasculares, podem ser insensíveis ao processo de habituação (RABASA et al., 2015). No entanto, os resultados disponíveis impedem interpretações conclusivas, já que a habituação das respostas cardiovasculares durante o estresse crônico não foi avaliada de maneira sistemática (CRESTANI, 2016).

### **1.1 Critérios de habituação das respostas ao estresse**

Em artigo clássico, THOMPSON E SPENCER (1966) descreveram e sintetizaram nove critérios ou características comuns para a habituação dos organismos a estímulo repetidos. Essas características foram revisadas por RAKIN E COLABORADORES (2009), incluindo uma nova característica (passaram para 10) e alguns ajustes nas características já descritas anteriormente por THOMPSON E SPENCER (1966).

Habituação é definida como um decréscimo de resposta resultante de estimulação repetida. As respostas de habituação podem incluir qualquer resultado final do sistema nervoso, incluindo reflexos, como respostas pupilares e sudorese, e contração muscular ou mesmo atividade do neurônio motor, ou mesmo a liberação de hormônios, que é a saída final do sistema neuroendócrino. Estudos de habituação também podem medir respostas celulares ou moleculares ou atividade neuronal, incluindo atividade populacional, como medida com eletroencefalograma ou por imagem funcional por fluxos sanguíneos (RANKIN et al., 2009). A habituação ao estímulo é vista como uma aprendizagem não associativa aos estímulos aos quais as respostas podem se habituar e as próprias reações habituais podem variar amplamente em sua complexidade (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009) e normalmente, nenhum único mecanismo é necessariamente responsável por um tipo específico de aprendizado (RANKIN et al., 2009). Abaixo está descrito em detalhes as 10 características propostas para o processo de habituação (RANKIN et al., 2009).

### 1.1.1 Critério ou característica 1

Um estímulo em particular provoca uma resposta, aplicações repetidas do estímulo resultam em resposta diminuída (habituação). Essa alteração pode incluir diminuições na frequência e/ou magnitude da resposta. Além disso, uma resposta pode mostrar facilitação antes da diminuição devido a um processo simultâneo de sensibilização (RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966).

### 1.1.2 Critério ou característica 2

Se o estímulo for interrompido, a resposta tende a se recuperar com o tempo (recuperação espontânea). Após a diminuição da resposta, ela pode se recuperar pelo menos parcialmente durante o tempo de observação. Se a resposta recupera completamente, ou apenas parcialmente dentro do período de tempo, em ambos os casos, ainda são considerados uma recuperação espontânea (RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966).

### 1.1.3 Critério ou característica 3

Após múltiplas séries de repetições de estímulos e recuperações espontâneas, o decréscimo da resposta torna-se sucessivamente mais rápido e/ou mais pronunciado (este fenômeno pode ser chamado de potenciação da habituação) (RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966).

#### 1.1.4 Critério ou característica 4

Outras coisas sendo iguais, a estimulação mais frequente resulta em decréscimo de resposta mais rápido e/ou mais pronunciado, e a recuperação espontânea é mais rápida (se o decréscimo atingiu níveis assintótico ou sem resposta) (RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966).

#### 1.1.5 Critério ou característica 5

Dentro de uma modalidade de estímulo, quanto menos intenso o estímulo, mais rápido e/ou mais pronunciado é o decréscimo de resposta. Estímulos muito intensos podem não produzir decréscimo significativo da resposta que está sendo observada (RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966).

#### 1.1.6 Critério ou característica 6

Os efeitos da exposição repetida podem continuar se acumulando mesmo após a resposta ter atingido um nível assintótico (nenhuma resposta). Este efeito da estimulação além dos níveis assintóticos pode alterar o comportamento subsequente, por exemplo, atrasando o início da recuperação espontânea (RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966) .

#### 1.1.7 Critério ou característica 7

Dentro do mesmo conjunto de estímulo, o decréscimo de resposta mostra alguma especificidade ao estímulo. Para testar a especificidade/generalização do estímulo, um segundo estímulo novo é apresentado e uma comparação é feita entre as alterações nas respostas ao

estímulo habituado e a novidade (desabituação) (RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966).

#### 1.1.8 Critério ou característica 8

A apresentação de um estímulo diferente resulta em um aumento da resposta que estava diminuída ao estímulo original. Este fenômeno é denominado "desabituação". É importante notar que o teste apropriado para a desabituação é um aumento na resposta ao estímulo original e não um aumento na resposta ao estímulo desestabilizador (ver ponto 7 acima). De fato, o estímulo desestimulante por si só não precisa nem mesmo desencadear a resposta por conta própria.

#### 1.1.9 Critério ou característica 9

Após a aplicação repetida do estímulo desequilibrador, a quantidade de desabituação reduz (esse fenômeno pode ser chamado de habituação de desabituação).

#### 1.1.10 Critério ou característica 10

Alguns protocolos de repetição do estímulo podem resultar em decréscimo da resposta (por exemplo, reabilitação mais rápida aos valores basais, respostas iniciais menores que a basais, respostas médias menores que as basais, respostas menos frequentes que as basais) que podem durar horas, dias ou semanas. Essa permanência destes aspectos de habituação é denominada habituação de longo prazo.

## 1.2 Neuroplasticidade ao estresse

O estresse promove respostas autônomas, endócrinas e comportamentais; que geradas e controladas por diversos circuitos cerebrais e sistemas neuroquímicos (CRESTANI, 2016; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009) Os estressores emocionais (psicológicos) exigem interpretação por modalidades sensoriais exteroceptivos (interação com ambiente a sua volta) e integração com distintas cognições (experiências pregressas) e sistemas de processamento de informações afetivas (experiências positiva ou negativa) no cérebro (DAYAS; BULLER; DAY, 2001; HERMAN; CULLINAN, 1997; SAWCHENKO; LI; ERICSSON, 2000). Alguns modelos animais de estresse psicológico comuns descritos na literatura incluem o estresse de restrição, o choque nas patas (estresse condicionado), estresse sonoro e a derrota social. Considerando que cada classe de estressor recruta efetores do tronco encefálico e hipotalâmico para ativação eixo HPA, os estressores emocionais manifestam ampla ativação do prosencéfalo límbico e correspondem a uma ampla gama de mudanças comportamentais (CAMPEAU; WATSON, 1997; CULLINAN et al., 1995; DAYAS; BULLER; DAY, 2001; LI; SAWCHENKO, 1998). Os estressores emocionais (psicológicos) são ainda mais diferenciados pela capacidade de induzir alterações a longo prazo nas redes cerebrais. As regiões cerebrais integradoras para contextualizar a exposição repetitiva ao estresse homotípico podem diminuir rapidamente as respostas neurais a estímulos sensoriais. Esse controle sensorial alterado produziria respostas atenuadas (habituação) ao desafio de estresse homotípico. (GIROTTI et al., 2006). Dentre os núcleos cerebrais que apresentam mudança na expressão de C-Fos (indica ativação da área) ao estresse crônico estão: córtex pré-frontal, septo lateral, núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), córtex orbital (GIROTTI et al., 2006); todas regiões que estão envolvidas nas respostas ao estresse psicológico.

Vários estudos demonstraram que o estresse pode causar alterações funcionais e estruturais na região do hipocampo do cérebro (MCEWEN, 1999). Essas mudanças estruturais incluem distúrbios de atrofia e neurogênese (LUPIEN; LEPAGE, 2001). Além disso, o estresse crônico e, conseqüentemente, o aumento constante no cortisol plasmático, levam a redução no número de ramos dendríticos (WOOLLEY; GOULD; MCEWEN, 1990) e no número de neurônios (SAPOLSKY et al., 1990), bem como alterações na estrutura nos terminais sinápticos (SAPOLSKY et al., 1990) e diminuição da neurogênese no tecido do hipocampo (GOULD; TANAPAT, 1999).

### 1.3 Respostas cardiovasculares ao estresse crônico

As respostas fisiológicas e comportamentais durante a exposição aguda ao estresse constituem importantes respostas adaptativas, para manutenção da homeostase e assegurar a sobrevivência (MCEWEN, 1998b; STERLING, 2012). Entretanto, a ativação frequente e/ou prolongada podem gerar respostas inadequadas e/ou insuficientes durante exposição a eventos estressantes, o que pode acarretar no desenvolvimento de doenças (DANESE; MCEWEN, 2012; MCEWEN, 1998a). A ativação frequente e/ou prolongada ocorre durante a exposição repetida a situações aversivas (isto é, estresse crônico) (MCEWEN, 1998a). A exposição aguda a situações de estresse pode levar a eventos cardiovasculares agudos, como arritmias ventriculares, infarto agudo do miocárdio e cardiomiopatia (lesões no músculo cardíaco) (LAGRAAUW; KUIPER; BOT, 2015; MOSTOFSKY; PENNER; MITTLEMAN, 2014; SGOIFO et al., 1997, 1999; UYAMA et al., 2002). Entretanto, alterações cardiovasculares duradouras (dias a anos) são provocadas principalmente pela exposição prolongada a eventos estressores (NALIVAICO, 2011). Portanto, a frequência de exposição ao estresse (cronicidade) é um fator importante na determinação do padrão de doenças cardiovasculares induzidas por estresse. Estudos nossos e de outros grupos de pesquisa têm demonstrado que a exposição a protocolos crônicos de estresse causam diversas alterações na atividade autônoma e na função cardiovascular, incluindo: desbalanço na atividade autônoma cardíaca no sentido de aumento da contribuição simpática, aumento nos valores basais de pressão arterial e FC, comprometimento na função barorreflexa, disfunção vascular e cardiomiopatias (DUARTE et al., 2015; SGOIFO et al., 2014; CRESTANI, 2016; CARNEVALI et al., 2017).

Como mencionado acima, a adaptação ao estresse crônico é amplamente determinada pelo processo de habituação, que limita o impacto a longo prazo do estresse, diminuindo as implicações deletérias para a sobrevivência e o bem-estar (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; HERMAN, 2013; MCCARTY, 2016). Desse modo, uma possível ausência de habituação das respostas cardiovasculares durante a exposição repetida a situações aversivas pode constituir fator de risco para o desenvolvimento de patologias cardiovasculares. Entretanto, a existência ou ausência de habituação das respostas cardiovasculares ainda é um assunto controverso na literatura. Nesse sentido, as evidências de que o estresse crônico altera a ativação de regiões encefálicas (neuroplasticidade) envolvidas na geração e controle das respostas cardiovasculares ao estresse suporta a ideia de uma habituação dessas respostas durante a exposição repetida ao mesmo estímulo aversivo. Pensando ainda, que outros fatores

podem influenciar esta resposta de habituação como: experiências com outros estressores (bons ou ruins), as características individuais (sexo, idade e outras linhagens). Já foi demonstrado que o exercício físico (estresse bom) promove neuromodulações em regiões encefálicas (HEIJNEN et al., 2016) podendo assim alterar a resposta de habituação ao estresse psicológico. No mesmo sentido a idade que o animal tem quando é exposto ao estresse pode alterar a resposta ao estresse (CRUZ et al., 2016) e outras linhagens de ratos e fêmeas já demonstraram que têm maior responsividade do eixo HPA em resposta ao estresse (FARADAY, 2002). Desse modo, no presente estudo nós testamos a hipótese de que as respostas cardiovasculares habituem durante a exposição repetida ao estresse por restrição; e o processo de habituação é determinado pela duração, frequência e número de sessões de restrição; pela linhagem, idade e sexo dos animais; bem como pela co-exposição a outros estressores crônicos ou a um protocolo de treinamento físico em esteira. Nós também avaliamos a resposta sérica de corticosterona após a exposição repetida ao estresse de restrição, com o intuito de reproduzir os dados bem descritos na literatura de habituação da ativação do eixo HPA (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; MCCARTY, 2016; RABASA et al., 2015).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a habituação das respostas cardiovasculares (pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura cutânea cauda) durante a exposição repetida ao estresse de restrição em ratos.

### 2.2 Objetivos específicos

Reproduzir os dados bem-descritos na literatura de habituação da resposta de corticosterona circulante durante a exposição repetida ao estresse de restrição.

#### 2.2.1 Bloco 1: estudos da influência da duração, número de sessões e frequência de exposição ao estresse de restrição no processo de habituação do sistema cardiovascular

Investigar a influência do tempo de duração das sessões de estresse de restrição (30, 60 e 120 minutos) no processo de habituação das respostas cardiovasculares (PAM, FC e temperatura cutânea da cauda) a 10 sessões de estresse.

Avaliar a influência do número de sessões (5, 10 e 20 dias) com duração de 60 minutos de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares (PAM, FC e temperatura cutânea da cauda).

Avaliar a influência da frequência de apresentação de 10 sessões de 60 minutos de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares (PAM, FC e temperatura cutânea da cauda).

2.2.2 Bloco 2: estudo da influência da exposição a outros estressores no processo de habituação do sistema cardiovascular ao estresse de restrição

Avaliar a influência da exposição a outros estressores (estresse crônico variado e isolamento social) e ao treinamento físico em esteira na habituação das respostas cardiovasculares (PAM, FC e temperatura cutânea da cauda) ao estresse de restrição repetido.

2.2.3 Bloco 3: estudo da influência de características individuais dos animais (sexo, idade e linhagem) no processo de habituação do sistema cardiovascular ao estresse de restrição

Avaliar influência do sexo na habituação das respostas cardiovasculares (PAM, FC e temperatura cutânea da cauda) ao estresse de restrição repetido.

Avaliar influência da idade dos animais (adolescentes, adultos e idosos) na habituação das respostas cardiovasculares (PAM, FC e temperatura cutânea da cauda) ao estresse de restrição repetido.

Investigar a influência das linhagens de ratos (Wistar, SHR, Long-Evans e Holtzman) na habituação das respostas cardiovasculares (PAM, FC e temperatura cutânea da cauda) ao estresse de restrição repetido.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos e ratas Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP); e ratos Long-Evans, Holtzman e espontaneamente hipertensos (do inglês, SHR) provenientes Biotério Central do Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (Araraquara/SP). Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP) 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 aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFAR/UNESP sob o protocolo 19/2017.

#### 3.2 Estressores

##### 3.2.1 Estresse de restrição

O estresse por restrição agudo consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos com as seguintes características: diâmetro=6,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de  $\frac{1}{2}$  polegada que preencham aproximadamente 20% do tubo. No presente estudo, os animais foram mantidos por um período de 30 a 120 minutos no tubo de restrição, dependendo do protocolo de experimental (*para detalhes, ver a seção 4*).

##### 3.2.2 Estresse de isolamento social

Os animais do grupo estresse de isolamento social foram separados em caixas individuais por 10 dias, enquanto os animais controle foram alojados continuamente em 4

animais/caixa. Os animais isolados foram mantidos no mesmo Biotério que os animais controle, e mantiveram contato visual, olfatório e auditivo com os demais animais (CRUZ et al., 2016; FONE; PORKESS, 2008). Os animais foram perturbados somente para a limpeza das caixas, que foi realizada duas vezes por semana para os animais controle e uma vez na semana para os animais isolados (CRUZ et al., 2016; FONE; PORKESS, 2008).

### 3.2.3 *Estresse crônico variado*

O estresse crônico variado (ECV), modificado de Marin e colaboradores (MARIN; CRUZ; PLANETA, 2007), foi realizado mediante a exposição diária a diferentes estressores, alternando os estressores durante 10 dias consecutivos. A Tabela 1 apresenta o protocolo completo de ECV. 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. Todas as sessões de estresse foram realizadas em uma sala separada do biotério.

Tabela 1 – Protocolo de estresse crônico variável

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

### 3.3 Treinamento físico em esteira

Inicialmente, todos os animais foram familiarizados com o exercício em esteira rolante (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil) por um período de uma semana. Durante o período de familiarização, os animais correram diariamente na esteira a uma velocidade de 0,3 km/h e 0% de inclinação por 10 min. Nenhuma estimulação elétrica foi usada para induzi-los a correr (CAMARGO et al., 2013; ENGI; PLANETA; CRESTANI, 2016). Em seguida, os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo progressivo, que consistiu em corrida em esteira com 0,3 km/h de incremento a cada 3 min até a exaustão. (ENGI; PLANETA; CRESTANI, 2016). Após o primeiro teste máximo, os animais foram alocados aleatoriamente em “sedentários” e “treinados” (ambos os grupos possuíam a mesma capacidade física antes do início do treinamento).

Os animais alocados nos grupos “treinados” foram submetidos a treinamento de baixa intensidade (50-60% da capacidade máxima, inclinação de 0%) na esteira 1 h/dia, 5 dias/semana durante 8 semanas (ENGI; PLANETA; CRESTANI, 2016). Os grupos sedentários foram submetidos uma vez por semana a um curto período de exercício leve (10 min, 0,5 km/h, inclinação 0%) para mantê-los familiarizados ao ambiente da esteira e aos procedimentos experimentais. O teste de corrida máxima progressiva foi repetido nas semanas 2, 4 e 6 para ajustar a intensidade do treinamento, bem como para avaliar a eficácia do treinamento por meio da comparação da capacidade máxima dos grupos sedentários versus treinados. O teste de corrida máxima também foi realizado no final do protocolo (semana 8), a fim de confirmar a eficácia do treinamento e avaliar o efeito da exposição ao estresse crônico de restrição na capacidade física dos animais.

### 3.4 Preparação cirúrgica

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/Kg, i.p.) e foi implantado um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares. O cateter foi constituído por segmentos de polietileno PE-10 (4-5cm) soldados a um segmento de polietileno PE-50 (12-13 cm) (Clay Adams, EUA), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal. Após

a implantação do cateter, este foi exteriorizado na região dorsal do animal e fixado à pele por sutura cirúrgica. Os animais foram mantidos em caixas individuais após a cirurgia. Como medida profilática, os animais receberam 0,3 mL do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil) pela via subcutânea.

### **3.5 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca**

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (DPT100, Utah Medical Products Inc., EUA). 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). Os valores de pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos a partir dos sinais da pressão arterial pulsátil.

### **3.6 Registro da temperatura cutânea da cauda**

O aumento da atividade simpática vasomotora durante ameaças aversivas diminui o fluxo sanguíneo cutâneo (BLESSING, 2003) que, por sua vez, diminui a temperatura da pele (BUSNARDO et al., 2019; GOMES-DE-SOUZA et al., 2016). Desse modo, a diminuição da temperatura cutânea da cauda foi avaliada como uma medida indireta da resposta simpática vasomotora em leitões cutâneos durante o estresse de restrição.

Os registros da temperatura cutânea da cauda foram feitos utilizando uma câmera termográfica (IRI4010, Inglaterra). A análise foi feita através de um software para análise termográfica, e a temperatura foi representada por variações de intensidade de cor (BUSNARDO et al., 2013; VIANNA; CARRIVE, 2005). Para análise das imagens, a medida de temperatura foi realizada em 5 pontos da cauda do animal, e a média foi calculada para cada registro (BENINI et al., 2019).

### 3.7 Dosagem corticosterona sérica

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

### 3.8 Análise dos dados

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os valores basais de PAM, FC e temperatura da pele da cauda foram comparados utilizando o teste *t* de Student, ANOVA monofatorial ou ANOVA bifatorial. Os efeitos do estresse de restrição nos parâmetros cardiovasculares são apresentados como alterações dos valores basais. Os valores basais foram obtidos calculando a média dos valores registrados durante os 10 minutos anteriores ao início da restrição. Os valores basais foram subtraídos dos valores registrados durante o estresse para obtenção da variação causada pelo estresse de restrição. As curvas temporais das alterações cardiovasculares foram analisadas usando ANOVA bifatorial ou ANOVA multifatorial. As médias de todos os pontos do estresse de restrição ou do período de recuperação das curvas temporais também foram calculadas (ou seja, resposta média ao longo do estresse e do período de recuperação) e esses valores foram comparados entre os grupos usando ANOVA bifatorial ou multifatorial. Quando a análise ANOVA indicou efeito, o pós-teste de Bonferroni foi utilizado para identificação de diferenças específicas entre os grupos experimentais. A significância foi estabelecida em  $P < 0,05$ .

## 4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 4.1 Habituação da resposta de corticosterona sérica durante a exposição repetida ao estresse de restrição

Este protocolo teve como objetivo avaliar a habituação da ativação do eixo HPA durante a exposição repetida ao estresse de restrição. Para isso, avaliamos o aumento da concentração sérica de corticosterona evocado pelo estresse de restrição em diferentes grupos submetidos a uma sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição (grupo agudo) ou 10 sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição (ERR). As respostas à corticosterona do grupo ERR foram avaliadas na 10ª sessão de restrição e comparadas com os valores obtidos no grupo agudo. Amostras de sangue (~ 200 µL) para a determinação da concentração sérica de corticosterona foram coletadas imediatamente antes (concentração basal) e 15, 45, 60, 80, 100 e 120 min após o início da sessão de restrição tanto no grupo agudo quanto no ERR.

### 4.2 Bloco 1:

#### 4.2.1 Estudo da influência da duração da sessão do estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares

Os animais foram submetidos a 10 sessões diárias de estresse de restrição com duração de 30, 60 ou 120 minutos. Após a penúltima sessão de estresse, os animais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral. Vinte quatro horas após a cirurgia, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular e foi realizado um registro dos parâmetros basais de pressão arterial e FC por 30 minutos. Em seguida, os animais foram expostos à 10ª sessão de estresse de restrição, com duração igual às nove sessões realizadas anteriormente. Depois do estresse, os animais retornaram para a caixa moradia e o registro cardiovascular foi realizado por mais 60 minutos (período de recuperação). A temperatura cutânea da cauda foi mensurada a cada 10 minutos durante todo período de registro cardiovascular. Grupos controle (agudo) foram expostos a uma sessão aguda de estresse de restrição com duração de 30, 60 ou

120 minutos juntamente com os animais estressados cronicamente. Logo após o término do registro cardiovascular, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico.

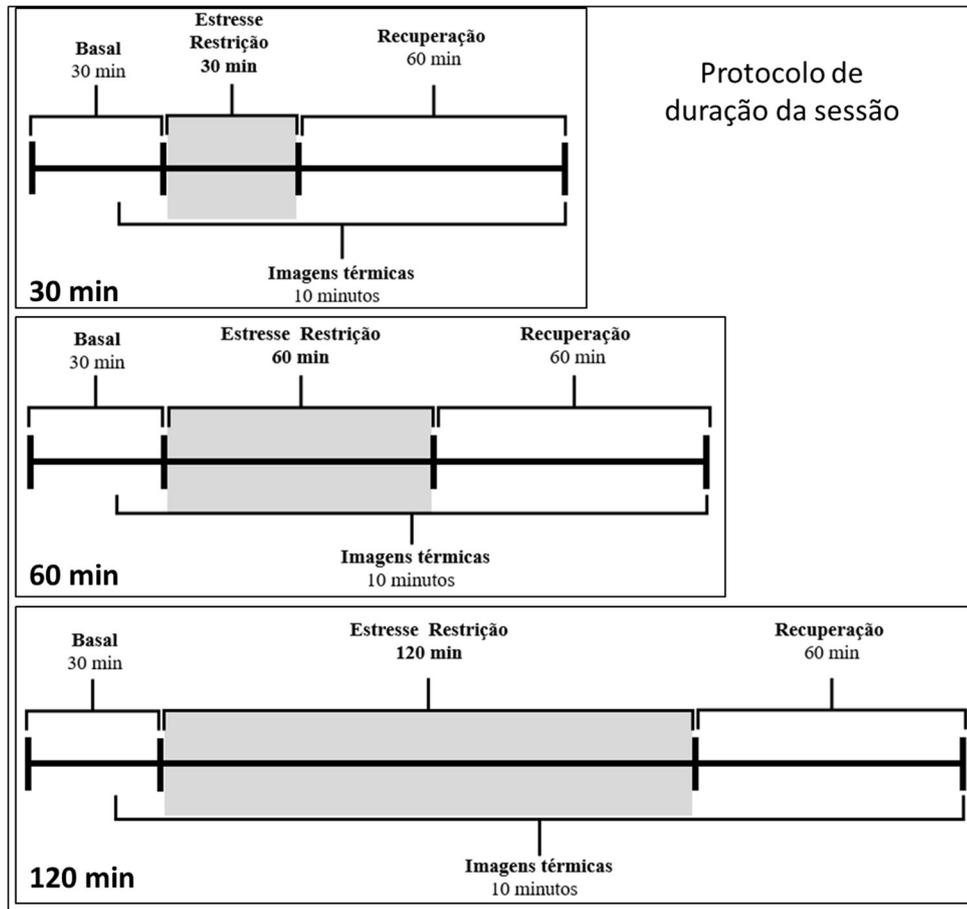


Figura 1 - Desenho experimental da influência da duração da sessão de estresse de restrição na resposta de habituação.

#### 4.2.2 Estudo da influência do número de sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares

Os animais foram submetidos a sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição por 5, 10 ou 20 dias. Após a penúltima sessão de estresse, os animais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral. Vinte quatro horas após a cirurgia, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular e foi realizado um registro dos parâmetros basais de pressão arterial e FC por 30 minutos. Em seguida, os animais foram expostos à última sessão de 60 minutos de estresse de restrição (5<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> ou 20<sup>o</sup> sessão). Depois do estresse, os

animais retornaram para a caixa moradia, e o registro cardiovascular foi realizado por mais 60 minutos (período de recuperação). A temperatura cutânea da cauda foi mensurada a cada 10 minutos durante todo período de registro cardiovascular. O grupo controle (estresse agudo) foi submetido a uma sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição juntamente com os animais estressados cronicamente. Logo após o término do registro cardiovascular, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico.

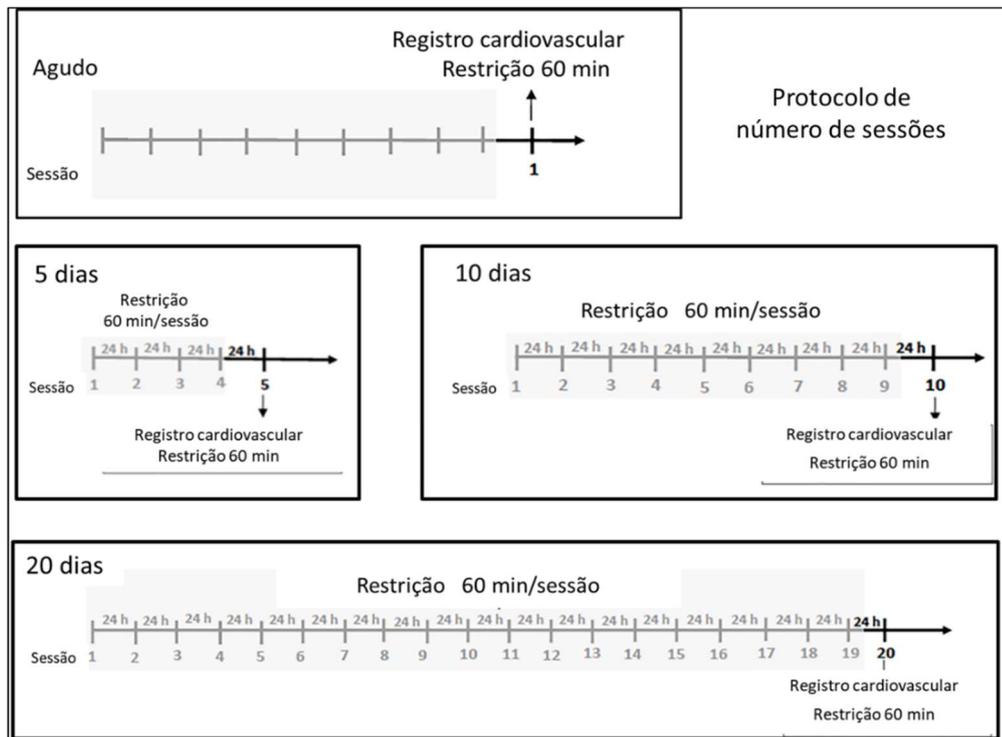


Figura 2 – Desenho experimental da influência do número sessões da resposta de habituação ao estresse

#### 4.2.3 Estudo da influência da frequência de apresentação do estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares

Os animais foram submetidos a 10 sessões de 60 minutos de estresse de restrição, no qual foi apresentado em diferentes frequências. O primeiro grupo foi estressado em dias alternados; o segundo grupo passou por três sessões consecutivas e um dia de intervalo, que se repetiu por mais duas vezes; o terceiro grupo passou duas vezes por cinco sessões consecutivas, com dois dias de intervalo. Após a penúltima sessão de estresse, os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral. Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular e foi

realizado registro dos parâmetros basais de pressão arterial e FC por 30 minutos. Em seguida, os animais em todos os grupos experimentais foram expostos a 10<sup>o</sup> sessão de estresse de restrição. Depois do estresse, os animais retornaram para a caixa moradia, e o registro cardiovascular foi realizado por mais 60 minutos (período de recuperação). A temperatura cutânea da cauda foi mensurada a cada 10 minutos durante todo período de registro cardiovascular. Depois do estresse os animais retornaram para caixa moradia, e o registro cardiovascular foi avaliado por mais 60 minutos (período de recuperação). A temperatura cutânea da cauda foi mensurada a cada 10 minutos durante todo período de registro cardiovascular. O grupo controle (estresse agudo) foi submetido a uma sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição juntamente com os animais estressados cronicamente. Logo após o término do registro cardiovascular, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico.

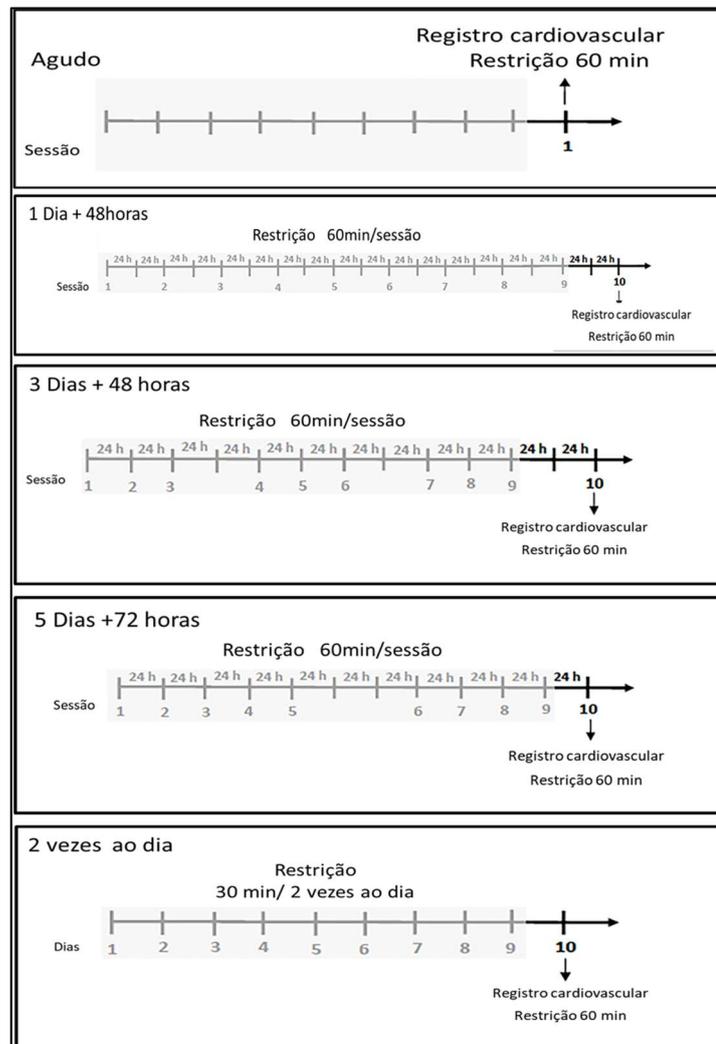


Figura 3 – Desenho experimental da influência da frequência de exposição ao estresse nas respostas de habituação

### 4.3 Bloco 2:

#### 4.3.1 Estudo da influência da exposição a outros estressores ou ao treinamento físico em esteira nas habituações das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

Para avaliação da influência do estresse crônico variado (ECV), os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1) AGUDO: os animais passaram por uma sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição; 2) ERR: os animais passaram por 10 sessões de 60 minutos de estresse de restrição; 3) ECV+AGUDO: os animais passaram pelos 10 dias do protocolo de ECV antes da exposição a uma sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição; 4) ECV+ERR: os ratos passaram pelos 10 dias do protocolo de ECV antes de serem expostos às 10 sessões de 60 minutos de estresse de restrição. O ERR iniciou 24h após a última sessão de ECV.

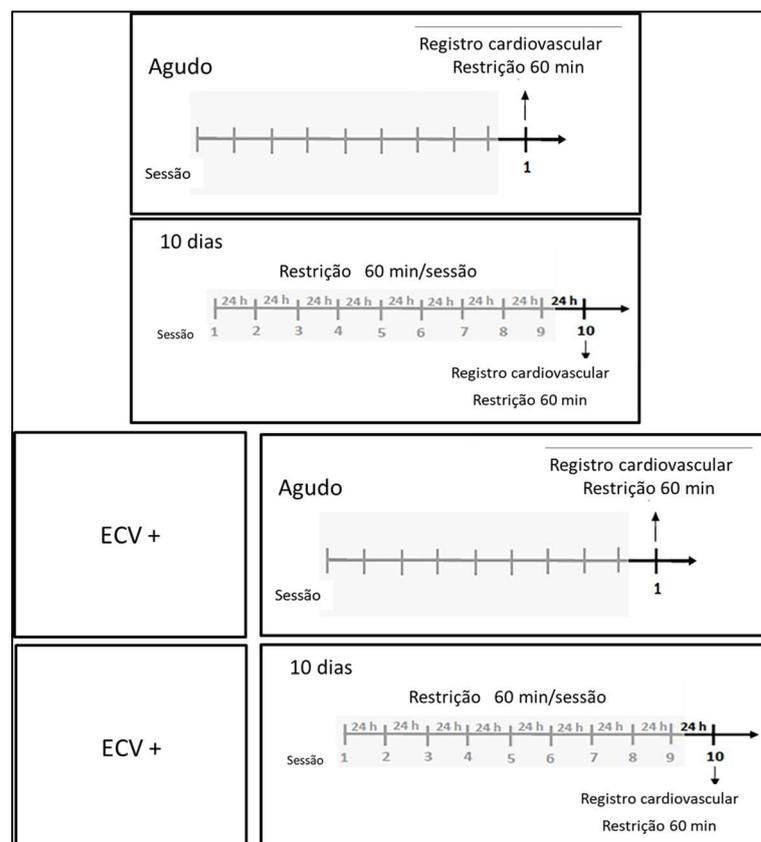


Figura 4- Desenho experimental da influência da exposição previa ao estresse crônico variado na resposta de habituação

Para avaliação da influência do estresse por isolamento social, os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1) AGUDO agrupados: os animais foram alojados em grupo e passaram por uma sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição; 2) ERR agrupados: os animais foram alojados em grupo e passaram por 10 sessões de 60 minutos de estresse de restrição; 3) ISOLADO AGUDO: os animais foram alojados individualmente por 10 dias, e em seguida foram submetidos a uma sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição; 4) ISOLADO ERR: os animais passaram por 10 sessões de 60 minutos de estresse de restrição e permaneceram isolados durante o período do ERR.

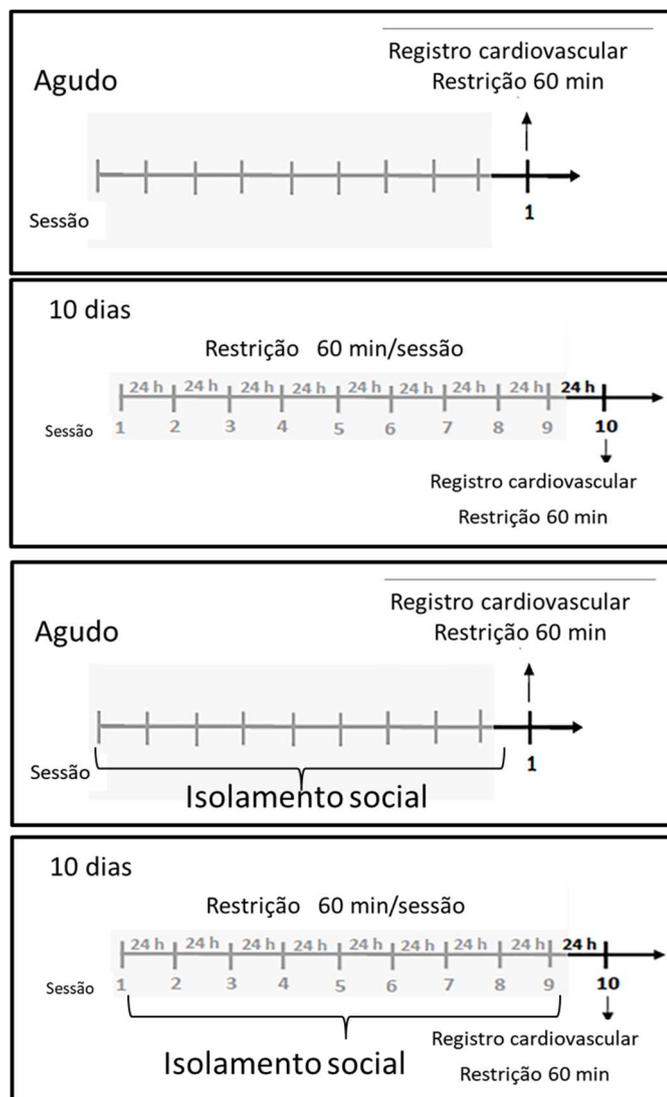


Figura 5- Desenho experimental da influência do isolamento social nas respostas de habituação

No protocolo experimental que avaliou a influência do exercício físico, os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1) SEDENTÁRIO AGUDO: animais sedentários que

passaram por uma sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição; 2) TREINADO AGUDO: os animais passaram pelo protocolo de oito semanas de treinamento físico em esteira e posteriormente foram submetidos a uma sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição; 3) SEDENTÁRIO ERR: animais sedentários passaram por 10 sessões de 60 minutos de estresse de restrição; 4) TREINADO ERR: os animais passaram pelo protocolo de oito semanas de treinamento físico em esteira, e nos últimos 10 dias do treinamento físico foram submetidos a 10 sessões de 60 minutos de estresse de restrição.

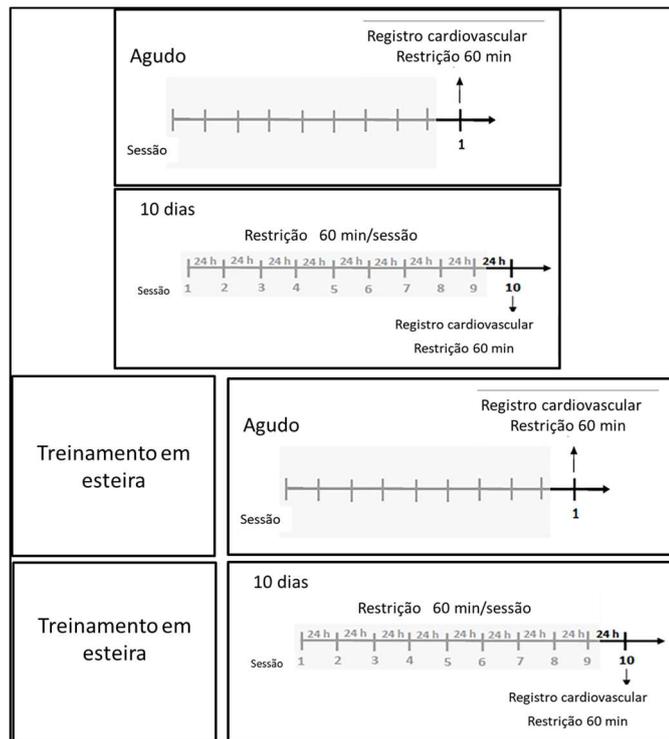


Figura 6- Desenho experimental da influência do treinamento em esteira nas resposta de habituação ao estresse de restrição

Os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral. Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular, e foi realizado registro dos parâmetros basais de pressão arterial e FC por 30 minutos. Em seguida, os animais dos grupos ERR foram submetidos à 10ª sessão de estresse de restrição. Depois do estresse, os animais retornaram para a caixa moradia, e o registro cardiovascular foi realizado por mais 60 minutos (período de recuperação). A temperatura cutânea da cauda foi mensurada a cada 10 minutos durante todo período de registro cardiovascular. Os grupos controle (estresse agudo) foram submetidos a sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição juntamente com os animais estressados cronicamente. Logo

após o término do registro cardiovascular, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico.

#### **4.4 Bloco 3**

##### **4.4.1 Estudo da influência do sexo na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição**

Durante o protocolo experimental as fêmeas não tiveram contato com os machos, e foram alojadas em estante ventiladas Alesco®. Os experimentos nos animais machos e fêmeas foram realizados em dias separados para evitar influência do sexo oposto nas respostas. Para determinação do ciclo estral antes do experimento foi realizada coleta de lavagem vaginal, e a fase do ciclo foi determinada a partir da análise dos tipos de células presentes (F.K.MARCONDES; F.J.BIANCHI; A.P.TANNO, 2002; PACCOLA et al., 2013).

Os animais machos e fêmeas foram submetidos a 10 sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição. Após a penúltima sessão de estresse, os animais de todos os grupos foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral. Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular e foi realizado registro dos parâmetros basais de pressão arterial e FC por 30 minutos. Em seguida, os animais foram expostos à 10ª sessão de estresse de restrição. Depois do estresse, os animais retornaram para a caixa moradia, e o registro cardiovascular foi realizado por mais 60 minutos (período de recuperação). A temperatura cutânea da cauda foi mensurada a cada 10 minutos durante todo período de registro cardiovascular. Os grupos controle (estresse agudo) machos e fêmeas foram submetidos a sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição juntamente com os animais estressados cronicamente. Logo após o término do registro cardiovascular, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico.

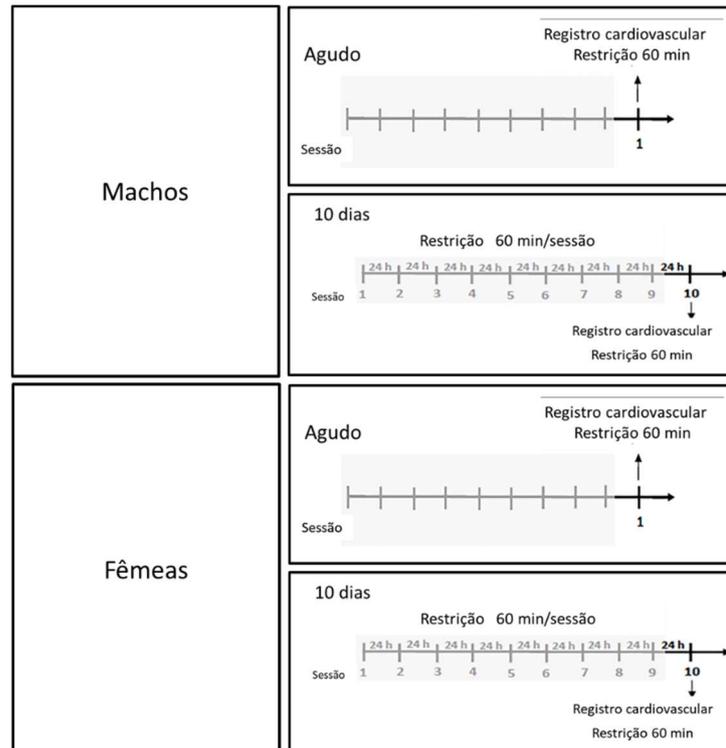


Figura 7 - Desenho experimental da influência do sexo na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

#### 4.4.2 Estudo da influência da idade dos animais (adolescentes, adultos e idosos) na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

Animais adolescentes (30 dias), adultos (10 semanas) (DUARTE et al., 2015; ROMEO et al., 2006; SPEAR, 2000) e idosos (18 meses) (REAVEN, 1988) foram submetidos a 10 sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição. Após a penúltima sessão de estresse, os animais de todos os grupos foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral. Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular, e foi realizado registro dos parâmetros basais de pressão arterial e FC por 30 minutos. Em seguida, os animais foram expostos à 10ª sessão de estresse de restrição. Depois do estresse, os animais retornaram para caixa moradia, e o registro cardiovascular foi realizado por mais 60 minutos (período de recuperação). A temperatura cutânea da cauda foi mensurada a cada 10 minutos durante todo período de registro cardiovascular. Grupos controle (estresse agudo) em cada faixa etária foram submetidos a sessão aguda de 60 minutos de estresse de

restrição juntamente com os animais estressados cronicamente. Logo após o término do registro cardiovascular, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico.

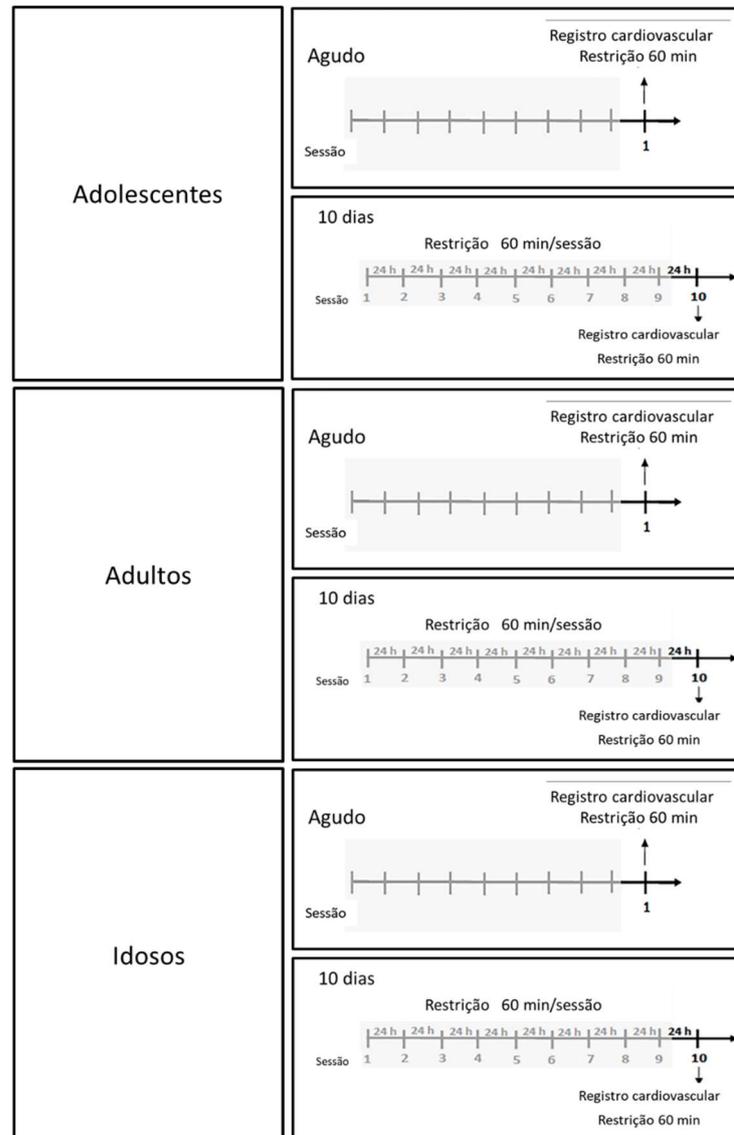


Figura 8 Desenho experimental da influência da idade dos ratos na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

#### 4.4.3 Estudo da influência da linhagem dos ratos na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

Ratos Wistar, SHR, Long -Evans e Holtzman foram submetidos a 10 sessões diárias de 60 minutos de estresse de restrição. Após a penúltima sessão de estresse, os animais de todos os grupos foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral. Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram conectados ao sistema de registro cardiovascular, e foi realizado registro dos parâmetros basais de pressão arterial e FC por 30 minutos. Em seguida, os animais foram expostos à 10ª sessão de estresse de restrição. Depois do estresse, os animais retornaram para a caixa moradia, e o registro cardiovascular foi realizado por mais 60 minutos (período de recuperação). A temperatura cutânea da cauda foi mensurada a cada 10 minutos durante todo período de registro cardiovascular. Grupos controle (estresse agudo) de cada linhagem foram submetidos a sessão aguda de 60 minutos de estresse de restrição juntamente com os animais estressados cronicamente. Logo após o término do registro cardiovascular, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico.

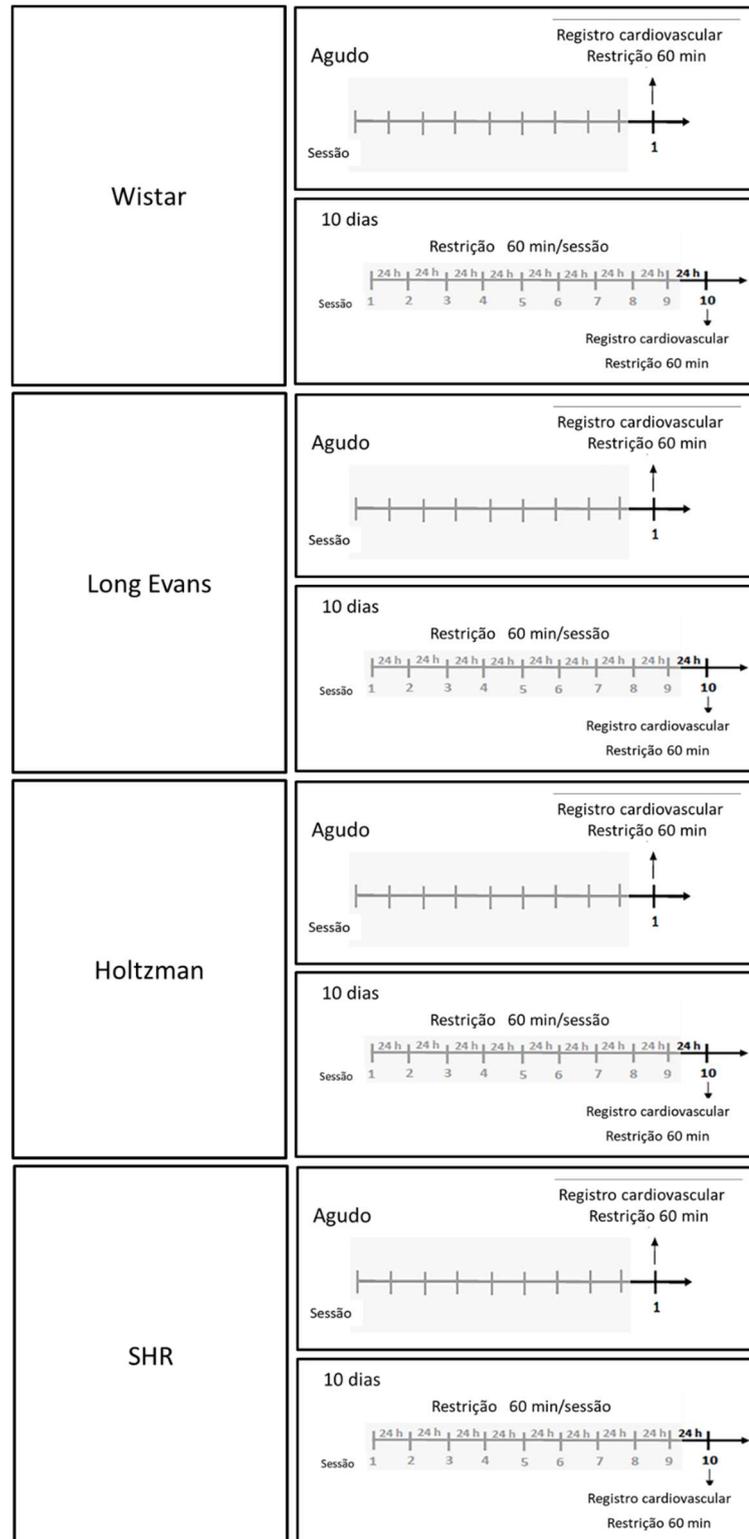


Figura 9 – Desenho experimental da influência da linhagem dos ratos na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Habituação da resposta de corticosterona sérica após exposição repetida ao estresse de restrição

A análise dos valores basais da concentração sérica de corticosterona não indicou diferenças entre os grupos agudo e ERR ( $15\pm 0,5$  vs  $16\pm 0,4$  ng/ml,  $t=0,99$ ,  $P>0,05$ ). No entanto, a análise das curvas temporais de concentração de corticosterona indicou efeito do ERR ( $F_{(1,16)} = 10$ ,  $P < 0,005$ ) e do tempo ( $F_{(6,96)} = 12$ ,  $P < 0,0001$ ), bem como interação tempo x ERR ( $F_{(6,96)} = 3$ ,  $P < 0,01$ ) (Figura 10). A análise post-hoc revelou que os valores do grupo ERR foram menores em relação aos obtidos no grupo agudo (Figura 10).

A análise das médias da resposta de corticosterona sérica durante todo o período de restrição e recuperação indicou efeito do ERR ( $F_{(1,16)} = 10$ ,  $P < 0,006$ ) e do período ( $F_{(1,16)} = 29$ ,  $P < 0,0001$ ), bem como indicou interação entre o período e o ERR ( $F_{(1,16)} = 6$ ,  $P < 0,02$ ) (Figura 10). A análise post-hoc revelou que o grupo ERR apresentou valores menores durante o período de restrição ( $P < 0,0006$ ) e a recuperação ( $P < 0,05$ ) (Figura 10).

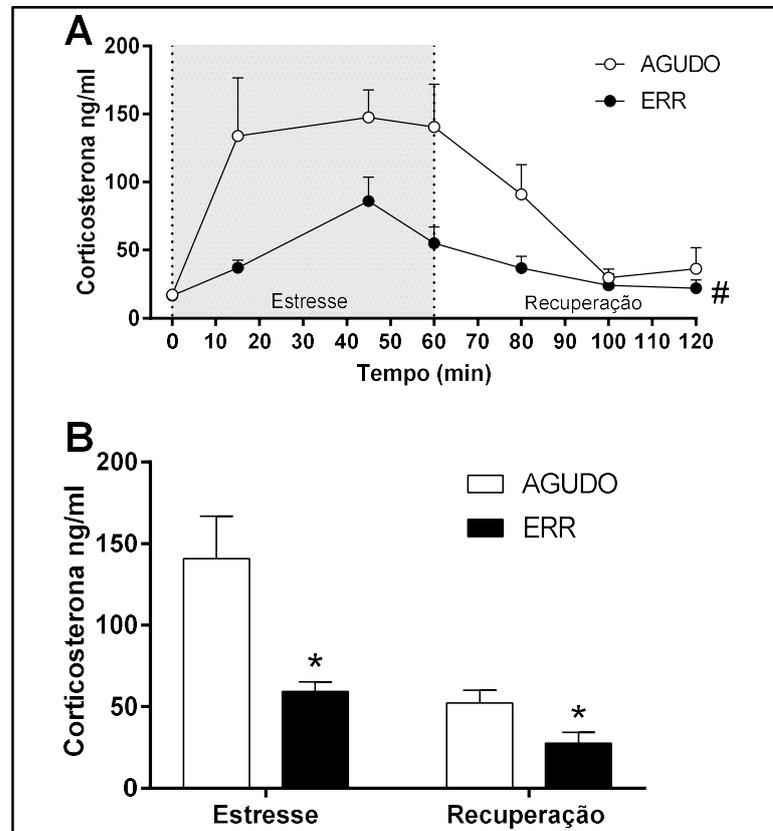


Figura 10- Habituação da resposta da corticosterona sérica ao estresse de restrição.

(A) Curvas temporais das alterações na concentração plasmática de corticosterona na 1ª sessão (Agudo, círculos brancos,  $n = 9$ ) e 10ª sessão (ERR, círculos pretos,  $n = 9$ ) de 60 min de estresse de restrição. Área sombreada indica o período de restrição. Os círculos representam a média e as barras o EPM. #  $P < 0,05$  durante todo o período em comparação com o grupo agudo, ANOVA bifatorial, seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. (B) Valores média da resposta de corticosterona plasmática durante todo o período de restrição e recuperação na 1ª sessão (agudo, barras brancas,  $n = 9$ ) e 10ª sessão (ERR, barras pretas,  $n = 9$ ) de 60 min de estresse de restrição. As barras representam a média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  versus o grupo controle agudo dentro do mesmo período, ANOVA bifatorial, seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni.

## 5.2 Bloco 1: influência da duração, do número e da frequência das sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares

### 5.2.1 Influência da duração das sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares

Dez sessões diárias de 30, 60 ou 120 minutos de restrição estresse não afetou os valores basais de PAM, FC ou temperatura cutânea da cauda, quando comparados com os respectivos grupos agudo (Tabela 2). No entanto, a análise das curvas temporais indicaram que ambos 30, 60 e 120 minutos de restrição tanto na 1ª como na 10ª sessão aumentaram a PAM (30 min:  $F_{(50, 600)} = 16,34$ ,  $p < 0,0001$ ; 60 min:  $F_{(65, 910)} = 11,37$ ,  $p < 0,0001$ ; 120 min:  $F_{(95, 1140)} = 11,19$ ,  $p < 0,0001$ ) e a FC (30 min:  $F_{(50, 600)} = 9,05$ ,  $p < 0,0001$ ; 60 min:  $F_{(65, 910)} = 8,68$ ,  $p < 0,0001$ ; 120 min:  $F_{(95, 1140)} = 05,08$ ,  $p < 0,0001$ ) e diminuíram a temperatura cutânea da cauda (30 min:  $F_{(11, 132)} = 19,45$ ,  $p < 0,0001$ ; 60 min:  $F_{(14, 196)} = 12,46$ ,  $p < 0,0001$ ; 120 min:  $F_{(20, 240)} = 8,44$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 10). Além disso, a análise indicou que a resposta da FC na 10ª sessão em ratos submetido a 60 minutos de restrição foi reduzida quando comparada com o respectivo grupo agudo ( $F_{(1, 14)} = 4,90$ ,  $p < 0,04$ ) (Figura 11).

Análise das respostas médias ao longo do estresse e da recuperação revelou que as respostas de PAM, FC e temperatura cutânea durante o estresse de restrição não foram diferentes na 10ª versus 1ª sessão em ratos submetidos a 30, 60 ou 120 minutos de restrição ( $p > 0,05$ ) (Figura 12). No entanto, os valores da FC em ratos submetidos a 60 ( $p < 0,002$ ) ou 120 minutos ( $p < 0,01$ ) de restrição foram diminuídos no período de recuperação da 10ª sessão (Figura 12). A PAM durante o período de recuperação da 10ª sessão também foi reduzido nos ratos submetidos a 120 minutos de restrição ( $p < 0,03$ ) (Figura 12)

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

	PAM (mmHg)	FC (bpm)	T(°C)	N
<b>Duração</b>				
Agudo 30 min	109±1,9	351±15	30±0,5	7
Crônico 30 min	115±4,8	386±14	30±1,1	7
	$t= 1,2 P>0,05$	$t= 1,7 P>0,05$	$t= 0,5 P>0,05$	
Agudo 60 min	107±1	360±10	28±0,7	8
Crônico 60 min	111±2	384±15	28±0,5	8
	$t= 2 P>0,05$	$t= 1,3 P>0,05$	$t= 0,4 P>0,05$	
Agudo 120 min	108±2,6	358±20	28±0,3	7
Crônico 120 min	116±5,8	363±15	27±0,5	7
	$t= 1,3 P>0,05$	$t= 0,2 P>0,05$	$t= 0,6 P>0,05$	
<b>Volume</b>				
Agudo	104±1,3	368±13	28±0,6	9
5 dias	108±1,8	353±9,4	32±0,5 *	9
10 dias	111±1,7	383±14	28±0,5	9
20 dias	108±1,9	345±6,9	31±0,7*	9
	$F_{(3, 32)} = 2,84$ $P>0,05$	$F_{(3, 32)} = 2,3$ $P>0,05$	$F_{(3, 32)} = 12,7$ $P<0,05$	
<b>Frequência</b>				
Agudo	104±1	367±11	27±0,5	9
Dias alternados	108±2	338±9	30±0,5*	9
3 dias + 48 hrs	108±2	335±8	32±0,5*	9
5 dias + 72hrs	102±2	365±6	30±0,6*	9
Duas vezes ao dia	108±2	349±12	28±0,4	9
	$F_{(4, 40)} = 2,6$ $P>0,05$	$F_{(4, 40)} = 2,3$ $P>0,05$	$F_{(4, 40)} = 10,76$ $P<0,05$	

N= Número de ratos por grupo; \* P < 0,05 vs respectivo grupo agudo. Teste *t* de Student (Protocolo de duração) ou ANOVA monofatorial (protocolos de volume e frequência).

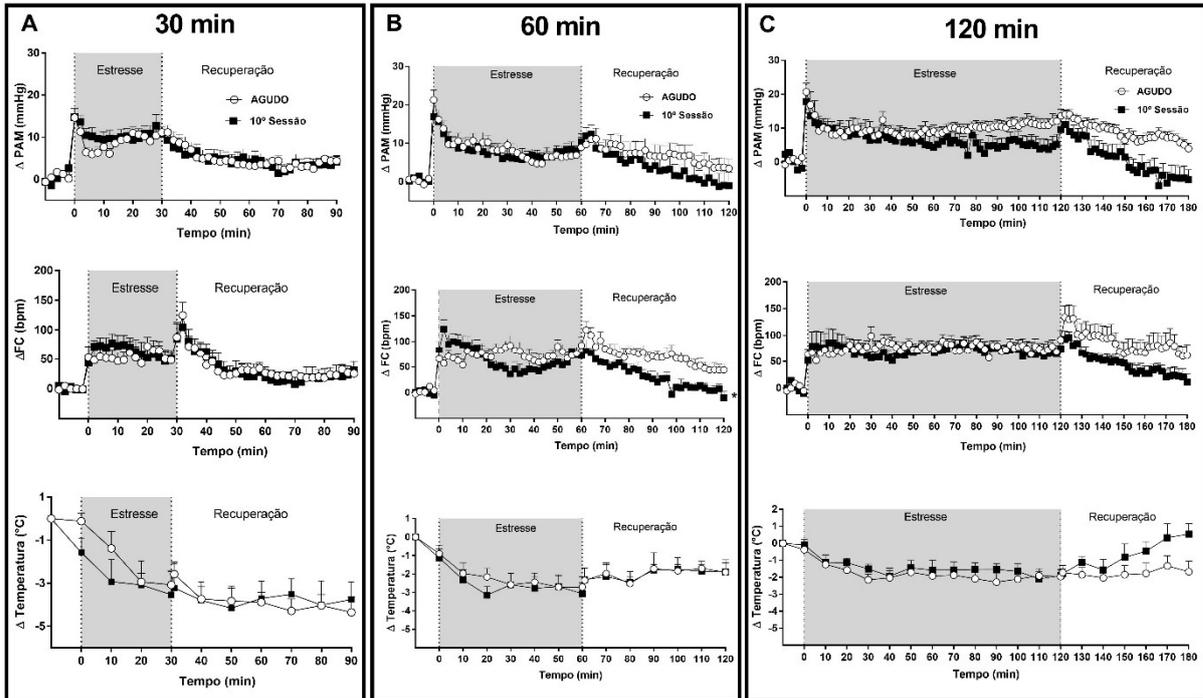


Figura 11-Influência da duração das sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares.

(A) Curvas temporais de pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$  temperatura cauda) na 1ª (Agudo, círculos brancos,  $n = 7$ ) e 10ª sessão (círculos pretos,  $n = 7$ ) de 30 minutos de estresse de restrição. (B) Curvas temporais de  $\Delta$ PAM,  $\Delta$ FC e  $\Delta$  temperatura da cauda na 1ª (agudo, círculos brancos,  $n = 8$ ) e 10ª sessão (círculos pretos,  $n = 8$ ) de 60 minutos de estresse de restrição. (C) Curvas temporais de  $\Delta$ PAM,  $\Delta$ FC e  $\Delta$  temperatura da cauda na 1ª (agudo, círculos brancos,  $n = 7$ ) e 10ª sessão (círculos pretos,  $n = 7$ ) de 120 minutos de estresse por restrição. Área sombreada indica o período de restrição. Os círculos representam a média e as barras o EPM. \*  $P < 0,05$  durante todo o período de registro em comparação com o grupo agudo, ANOVA bifatorial, seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

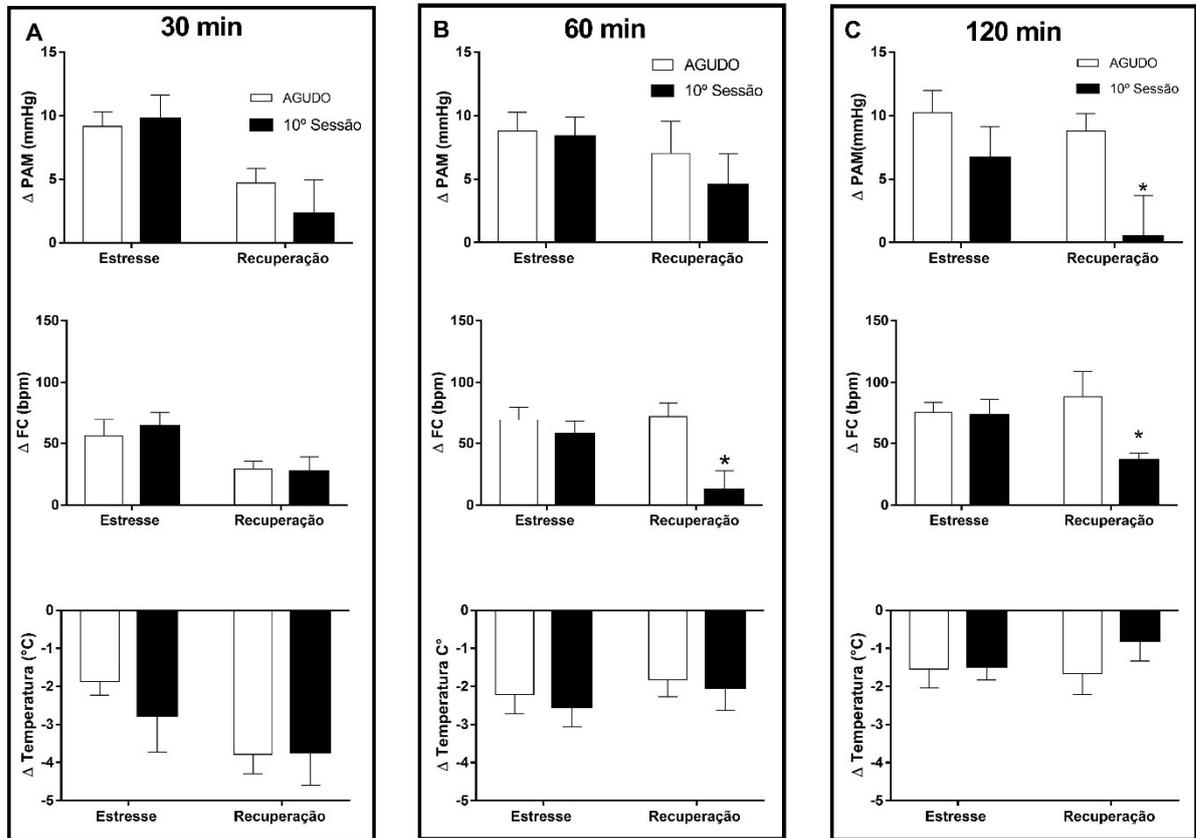


Figura 12- Influência da duração das sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares.

(A) Média da resposta de ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$  temperatura cauda) durante o período de estresse e de recuperação na 1ª (Agudo, barras brancas,  $n = 7$ ) e 10ª sessão (barras pretas,  $n = 7$ ) de 30 minutos de estresse de restrição. (B) Média da resposta de  $\Delta$ PAM,  $\Delta$ FC e  $\Delta$  temperatura da cauda durante o período de estresse e de recuperação na 1ª (Agudo, barras brancas,  $n = 8$ ) e 10ª sessão (barras pretas,  $n = 8$ ) de 60 minutos de estresse de restrição. (C) Média da resposta de  $\Delta$ PAM,  $\Delta$ FC e  $\Delta$  temperatura da cauda durante o período de estresse e de recuperação na 1ª (Agudo, barras brancas,  $n = 7$ ) e 10ª sessão (barras pretas,  $n = 7$ ) de 120 minutos de estresse por restrição. Área sombreada indica o período de restrição. Os círculos representam a média e as barras o EPM. \*  $P < 0,05$  durante todo o período de registro em comparação com o grupo agudo, ANOVA bifatorial, seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

### 5.2.2 Influência do número de sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares

Sessões diárias de estresse de restrição de 60 minutos por 5, 10 ou 20 dias não afetaram os valores basais de PAM e FC, quando comparados com o grupo agudo (Tabela 2). No entanto, a temperatura cutânea da cauda foi aumentada em ratos submetidos a 5 ou 20 dias de estresse de restrição (Tabela 2).

A análise das curvas temporais indicaram que o estresse de restrição aumentou a PAM ( $F_{(65, 2080)}=44,11$ ,  $p < 0,0001$ ) e a FC ( $F_{(65, 2080)}=24,90$ ,  $p < 0,0001$ ), e causou diminuição na temperatura cutânea da cauda ( $F_{(14, 448)}=32,57$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 13). A análise indicou uma interação significativa entre o tempo e o protocolo de estresse para PAM ( $F_{(195, 2080)}=1,83$ ,  $p < 0,0001$ ), FC ( $F_{(195, 2080)}=2,5$ ,  $p < 0,0001$ ) e temperatura da pele ( $F_{(42, 448)}=2,04$ ,  $p < 0,0002$ ). No entanto, a análise não indicou efeito dos protocolos de estresse para as respostas de PAM ( $F_{(3, 32)}=0,76$ ,  $p > 0,05$ ), FC ( $F_{(3, 32)}=1,39$ ,  $p > 0,05$ ) ou temperatura da pele ( $F_{(3, 32)}=1,19$ ,  $p > 0,05$ ) (Figura 13).

A análise das médias das respostas ao longo do estresse e do período de recuperação revelaram que a PAM ( $p > 0,05$ ), FC ( $p > 0,05$ ) e a temperatura cutânea da cauda ( $P > 0,05$ ) não foram diferentes entre os grupos experimentais durante o estresse de restrição (Figura 13). No entanto, a FC durante o período de recuperação em ratos submetido a 10 dias de estresse de restrição foi reduzida em comparação com o grupo agudo ( $p < 0,008$ ) (Figura 13).

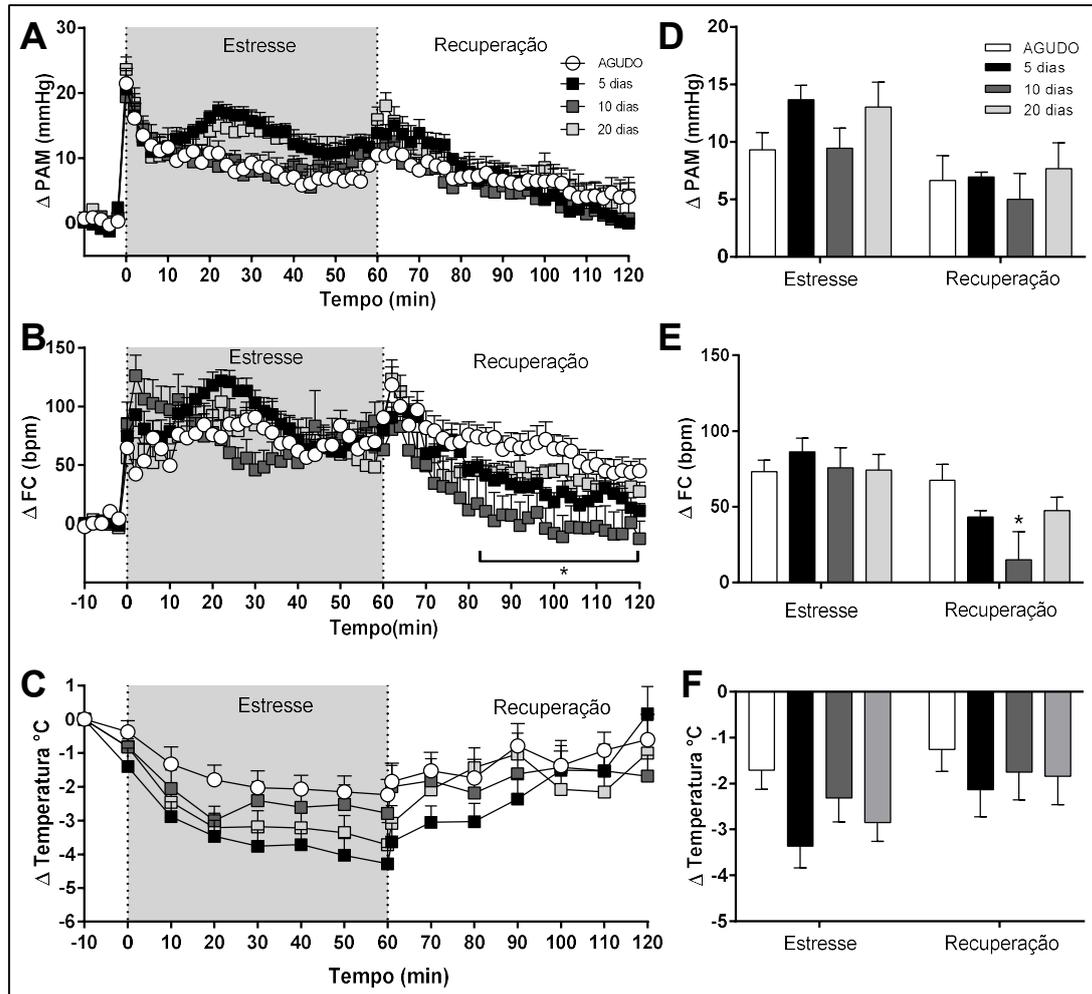


Figura 13-Influência do número de sessões de estresse de restrição (volume) na habituação das respostas cardiovasculares.

(A, B, C) Curvas temporais da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$  temperatura da cauda) na 1ª (aguda, círculos brancos,  $n = 9$ ), 5ª (quadrados pretos,  $n = 9$ ), 10ª (quadrados cinza escuro,  $n = 9$ ) e 20ª (quadrados cinza claro,  $n = 9$ ) sessão de 60 min de estresse de restrição. Área sombreada indica o período de restrição. Os círculos representam a média e as barras o EPM. \*  $P < 0,05$  versus o grupo agudo, ANOVA bifatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. (D, E, F) Média da resposta  $\Delta$ MAP,  $\Delta$ FC e  $\Delta$  temperatura cauda ao longo do período de estresse e recuperação no 1ª (barras brancas, agudas,  $n = 9$ ), 5ª (barras pretas,  $n = 9$ ), 10ª (barras cinzas escuro,  $n = 9$ ) e 20ª (barras cinza claro,  $n = 9$ ) sessão de 60 min de estresse de restrição. As barras representam a média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  versus o respectivo grupo agudo, ANOVA bifatorial, seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

### 5.2.3 Influência da frequência de apresentação das sessões de estresse de restrição na habituação das respostas cardiovasculares

Os valores basais de PAM e FC não foram afetados pelos diferentes protocolos de estresse crônico de restrição, quando comparados com o grupo agudo (Tabela 2). No entanto, a temperatura cutânea da cauda basal foi aumentada em ratos submetidos a repetidas sessões de estresse de restrição com duração de 60 minutos realizadas em dias alternados, 3 dias seguidos de um dia de repouso (3 dias + 48 h grupo) e 5 dias seguidos de dois dias de repouso (5 dias + 72h) (Tabela 2).

As análises das curvas temporais indicaram que o estresse de restrição aumentou a PAM ( $F_{(65, 2600)} = 35,51$ ,  $p < 0,0001$ ) e FC ( $F_{(65, 2600)} = 31,63$ ,  $p < 0,0001$ ), e causou diminuição na temperatura cutânea da cauda ( $F_{(14, 560)} = 39,80$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 14). A análise também indicou uma interação entre o tempo e o protocolo de estresse para a PAM ( $F_{(260, 2600)} = 1,48$ ,  $p < 0,0001$ ), FC ( $F_{(260, 2600)} = p < 0,0001$ ) e temperatura cutânea ( $F_{(56, 560)} = 1,49$ ,  $p < 0,01$ ). Além disso, a análise indicou um efeito dos protocolos de estresse na resposta de FC ( $F_{(4, 40)} = 8,12$ ,  $p < 0,0001$ ), mas não na PAM ( $F_{(4, 40)} = 0,99$ ,  $p > 0,05$ ) e temperatura cutânea ( $F_{(4, 40)} = 0,45$ ,  $p > 0,05$ ) (Figura 14). A análise *post hoc* revelou que a resposta da FC foi aumentada em ratos submetido a repetidas sessões de estresse de restrição apresentados em dias alternados ( $p < 0,05$ ), enquanto esta resposta foi diminuída no grupo 5 dias + 72 h ( $p < 0,05$ ) (Figura 14).

A análise das médias das respostas ao longo do estresse e no período de recuperação revelaram que o aumento da FC durante o estresse foi maior em ratos submetidos ao ERR apresentado em dias alternados ( $p > 0,03$ ), enquanto a taquicardia durante a restrição foi diminuída no grupo de 5 dias + 72 h ( $p > 0,04$ ) (Figura 14). A PAM ( $p > 0,05$ ), FC ( $p > 0,05$ ), e temperatura da pele ( $p > 0,05$ ) durante o período de recuperação não foram afetadas por nenhum dos protocolos de ERR (Figura 14).

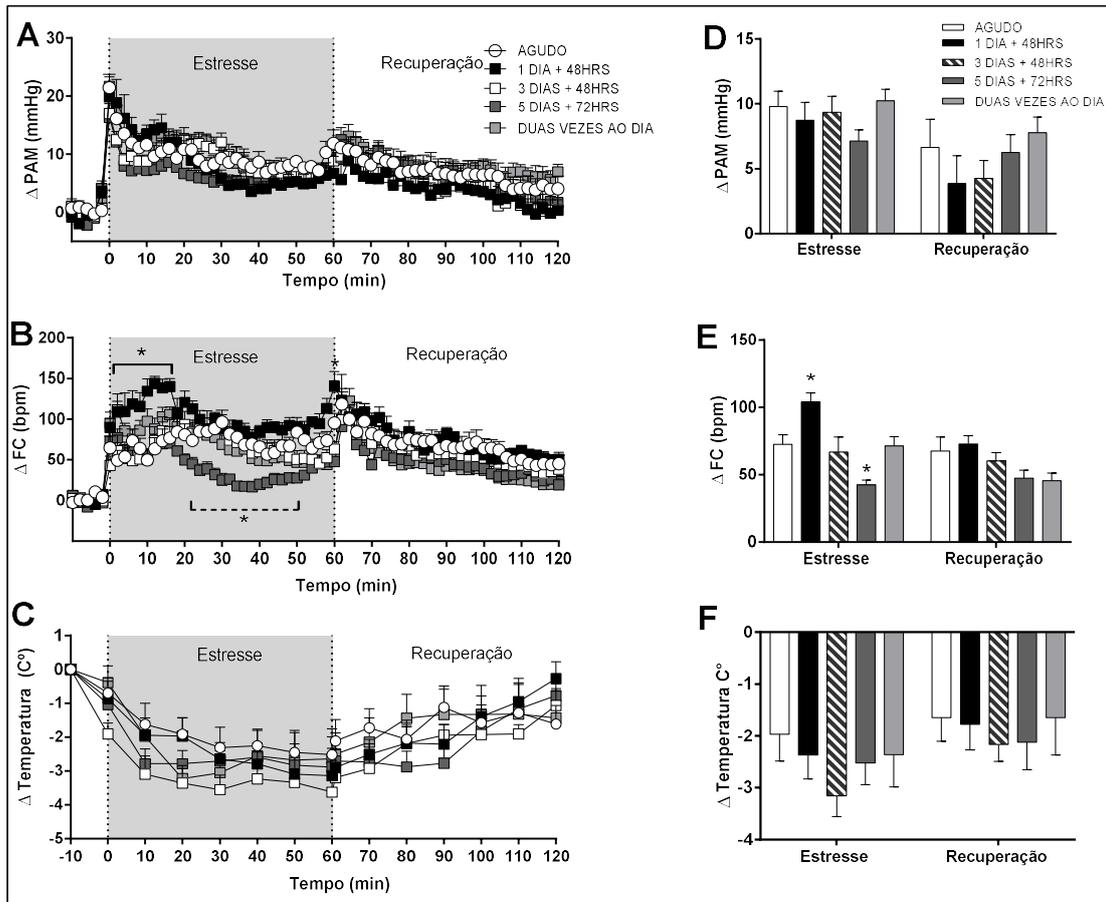


Figura 14-Influência da frequência de exposição ao estresse de restrição na habituação de respostas cardiovasculares.

(A, B, C) Curvas temporais de pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$  temperatura da cauda) em ratos submetidos a uma sessão aguda de 60 min (grupo agudo, círculos brancos,  $n = 9$ ) ou 10 sessões de restrição apresentadas em dias alternados com duração 60 min a sessão (1 dia+48hrs, quadrados pretos,  $n = 9$ ), 3 sessões diárias de 60 min seguidas por um dia de descanso (3days + 48h, quadrados brancos,  $n = 9$ ), 5 sessões diárias de 60 min seguidas de dois dias de descanso (5 dias + 72h, quadrados cinza escuro,  $n = 9$ ) e 30 min de restrição duas vezes ao dia (duas vezes ao dia, quadrados cinza claro,  $n = 9$ ). Os círculos representam a média e as barras o EPM. \*  $P < 0,05$  versus o grupo agudo, ANOVA bifatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. (D, E, F) A média média  $\Delta$ MAP,  $\Delta$ FC e  $\Delta$  temperatura da cauda durante todo o período de estresse e de recuperação em ratos submetidos a uma sessão aguda de 60 min (grupo agudo, barras brancas,  $n = 9$ ) ou 10 sessões de restrição apresentados em dias alternados (1 dia+48hrs, barras pretas,  $n = 9$ ), 3 sessões diárias de 60 min seguidas por um dia de descanso (3 dias+ 48hrs, barras brancas tracejadas,  $n = 9$ ), 5 sessões diárias de 60 min seguidas de dois descansos dias (5 dias + 72hrs, barras cinza escuro,  $n = 9$ ) e 30 min de restrição duas vezes ao dia (duas vezes ao dia, barras cinza claro,  $n = 9$ ). As barras representam a média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  versus o respectivo grupo agudo, ANOVA bifatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

### 5.3 Bloco 2: influência da exposição a outros estressores na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

#### 5.3.1 Influência do estresse crônico variado na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

A análise dos valores basais de PAM e FC não indicou efeito do ERR (PAM:  $F_{(1,35)} = 0,6$ ,  $P > 0,05$ ; FC:  $F_{(1,35)} = 0,2$ ,  $P > 0,05$ ) ou ECV (PAM:  $F_{(1,35)} = 0,2$ ,  $P > 0,05$ ; FC:  $F_{(1,35)} = 3,7$ ,  $P > 0,05$ ), ou interação entre os fatores (PAM:  $F_{(1,35)} = 2,9$ ,  $P > 0,05$ ; FC:  $F_{(1,35)} = 0,05$ ,  $P > 0,05$ ) (Tabela 3). A análise indicou efeito do ECV nos valores basais da temperatura cutânea da cauda ( $F_{(1,35)} = 23$ ,  $P < 0,0001$ ), mas sem influência do ERR ( $F_{(1,35)} = 0,6$ ,  $P > 0,05$ ) e sem interação entre os fatores ( $F_{(1,35)} = 0,7$ ,  $P > 0,05$ ) (Tabela 3). A análise *post-hoc* revelou que o ECV aumentou a temperatura cutânea basal nos grupos ECV + agudo ( $P < 0,04$ ) e ECV + ERR ( $P < 0,002$ ), quando comparados com o respectivo grupo controle (Tabela 3).

A análise das curvas temporais de PAM indicou efeito do tempo ( $F_{(65,2275)} = 39$ ,  $P < 0,0001$ ), mas sem interações entre tempo x ERR ( $F_{(65,2275)} = 0,98$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x ECV ( $F_{(65,2275)} = 1,1$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 15). Além disso, a análise indicou efeito do ECV ( $F_{(1,35)} = 6$ ,  $P < 0,002$ ), mas sem influência do ERR ( $F_{(1,35)} = 0,02$ ,  $P > 0,05$ ) e interação entre ERR e CVS ( $F_{(1,35)} = 0,07$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 15). A análise *post-hoc* revelou que o ECV aumentou a resposta de PAM nos grupos ECV + agudo ( $P < 0,05$ ) e ECV + ERR ( $P < 0,05$ ) (Figura 15).

A análise das curvas temporais de FC indicou efeito do tempo ( $F_{(65,2275)} = 39$ ,  $P < 0,0001$ ) e interações entre tempo e ERR ( $F_{(65,2275)} = 2,1$ ,  $P < 0,0001$ ) e tempo x ECV ( $F_{(65,2275)} = 1,3$ ,  $P < 0,03$ ); mas sem influência do ECV ( $F_{(1,35)} = 0,1$ ,  $P > 0,05$ ) e ERR ( $F_{(1,35)} = 0,8$ ,  $P > 0,05$ ) e interação entre ECV e ERR ( $F_{(1,35)} = 2,3$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 15). A análise das curvas temporais da resposta da temperatura cutânea da cauda indicou efeito do tempo ( $F_{(1,35)} = 46$ ,  $P < 0,0001$ ) e interação entre tempo e ECV ( $F_{(1,35)} = 8$ ,  $P < 0,007$ ), mas sem efeito do ERR ( $F_{(1,35)} = 0,9$ ,  $P > 0,05$ ) e ECV ( $F_{(1,35)} = 1,4$ ,  $P > 0,05$ ) e interações entre tempo e ERR ( $F_{(1,35)} = 2,3$ ,  $P > 0,05$ ) e ERR e ECV ( $F_{(1,35)} = 0,6$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 15).

A análise das médias da resposta de PAM ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do período ( $F_{(1,35)} = 30$ ,  $P < 0,0001$ ) e do ECV ( $F_{(1,35)} = 9$ ,  $P < 0,004$ ), mas sem efeito do ERR ( $F_{(1,35)} = 0,04$ ,  $P > 0,05$ ). A análise também não indicou interações entre período e ERR ( $F_{(1,35)} = 2$ ,  $P > 0,05$ ), período e ECV ( $F_{(1,35)} = 0,1$ ,  $P > 0,05$ ) e ERR e ECV ( $F_{(1,35)} =$

0,06,  $P > 0,05$ ) (Figura 15). A análise *post-hoc* revelou que o ECV aumentou a resposta de PAM durante a restrição no grupo ECV+ ERR ( $P < 0,04$ ) (Figura 15).

A análise das respostas médias de FC ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do período ( $F_{(1,35)} = 51$ ,  $P < 0,0001$ ), mas sem efeito do ERR ( $F_{(1,35)} = 1,2$ ,  $P > 0,05$ ) e ECV ( $F_{(1,35)} = 0,01$ ,  $P > 0,05$ ). A análise também não indicou interações entre período e ERR ( $F_{(1,35)} = 2,7$ ,  $P > 0,05$ ), período e ECV ( $F_{(1,35)} = 0,4$ ,  $P > 0,05$ ) e ERR e ECV ( $F_{(1,35)} = 2,9$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 15). A análise *post-hoc* revelou que os valores de FC do grupo controle ERR durante o período de recuperação foram menores em relação ao grupo controle agudo ( $P < 0,007$ ) (Figura 15). A análise da resposta da temperatura cutânea da cauda indicou efeito do período ( $F_{(1,35)} = 45$ ,  $P < 0,0001$ ) e uma interação entre período e ECV ( $F_{(1,35)} = 8$ ,  $P < 0,007$ ), mas sem efeito do ERR ( $F_{(1,35)} = 0,9$ ,  $P > 0,05$ ) e ECV ( $F_{(1,35)} = 1,4$ ,  $P > 0,05$ ) e interações entre período e ERR ( $F_{(1,35)} = 2,3$ ,  $P > 0,05$ ) e ERR x ECV ( $F_{(1,35)} = 0,6$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 15).

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

	<i>PAM (mmHg)</i>	<i>FC (bpm)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>N</i>
<b><i>Estresse crônico variado</i></b>				
Agudo controle	105±1,1	357±10	28.8±0,5	10
ERR controle	109±1,3	362±9	28.0±0,5	9
ECV+Agudo	107±1,6	342±8	30.7±0,6 #	10
ECV+ Agudo	105±2,1	343±8	30.8±0,2 #	10
<b><i>Exercício</i></b>				
Agudo sedentário	107±1,4	344±5	31.7±0,6	8
ERR sedentário	111±2,4	361±6	33.0±0,2	8
Agudo treinado	114±2,8	344±8	31.8±0,6	8
ERR treinado	111±1,8	346±8	30.7±0,5	8
<b><i>Isolamento Social</i></b>				
Agudo controle	104±1,3	353±7	28.0±0,6	9
ERR controle	108±1,3	363±10	28.5±0,5	9
Agudo isolado	103±1	343±5	30.0±0,4 #	9
ERR isolado	105±2	356±4	30.7±0,4 #	9

#  $P < 0.05$  vs respectivo grupo controle. ANOVA bifatorial seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. ECV– Estresse crônico variado, ERR – estresse de restrição repetido.

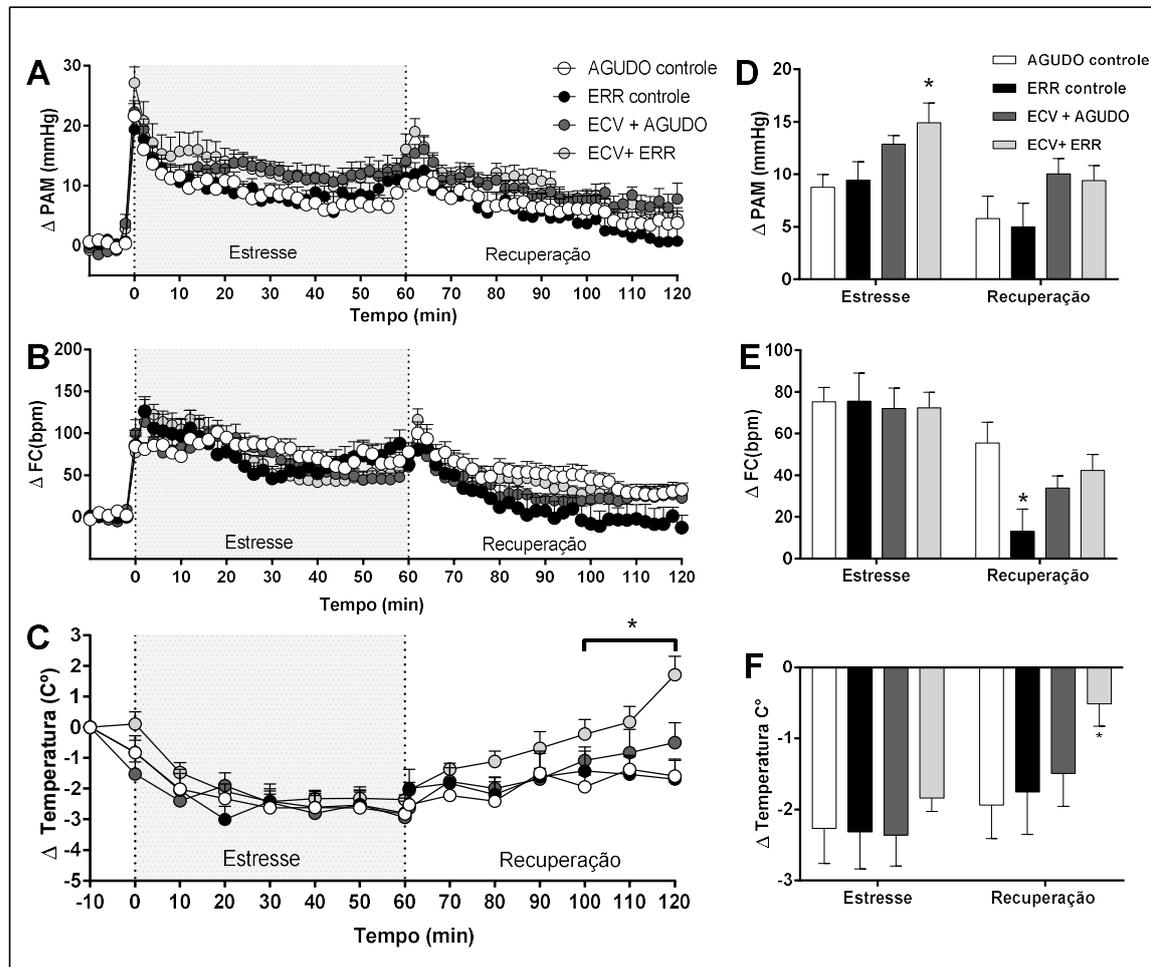


Figura 15 - Influência do estresse crônico variado (ECV) na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.

(A, B, C) Curvas temporais de pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$  temperatura da cauda) animais controle na 1ª (controle agudo, círculos brancos, n = 10) e 10ª sessão (controle de ERR, quadrados pretos, n = 9) de restrição, bem como em ratos submetidos a ECV na 1ª sessão de restrição (ECV + agudo, quadrados cinza escuro, n = 10) e 10ª sessão (ECV + ERR, quadrados cinza claro, n = 10) de restrição. Área sombreada indica o período de restrição. Os círculos representam a média e as barras o EPM. # P < 0,05 durante todo o período de registro em comparação com o grupo controle agudo, ANOVA trifatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. (D, E, F) Média  $\Delta$ MAP,  $\Delta$ FC e  $\Delta$  temperatura cauda ao longo do período de contenção e recuperação nos grupos controle agudo (barras brancas, n = 10), ERR controle (barras pretas, n = 9), ECV+Agudo barras cinza escuro, n = 10) e ECV+ ERR (barras cinza claro, n = 10). As barras representam a média  $\pm$  EPM. \* P < 0,05 versus o grupo agudo controle dentro do mesmo período, ANOVA trifatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. A sessão aguda e todos os ensaios de estresse no ERR duraram 60 min.

### 5.3.2 Influência do isolamento social na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

A análise dos valores basais de PAM ou FC não indicou efeito do ERR (PAM:  $F_{(1,32)} = 3,6$ ,  $P > 0,05$ ; FC:  $F_{(1,32)} = 2,8$ ,  $P > 0,05$ ) ou do isolamento social (PAM:  $F_{(1,32)} = 1,9$ ,  $P > 0,05$ , FC:  $F_{(1,32)} = 1,4$ ,  $P > 0,05$ ), nem interação entre os fatores (PAM:  $F_{(1,32)} = 0,2$ ,  $P > 0,05$ ; FC:  $F_{(1,32)} = 0,05$ ,  $P > 0,05$ ) (Tabela 3). A análise dos valores basais da temperatura cutânea da cauda indicou efeito do isolamento ( $F_{(1,32)} = 21$ ,  $P < 0,0001$ ), mas sem efeito do ERR ( $F_{(1,32)} = 0,8$ ,  $P > 0,05$ ) e interação entre isolamento e ERR ( $F_{(1,32)} = 0,002$ ,  $P > 0,05$ ) (Tabela 3). A análise *post-hoc* revelou que o isolamento social aumentou a temperatura cutânea basal nos grupos agudo isolado ( $P < 0,01$ ) e ERR isolado ( $P < 0,01$ ), quando comparado com o grupo agudo controle (Tabela 3).

A análise das curvas temporais das respostas de PAM e FC indicou efeito do isolamento social (PAM:  $F_{(1,32)} = 6$ ,  $P < 0,01$ ; FC:  $F_{(1,32)} = 8$ ,  $P < 0,006$ ) e tempo (PAM:  $F_{(65,2080)} = 33$ ,  $P < 0,0001$ ; FC:  $F_{(65,2080)} = 42$ ,  $P < 0,0001$ ), bem como interações entre tempo e ERR (PAM:  $F_{(65,2080)} = 1,7$ ,  $P < 0,001$ , FC:  $F_{(65,2080)} = 2$ ,  $P < 0,0001$ ) e tempo e isolamento (PAM:  $F_{(65,2080)} = 1,6$ ,  $P < 0,001$ ; FC:  $F_{(65,2080)} = 3$ ,  $P < 0,0001$ ) (Figura 16). A análise não indicou efeito do ERR (PAM:  $F_{(1,32)} = 0,01$ ,  $P > 0,05$ ; FC:  $F_{(1,32)} = 1,2$ ,  $P > 0,05$ ) e interação entre isolamento e ERR (PAM:  $F_{(1,32)} = 0,2$ ,  $P > 0,05$ , FC:  $F_{(1,32)} = 1,5$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post-hoc* revelou resposta aumentada da FC no grupo isolamento agudo ( $P < 0,05$ ), enquanto esta resposta foi diminuída no grupo ERR controle ( $P < 0,05$ ), quando comparado com o grupo agudo controle (Figura 16). A análise das curvas temporais da resposta de temperatura cutânea da cauda indicou efeito do isolamento social ( $F_{(1,32)} = 6$ ,  $P < 0,02$ ) e tempo ( $F_{(14,448)} = 29$ ,  $P < 0,0001$ ), bem como interação entre tempo e isolamento ( $F_{(14,448)} = 2$ ,  $P < 0,02$ ) (Figura 16). A análise não indicou efeito do ERR ( $F_{(1,32)} = 3$ ,  $P > 0,05$ ) e interações entre tempo e ERR ( $F_{(14,448)} = 1$ ,  $P > 0,05$ ) e ERR e isolamento ( $F_{(1,32)} = 0,1$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post-hoc* revelou aumento da resposta da temperatura cutânea da cauda no grupo ERR isolado ( $P < 0,01$ ), quando comparado com o grupo agudo controle (Figura 16).

Análises das médias das respostas de PAM e temperatura cutânea cauda ao longo do período de restrição e recuperação indicaram efeito do isolamento social (PAM:  $F_{(1,32)} = 7$ ,  $P < 0,01$ ; temperatura:  $F_{(1,32)} = 6$ ,  $P < 0,02$ ) e do período (PAM:  $F_{(1,32)} = 26$ ,  $P < 0,0001$ ; temperatura:  $F_{(1,32)} = 24$ ,  $P < 0,0002$ ), mas sem efeito do ERR (PAM:  $F_{(1,32)} = 0,01$ ,  $P > 0,05$ , temperatura:  $F_{(1,32)} = 3$ ,  $P > 0,05$ ) e interações entre período e ERR (PAM:  $F_{(1,32)} = 0,07$ ,  $P >$

0,05; temperatura:  $F_{(1,32)} = 0,04$ ,  $P > 0,05$ ), período e isolamento (PAM:  $F_{(1,32)} = 0,04$ ,  $P > 0,05$ ; temperatura:  $F_{(1,32)} = 0,6$ ,  $P > 0,05$ ) e isolamento e ERR (MAP:  $F_{(1,32)} = 0,1$ ,  $P > 0,05$ , temperatura:  $F_{(1,32)} = 0,06$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 16). A análise *post-hoc* revelou que a resposta da temperatura da cauda durante a restrição foi aumentada no grupo ERR isolado em relação ao grupo agudo controle ( $P < 0,02$ ) (Figura 16).

A análise da média da resposta de FC ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do isolamento social ( $F_{(1,32)} = 9$ ,  $P < 0,006$ ) e do tempo ( $F_{(1,32)} = 52$ ,  $P < 0,0001$ ), bem como como uma interação entre tempo e isolamento ( $F_{(1,32)} = 6$ ,  $P < 0,02$ ) (Figura 16). Entretanto, a análise não indicou efeito do ERR ( $F_{(1,32)} = 1,2$ ,  $P > 0,05$ ) e interações entre tempo e ERR ( $F_{(1,32)} = 0,02$ ,  $P > 0,05$ ) e isolamento e ERR ( $F_{(1,32)} = 1,5$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 16). A análise *post-hoc* revelou que a resposta da FC durante a restrição no grupo agudo isolado foi aumentada em relação aos grupos agudo controle ( $P < 0,007$ ) e ERR controle ( $P < 0,008$ ) (Figura 16). Além disso, os valores da FC durante o período de recuperação foram menores no ERR controle em relação aos grupos agudo controle ( $P < 0,02$ ) e ERR isolado ( $P < 0,01$ ) (Figura 16).

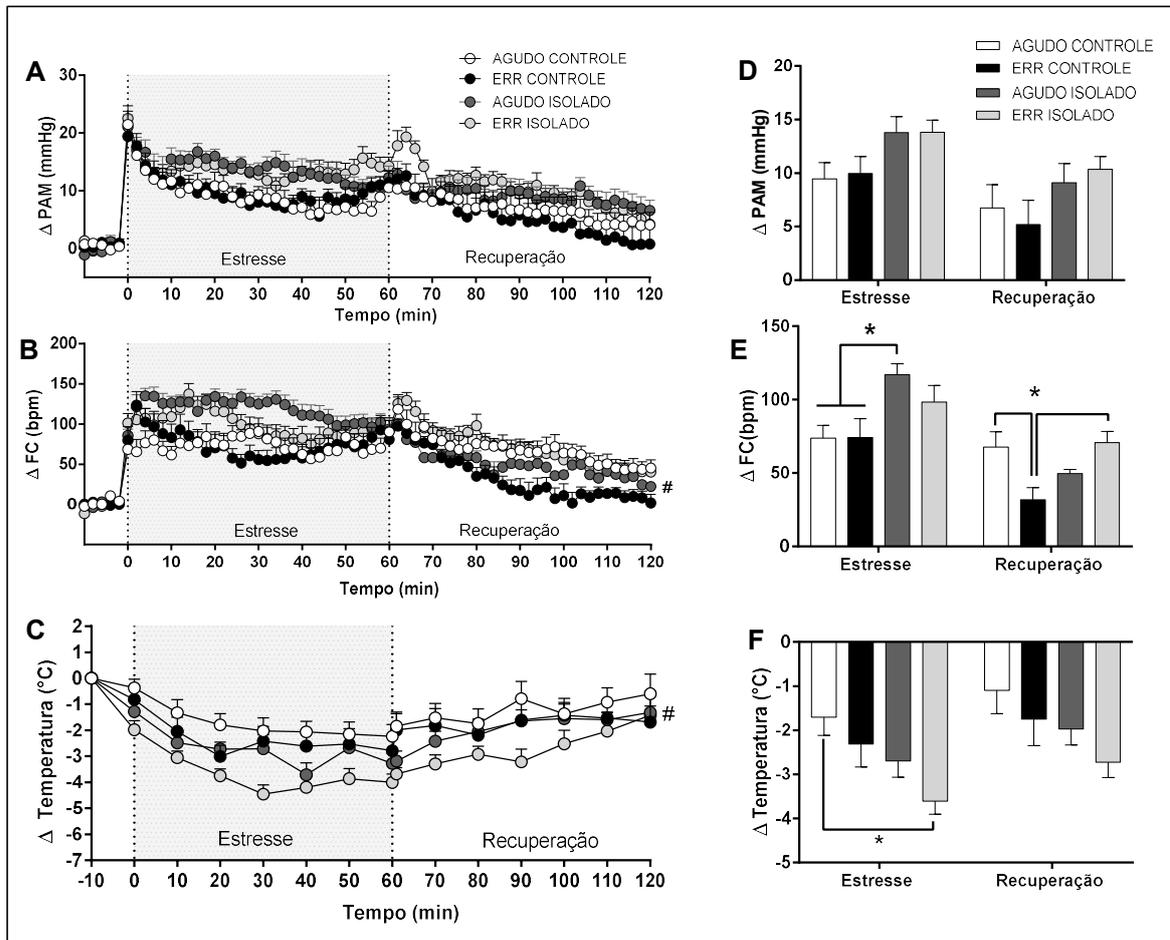


Figura 16 - Influência do isolamento social na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.

(A, B, C) Curvas temporais da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$  temperatura da cauda) no grupo controle animais na 1ª sessão (controle agudo, círculos brancos, n = 9) 10ª sessão (ERR controle, círculos pretos, n = 9) de restrição, bem como em animais submetidos a isolamento social na 1ª sessão (agudo isolado, círculos cinza escuro, n = 9) e 10ª sessão (ERR isolado, círculos cinza claro, n = 9) de estresse de restrição. Área sombreada indica o período de restrição. Os círculos representam a média e as barras o EPM. # P < 0,05 versus o grupo agudo controle, ANOVA trifatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. (D, E, F) Média  $\Delta$ MAP,  $\Delta$ FC e  $\Delta$  temperatura caudal ao longo do período de estresse e recuperação em grupos agudo controle (barras brancas, n = 10), ERR controle (barras pretas, n = 9), agudo isolado (barras cinza escuro, n = 10) e ERR isolado (barras cinza claro, n = 10). As barras representam a média  $\pm$  EPM. \* P < 0,05, ANOVA trifatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. Sessão aguda e todos os ensaios de restrição no protocolo RRS duraram 60 min.

### 5.3.3 Influência do treinamento físico em esteira na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

Os resultados da velocidade máxima de corrida (km/h) nos testes máximo de esforço são apresentados na Figura 17. A comparação dos valores obtidos em sedentários e treinados antes do início do protocolo de ERR (dados das semanas 0, 2, 4 e 6) indicou efeito do treinamento ( $F_{(1,30)} = 24$ ,  $P < 0,0001$ ) e tempo ( $F_{(3,90)} = 5$ ,  $P < 0,003$ ), bem como interação entre treinamento e tempo ( $F_{(3,90)} = 32$ ,  $P < 0,0001$ ). A análise *post-hoc* revelou que o treinamento aumentou a velocidade de corrida na esteira nas semanas 2 ( $P < 0,007$ ), 4 ( $P < 0,0001$ ) e 6 ( $P < 0,0001$ ). A análise da velocidade máxima de corrida após o ERR (ou seja, na semana 8) indicou efeito do treinamento ( $F_{(1,28)} = 158$ ,  $P < 0,0001$ ), mas sem influência do ERR ( $F_{(1,28)} = 3$ ,  $P > 0,05$ ) e interação entre treinamento e ERR ( $F_{(1,28)} = 0$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post-hoc* revelou que o treinamento aumentou de maneira similar a velocidade de corrida na esteira nos grupos controle ( $P < 0,0001$ ) e ERR ( $P < 0,0001$ ) treinados (Figura 17).

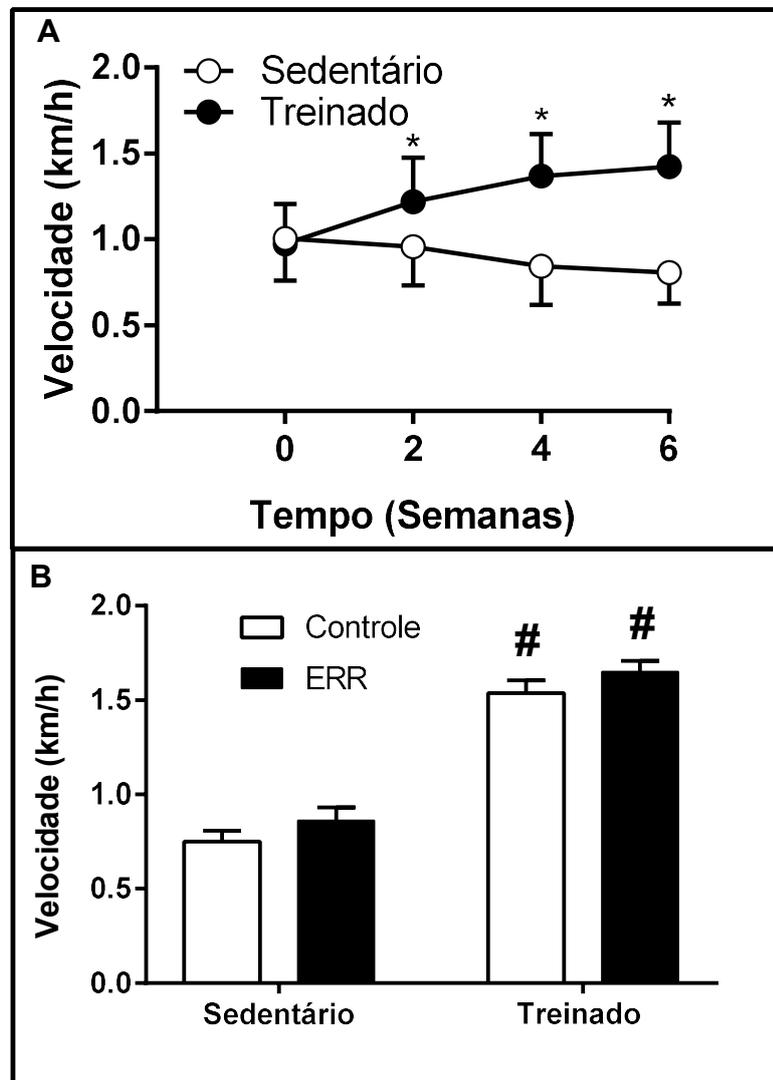


Figura 17 - Velocidade máxima de corrida (km/h) em testes máximos de exercício em esteira.

(A) Desempenho na esteira dos ratos sedentários e treinados nas semanas 0, 2, 4 e 6 do protocolo de treinamento em esteira ergométrica (ou seja, antes do início do protocolo de ERR). Os círculos representam a média e as barras o EPM. \*  $P < 0,05$  versus grupo sedentário, ANOVA bifatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. (B) Desempenho na esteira após o término do ERR em animais sedentários e treinados. As barras representam a média  $\pm$  EPM. #  $P < 0,05$  versus respectivo grupo sedentário, ANOVA bifatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni.

A análise dos valores basais de PAM e FC não indicou efeito do ERR (PAM:  $F_{(1,28)} = 0,07$ ,  $P > 0,05$ ; FC:  $F_{(1,28)} = 1,7$ ,  $P > 0,05$ ) ou treinamento (PAM:  $F_{(1,28)} = 2,4$ ,  $P > 0,05$ , FC:  $F_{(1,28)} = 1,0$ ,  $P > 0,05$ ), ou interação entre os fatores (PAM:  $F_{(1,28)} = 2,8$ ,  $P > 0,05$ ; FC:  $F_{(1,28)} = 0,9$ ,  $P > 0,05$ ) (Tabela 3). A análise dos valores basais da temperatura cutânea da cauda indicou um efeito do treinamento ( $F_{(1,28)} = 4,5$ ,  $P < 0,04$ ) e interação entre treinamento e ERR ( $F_{(1,28)} = 5,4$ ,  $P < 0,02$ ), mas sem efeito do ERR ( $F_{(1,28)} = 0,05$ ,  $P > 0,05$ ) (Tabela 3). A análise *post-hoc* não revelou diferenças específicas entre os grupos experimentais nos valores basais da temperatura cutânea da cauda ( $P > 0,05$ ) (Tabela 3).

A análise das curvas de temporais da resposta de PAM indicou efeito do treinamento ( $F_{(1,28)} = 4,2$ ,  $P < 0,05$ ) e tempo ( $F_{(65,1820)} = 30$ ,  $P < 0,0001$ ), e interação entre tempo e treinamento ( $F_{(65,1820)} = 1,3$ ,  $P < 0,03$ ); mas sem efeito do ERR ( $F_{(1,28)} = 1,0$ ,  $P > 0,05$ ) e interações entre tempo e ERR ( $F_{(65,1820)} = 0,9$ ,  $P > 0,05$ ) e ERR e treinamento ( $F_{(1,28)} = 0,9$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 18). A análise das curvas temporais da resposta de FC indicou efeito do tempo ( $F_{(65,1820)} = 21$ ,  $P < 0,0001$ ), mas sem efeito do ERR ( $F_{(1,28)} = 2,9$ ,  $P > 0,05$ ) e do treinamento ( $F_{(1,28)} = 1,1$ ,  $P > 0,05$ ) e interações entre tempo e RRS ( $F_{(65,1820)} = 0,9$ ,  $P > 0,05$ ), tempo e treinamento ( $F_{(65,1820)} = 1,2$ ,  $P > 0,05$ ) e treinamento e ERR ( $F_{(1,28)} = 1,8$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 18). A análise das curvas temporais da resposta de temperatura cutânea da cauda indicou efeito do treinamento ( $F_{(1,28)} = 5,2$ ,  $P < 0,03$ ) e tempo ( $F_{(13,364)} = 20$ ,  $P < 0,0001$ ), bem como interações entre tempo e ERR ( $F_{(13,364)} = 4,6$ ,  $P < 0,0001$ ) e tempo e treinamento ( $F_{(13,364)} = 4,4$ ,  $P < 0,0001$ ) (Figura 18). A análise não indicou efeito do ERR ( $F_{(1,28)} = 3,2$ ,  $P > 0,05$ ) e interação entre treinamento e ERR ( $F_{(1,28)} = 0,2$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post-hoc* não revelou diferença específica entre os grupos experimentais nas curvas temporais de qualquer parâmetro analisado ( $P > 0,05$ ) (Figura 18).

A análise da média da resposta de PAM ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do treinamento ( $F_{(1,28)} = 4,3$ ,  $P < 0,04$ ) e tempo ( $F_{(1,28)} = 72$ ,  $P < 0,0001$ ); mas sem efeito do ERR ( $F_{(1,28)} = 1,1$ ,  $P > 0,05$ ) e interações entre tempo e ERR ( $F_{(1,28)} = 0,5$ ,  $P > 0,05$ ), tempo e treinamento ( $F_{(1,28)} = 2,7$ ,  $P > 0,05$ ) e ERR e treinamento ( $F_{(1,28)} = 0,9$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 18). A análise da média da resposta da FC ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ( $F_{(1,28)} = 18$ ,  $P < 0,0003$ ) e ERR ( $F_{(1,28)} = 3,2$ ,  $P < 0,05$ ); mas sem efeito do treinamento ( $F_{(1,28)} = 2,1$ ,  $P > 0,05$ ) e interações entre tempo e ERR ( $F_{(1,28)} = 1,0$ ,  $P > 0,05$ ), tempo e treinamento ( $F_{(1,28)} = 0,2$ ,  $P > 0,05$ ) e ERR e treinamento ( $F_{(1,28)} = 2,4$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 18). A análise *post-hoc* revelou que os valores de FC durante o período de recuperação do grupo ERR sedentário foram menores quando comparados com o grupo agudo sedentário ( $P < 0,05$ ). A análise da média da resposta da temperatura cutânea ao

longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do treinamento ( $F_{(1,28)} = 5$ ,  $P < 0,03$ ) e interações entre tempo e ERR ( $F_{(1,28)} = 11$ ,  $P < 0,002$ ) e tempo e treinamento ( $F_{(1,28)} = 7$ ,  $P < 0,01$ ), mas sem efeito do ERR ( $F_{(1,28)} = 3,2$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo ( $F_{(1,28)} = 2,8$ ,  $P > 0,05$ ) e interação entre ERR e treinamento ( $F_{(1,28)} = 0,2$ ,  $P > 0,05$ ) (Figura 18). A análise *post-hoc* não revelou diferença específica entre os grupos experimentais nos valores de temperatura cutânea ( $P > 0,05$ ) (Figura 18).

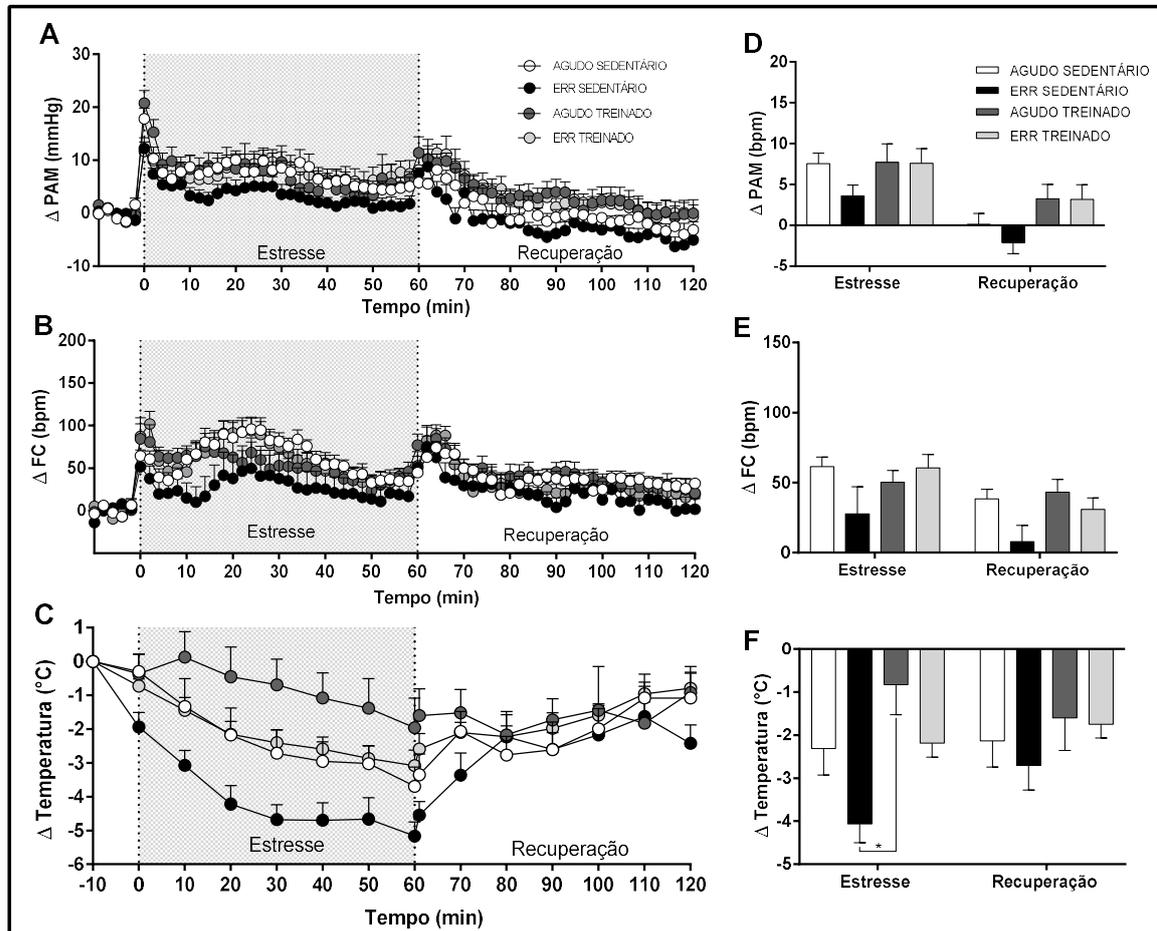


Figura 18 -Influência do treinamento físico em esteira na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.

(A, B, C) Curvas temporais da pressão arterial média ( $\Delta$ -PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$  temperatura da cauda) em animais sedentários na 1ª sessão (Agudo sedentário, círculos brancos,  $n = 8$ ) e 10ª sessão (ERR sedentário, círculos pretos,  $n = 8$ ) de restrição, bem como em ratos treinados em esteira na 1ª sessão (Agudo treinado, círculos cinza escuro,  $n = 8$ ) e 10ª sessão (ERR treinado, círculos cinza claro,  $n = 8$ ) de estresse de restrição. Área sombreada indica o período de restrição. Os círculos representam a média e as barras o EPM. ANOVA de três vias. (D, E, F) Média  $\Delta$ PAM,  $\Delta$ FC e  $\Delta$  temperatura da cauda ao longo do período de restrição e recuperação nos grupos agudo sedentário (Barras brancas,  $n = 8$ ), ERR sedentário (Barras pretas,  $n = 8$ ), agudo treinado (Barras cinza escuro,  $n = 8$ ) e ERR treinado (Barras cinza claro,  $n = 8$ ). As barras representam a média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  versus grupo agudo sedentário dentro do mesmo período, ANOVA trifatorial seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni. Sessão aguda de restrição e todos os ensaios no protocolo de ERR duraram 60 min.

#### 5.4 Bloco 3: influência do sexo, da idade e da linhagem na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em fêmeas

##### 5.4.1 Influência do sexo na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em fêmeas

A avaliação do ciclo estral das fêmeas indicou que todas se encontravam na fase metaestro do ciclo estral (Figura 19).

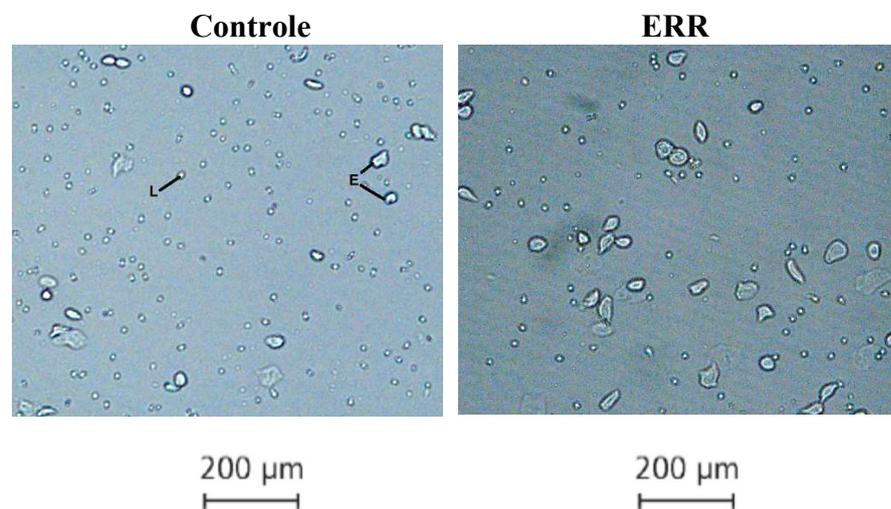


Figura 19 - Figura representativa da fase do ciclo estral das ratas.

A fase metaestro consiste na mesma proporção de leucócitos, células epiteliais cornificadas e nucleadas. (L) leucócitos (E) Células epiteliais. ERR-Estresse repetido restrição.

As análises dos parâmetros basais de PAM não indicou efeito do sexo ( $P>0,05$ ) ou do ERR ( $P>0,05$ ) (Tabela 4). A análise dos valores basais de FC e temperatura cutânea da cauda não indicou efeito do ERR nos machos ( $P>0,05$ ) e fêmeas ( $P>0,05$ ), mas sugeriu valores maiores nas fêmeas dos grupos agudo (FC:  $P<0,04$ ; temperatura:  $P<0,004$ ) e ERR (FC:  $P<0,01$ ; temperatura:  $P<0,004$ ), em relação aos respectivos grupos machos (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (T).

	<i>PAM (mmHg)</i>	<i>FC (bpm)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>N</i>
<b>Machos</b>				
Agudo	104±1,3	347±4	28,05±0,6	9
ERR	108±1,3	368±16	28,5±0,5	9
<b>Fêmeas</b>				
Agudo	107±2,1	387±3 *	30,7±0,5 *	9
ERR	110±2,4	392±16 *	31,04±0,4 *	10
<i>Sexo</i>	$F_{(1,33)} = 1,62$ $P>0,05$	$F_{(1,33)} = 10,21$ $P<0,05$	$F_{(1,33)} = 0,70$ $P>0,05$	
<i>ERR</i>	$F_{(1,33)} = 3,78$ $P>0,05$	$F_{(1,33)} = 1,61$ $P>0,05$	$F_{(1,33)} = 27,72$ $P<0,05$	
<i>Interação</i>	$F_{(1,33)} = 0,009$ $P>0,05$	$F_{(1,33)} = 0,70$ $P>0,05$	$F_{(1,33)} = 0,008$ $P>0,05$	

\*  $P<0,05$  vs respectivo grupo macho, ANOVA bifatorial seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. ERR – estresse de restrição repetido.

A análise das curvas temporais de PAM indicou efeito do tempo ( $F_{(65,2210)} = 66,06$ ,  $P<0,001$ ), sexo ( $F_{(1,34)} = 6,52$ ,  $P<0,02$ ) e interações entre tempo e sexo ( $F_{(65,2210)} = 1,71$ ,  $P<0,001$ ) e tempo e estresse ( $F_{(65,2210)} = 2,07$ ,  $P<0,001$ ); mas sem efeito do estresse ( $F_{(1,34)} = 0,06$ ,  $P>0,05$ ) e interações entre sexo e estresse ( $F_{(1,34)} = 0,009$ ,  $P>0,05$ ) e tempo x sexo x estresse ( $F_{(65,2210)} = 0,39$ ,  $P>0,05$ ). A análise *post hoc* não revelou diferenças específicas entre os grupos experimentais para os valores de PAM ( $P>0,05$ ) (Figura 20).

A análise das curvas temporais de FC indicou efeito do tempo ( $F_{(65,2210)} = 33,55$ ,  $P<0,001$ ), estresse ( $F_{(1,34)} = 6,31$ ,  $P<0,02$ ) e interações entre tempo e sexo ( $F_{(65,2210)} = 2,75$ ,  $P<0,01$ ) e tempo e estresse ( $F_{(65,2210)} = 4,53$ ,  $P<0,001$ ); mas sem efeito do sexo ( $F_{(1,34)} = 2,69$ ,  $P>0,05$ ) e interações sexo x estresse ( $F_{(1,34)} = 0,18$ ,  $P>0,05$ ) e tempo x sexo x estresse ( $F_{(65,2210)} = 0,39$ ,  $P>0,05$ ).

(65,2210) = 0,73,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* não revelou diferença específica entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Figura 20).

A análise das curvas de temporais de temperatura cutânea da cauda indicou efeito do tempo ( $F_{(14,476)} = 29,77$ ,  $P < 0,0001$ ) e sexo ( $F_{(1,34)} = 5,13$ ,  $P < 0,03$ ); mas sem efeito do estresse ( $F_{(1,34)} = 4,04$ ,  $P > 0,05$ ) e interações sexo x estresse ( $F_{(1,34)} = 0,40$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x sexo ( $F_{(14,476)} = 1,43$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x estresse ( $F_{(14,476)} = 1,20$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x sexo x estresse ( $F_{(14,476)} = 1,09$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* não revelou diferença específica entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Figura 20).

A análise da média da resposta de PAM ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ( $F_{(1,34)} = 16,32$ ,  $P < 0,001$ ) e sexo ( $F_{(1,34)} = 8,11$ ,  $P < 0,006$ ); mas sem efeito do estresse ( $F_{(1,34)} = 0,00056$ ,  $P > 0,05$ ) e interações sexo x estresse ( $F_{(1,34)} = 0,13$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x sexo ( $F_{(1,34)} = 0,91$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x estresse ( $F_{(1,34)} = 2,50$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x sexo x estresse ( $F_{(1,34)} = 0,36$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* não revelou diferença específica entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Figura 20).

A análise da média da resposta de FC ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ( $F_{(1,34)} = 39,10$ ,  $P < 0,001$ ), estresse ( $F_{(1,34)} = 6,43$ ,  $P < 0,02$ ) e interação tempo x estresse ( $F_{(1,34)} = 8,60$ ,  $P < 0,006$ ); mas sem efeito do sexo ( $F_{(1,34)} = 2,72$ ,  $P > 0,05$ ) e interações sexo x estresse ( $F_{(1,34)} = 0,19$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x sexo ( $F_{(1,34)} = 1,42$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x sexo x estresse ( $F_{(1,34)} = 0,77$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* revelou valores menores de FC durante o período de recuperação nos grupos ERR macho ( $P = 0,045$ ) e fêmea ( $P = 0,041$ ) (Figura 20).

A análise da média da resposta de temperatura cutânea da cauda ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ( $F_{(1,34)} = 13,06$ ,  $P < 0,001$ ), estresse ( $F_{(1,34)} = 4,96$ ,  $P < 0,04$ ) e sexo ( $F_{(1,34)} = 6,24$ ,  $P < 0,02$ ); mas sem interações sexo x estresse ( $F_{(1,34)} = 0,49$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x sexo ( $F_{(1,34)} = 0,065$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x estresse ( $F_{(1,34)} = 0,05$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x idade x estresse ( $F_{(1,34)} = 0,12$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* revelou que durante o período de estresse o grupo fêmeas ERR teve maior queda da temperatura cutânea da cauda em relação ao grupo fêmea agudo ( $P = 0,049$ ) (Figura 20).

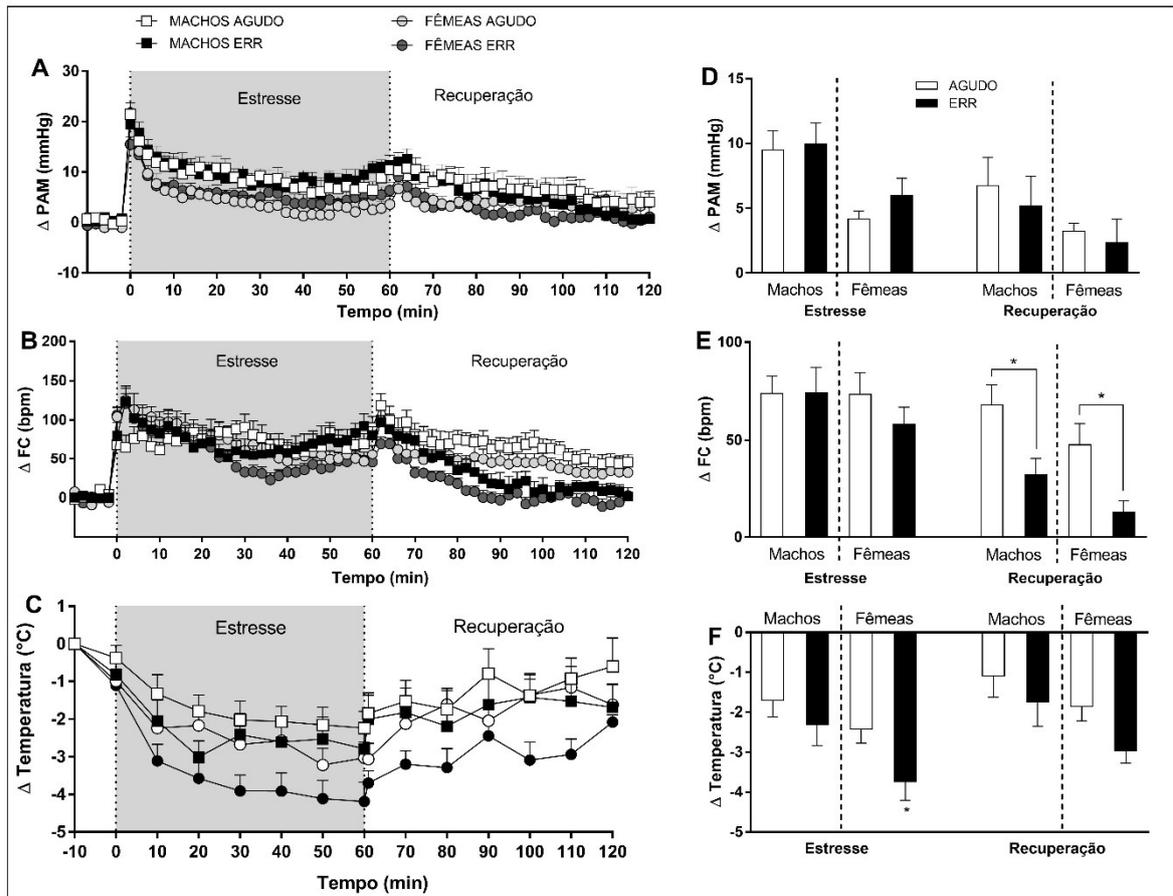


Figura 20 - Influência do sexo na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição.

(A, B, C) Curvas temporais da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$  temperatura da cauda). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. ANOVA trifatorial. (D, E, F) Média  $\Delta$ PAM,  $\Delta$ FC e  $\Delta$  temperatura da cauda ao longo do período de restrição e recuperação nos grupos agudo (Barras brancas), ERR (Barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  versus respectivo grupo agudo, #  $P < 0,05$  versus respectivo grupo adulto ANOVA trifatorial. Sessão aguda de restrição e todos os ensaios no protocolo ERR duraram 60 min.

#### 5.4.2 Influência da idade na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

A análise dos parâmetros basais de PAM não indicou efeito do ERR em nenhuma das idades ( $P>0,05$ ), porém os animais adolescentes dos grupos agudo ( $P<0,04$ ) e ERR ( $P<0,03$ ) apresentaram valores menores em relação aos respectivos grupos adultos (Tabela 5). A análise dos valores basais de FC também não indicou efeito do ERR em nenhuma das idades ( $P>0,05$ ), porém os animais adolescentes dos grupos agudo ( $P<0,0001$ ) e ERR ( $P<0,0002$ ) apresentaram valores maiores em relação aos respectivos grupos adultos (Tabela 5). A análise dos valores basais de temperatura cutânea da cauda não indicou efeito do ERR em nenhuma das idades ( $P>0,05$ ), porém os animais do grupo idoso ERR apresentaram valores maiores em relação ao respectivo grupo adulto ( $P<0,02$ ) (Tabela 5).

Tabela 5– Parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda (T).

	<i>PAM (mmHg)</i>	<i>FC (bpm)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>N</i>
<b>Adultos</b>				
Agudo	106±0,96	353±7	28,05±0,6	9
ERR	108±1,3	359±8	28,5±0,5	9
<b>Adolescentes</b>				
Agudo	98,5±1,8*	396±3 *	28,3±0,5	10
ERR	100±1,7 *	407±5 *	30,3±0,5	10
<b>Idosos</b>				
Agudo	101±1,9	323±10	30,8±0,9	7
ERR	104±3,1	342±12	31,6±0,7 *	7
<i>Idade</i>	$F_{(2, 46)} = 10,14$ $P<0,05$	$F_{(2, 46)} = 45,56$ $P<0,0001$	$F_{(2, 46)} = 10,37$ $P<0,05$	
<i>ERR</i>	$F_{(1, 46)} = 2,2$ $P>0,05$	$F_{(1, 46)} = 3,82$ $P>0,05$	$F_{(1, 46)} = 4,5$ $P<0,05$	
<i>Interação</i>	$F_{(2, 46)} = 0,05$ $P>0,05$	$F_{(2, 46)} = 0,33$ $P>0,05$	$F_{(2, 46)} = 0,89$ $P>0,05$	

\*  $P<0,05$  vs respectivo adulto. ANOVA bifatorial seguido de teste *post-hoc* de Bonferroni. ERR – estresse de restrição repetido.

A análise das curvas temporais de PAM indicou efeito do tempo ( $F_{(65,2990)} = 36,80$ ,  $P < 0,0001$ ) e da idade ( $F_{(2,46)} = 7,4$ ,  $P < 0,04$ ) e interação entre tempo e idade ( $F_{(130,2990)} = 1,94$ ,  $P < 0,001$ ); mas sem efeito do estresse ( $F_{(1,46)} = 0,4$ ,  $P > 0,05$ ) e interações idade x estresse ( $F_{(2,46)} = 1,56$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x estresse ( $F_{(65,2990)} = 1,12$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x idade x estresse ( $F_{(130,2990)} = 0,98$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* não revelou diferenças específicas entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Figura 21).

A análise das curvas temporais de FC indicou efeito do tempo ( $F_{(65,2990)} = 41,20$ ,  $P < 0,0001$ ) e do estresse ( $F_{(1,46)} = 9,15$ ,  $P < 0,01$ ) e interações tempo x idade ( $F_{(130,2990)} = 3,61$ ,  $P < 0,001$ ), tempo x estresse ( $F_{(65,2990)} = 2,40$ ,  $P < 0,001$ ), tempo x idade x estresse ( $F_{(130,2990)} = 5,01$ ,  $P < 0,001$ ). Entretanto, a análise não indicou efeito da idade ( $F_{(2,46)} = 1,69$ ,  $P > 0,05$ ) e interação idade x estresse ( $F_{(2,46)} = 0,36$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* não revelou diferença específica entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Figura 21).

A análise das curvas temporais de temperatura cutânea da cauda indicou efeito do tempo ( $F_{(13,598)} = 17,95$ ,  $P < 0,0001$ ), estresse ( $F_{(1,46)} = 5,64$ ,  $P < 0,03$ ) e idade ( $F_{(2,46)} = 10,47$ ,  $P < 0,001$ ) e interações entre tempo x idade ( $F_{(26,598)} = 4,05$ ,  $P < 0,001$ ), tempo x idade x estresse ( $F_{(26,598)} = 1,85$ ,  $P < 0,01$ ). Entretanto, a análise não indicou interações idade x estresse ( $F_{(2,46)} = 0,32$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x estresse ( $F_{(13,598)} = 1,39$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* não revelou diferenças específicas entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Figura 21).

A análise da média da resposta de PAM ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ( $F_{(1,46)} = 34,21$ ,  $P < 0,001$ ) e idade ( $F_{(2,46)} = 7,29$ ,  $P < 0,002$ ); mas sem efeito do estresse ( $F_{(1,46)} = 0,43$ ,  $P > 0,05$ ) e interações idade x estresse ( $F_{(2,46)} = 1,61$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x idade ( $F_{(2,46)} = 0,12$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x estresse ( $F_{(2,46)} = 0,36$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x idade x estresse ( $F_{(2,46)} = 0,36$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* revelou valores menores de PAM no período de restrição ( $P = 0,027$ ) e recuperação ( $P = 0,029$ ) dos animais idosos agudos em relação ao respectivo grupo adulto (Figura 21).

A análise da média da resposta de FC ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ( $F_{(1,46)} = 43,33$ ,  $P < 0,001$ ) e estresse ( $F_{(1,46)} = 9,38$ ,  $P < 0,004$ ) e interação tempo x idade x estresse ( $F_{(2,46)} = 11,38$ ,  $P < 0,001$ ); mas sem efeito da idade ( $F_{(2,46)} = 1,65$ ,  $P > 0,05$ ) e interações idade x estresse ( $F_{(2,46)} = 0,32$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x idade ( $F_{(2,46)} = 1,78$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x estresse ( $F_{(1,46)} = 0,83$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* revelou que o grupo adolescente ERR apresentou valores de FC menores durante a restrição em relação ao grupo adolescente agudo ( $P = 0,002$ ). Além disso, durante o período da restrição a análise indicou que os ratos adultos ERR ( $P = 0,044$ ) e idosos ERR ( $P = 0,049$ ) apresentaram valores

menores em relação aos respectivos grupos agudo, ao passo que os animais adolescentes agudo apresentaram valores menores em relação ao grupo adulto agudo ( $P=0,033$ ) (Figura 21).

A análise da média da resposta de temperatura cutânea da cauda ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ( $F_{(1,46)} = 19,83$ ,  $P < 0,001$ ), estresse ( $F_{(1,46)} = 5,78$ ,  $P < 0,02$ ) e idade ( $F_{(2,46)} = 11,01$ ,  $P < 0,01$ ) e interação tempo x idade ( $F_{(2,46)} = 7,75$ ,  $P < 0,01$ ); mas sem interações idade x estresse ( $F_{(2,46)} = 0,24$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x estresse ( $F_{(1,46)} = 0,13$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x idade x estresse ( $F_{(2,46)} = 2,20$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* não revelou diferenças específicas entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Figura 21).

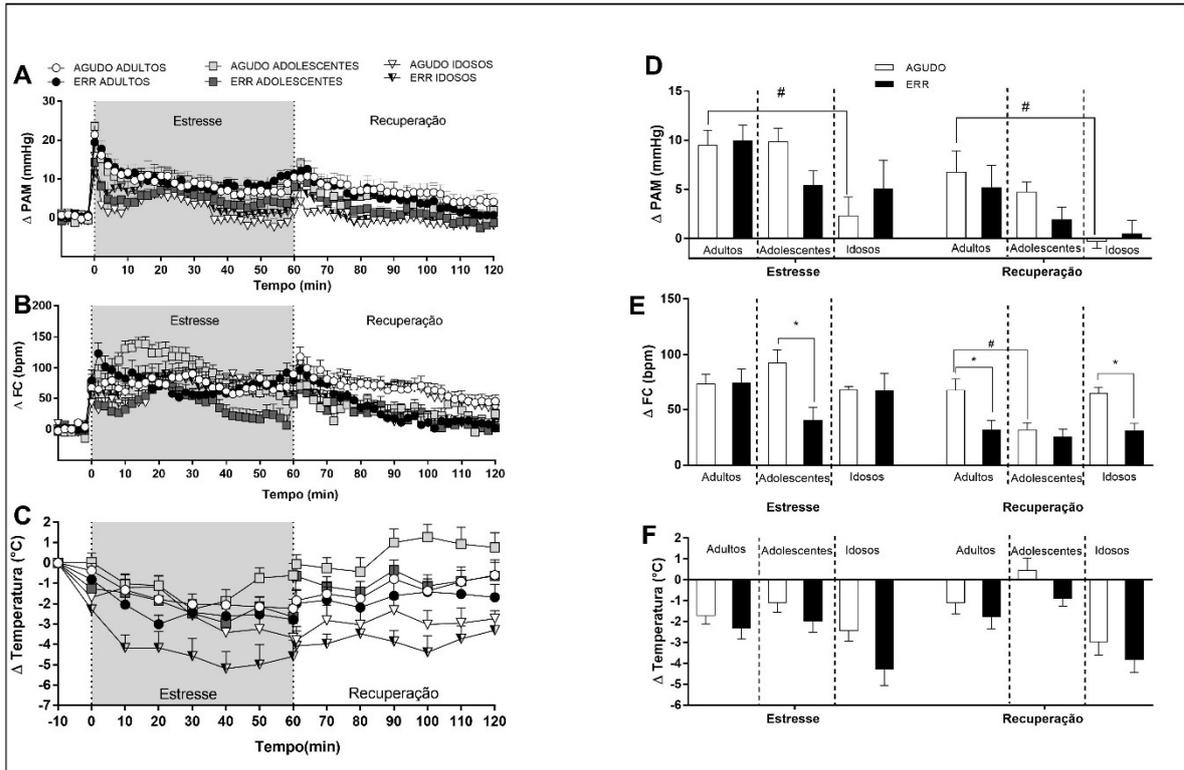


Figura 21 - Influência da idade do animal na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em ratos.

(A, B, C) Curvas temporais da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$  temperatura da cauda). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. ANOVA trifatorial. (D, E, F) Média  $\Delta$ PAM,  $\Delta$ FC e  $\Delta$  temperatura da cauda ao longo do período de restrição e recuperação nos grupos agudo (Barras brancas), ERR (Barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  versus respectivo grupo agudo, #  $P < 0,05$  versus respectivo grupo adulto ANOVA trifatorial. Sessão aguda de restrição e todos os ensaios no protocolo ERR duraram 60 min.

#### 5.4.3 Influência da linhagem na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

As análises dos valores basais de PAM, FC e temperatura cutânea da cauda indicaram efeito da linhagem (PAM:  $F_{(3,58)} = 83,9$ ,  $P < 0,0001$ ; FC:  $F_{(3,58)} = 14,84$ ,  $P < 0,0001$ ; Temperatura:  $F_{(3,58)} = 30,72$ ,  $P < 0,0001$ ), mas sem efeito do ERR (PAM:  $F_{(1,58)} = 0,05$ ,  $P > 0,05$ ; FC:  $F_{(1,58)} = 0,08$ ,  $P > 0,05$ ; temperatura:  $F_{(1,58)} = 0,29$ ,  $P > 0,05$ ) e interação entre os fatores (PAM:  $F_{(3,58)} = 0,9$ ,  $P > 0,05$ ; FC:  $F_{(3,58)} = 0,67$ ,  $P > 0,05$ ; Temperatura:  $F_{(3,58)} = 0,24$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post-hoc* revelou que os animais SHR (agudo:  $P < 0,0001$ ; ERR:  $P < 0,0001$ ) e Long-Evans (agudo:  $P < 0,006$ ; ERR:  $P < 0,003$ ) dos grupos agudo e ERR apresentaram valores maiores de PAM em relação aos respectivos grupos Wistar (Figura 22). A análise *post-hoc* dos valores de FC revelou que os animais Long-Evans (agudo:  $P < 0,003$ ; ERR:  $P < 0,001$ ) dos grupos agudo e ERR apresentaram valores maiores em relação aos respectivos grupos Wistar (Figura 22). A análise *post-hoc* dos valores basais de temperatura cutânea da cauda também indicou que os animais Long-Evans (agudo:  $P < 0,0001$ ; ERR:  $P < 0,0002$ ) e SHR (agudo:  $P < 0,0009$ ; ERR:  $P < 0,02$ ) dos grupos agudo e ERR apresentaram valores maiores em relação aos respectivos grupos Wistar (Figura 22).

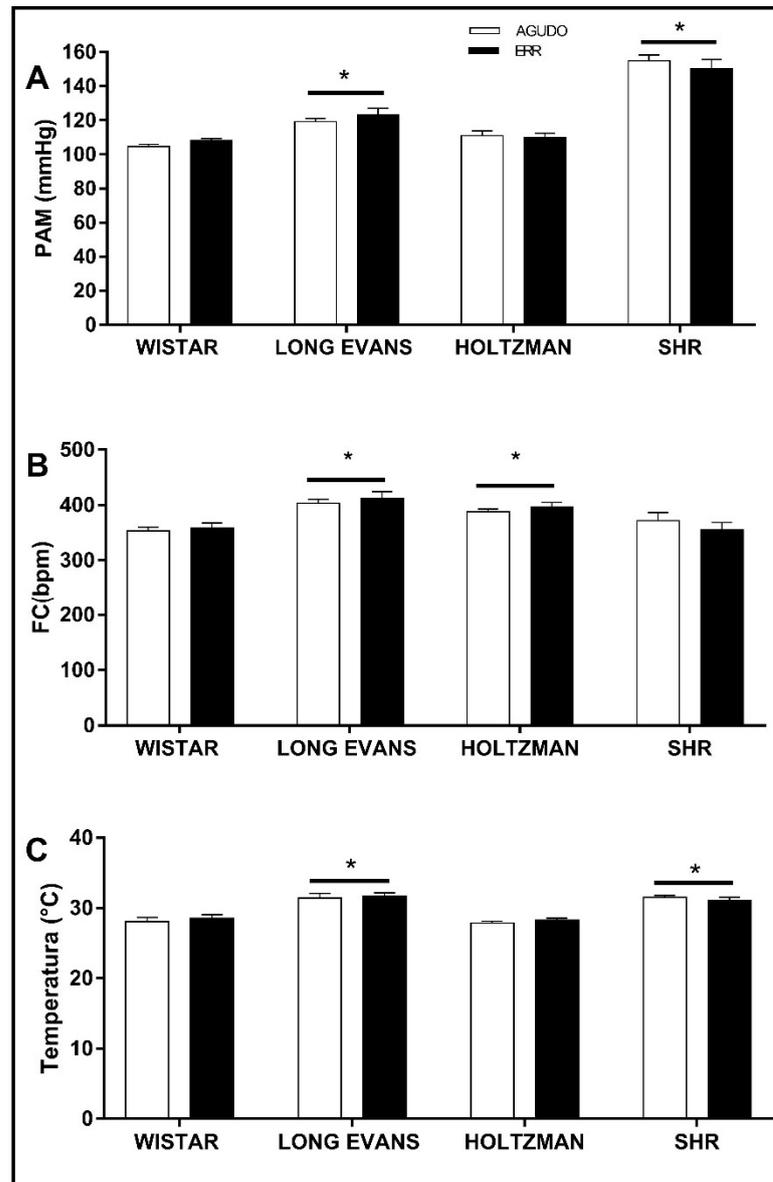


Figura 22 -Valores basais de pressão arterial media (PAM), frequência cardíaca (FC) e temperatura cutânea da cauda em diferentes linhagens de ratos.

(A) valores basais de PAM, (B) valores basais de FC e (C) valores basais de temperatura cutânea da cauda grupos agudo (Barras brancas), ERR (Barras pretas), As barras representam a média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  versus respectivo grupo Wistar. ANOVA bifatorial seguido do teste *post-hoc* de Bonferoni.

A análise das curvas temporais da resposta de PAM indicou efeito do tempo ( $F_{(65,3770)} = 59,05$ ,  $P < 0,0001$ ), linhagem ( $F_{(3,58)} = 3,98$ ,  $P < 0,01$ ) e interações entre tempo x linhagem ( $F_{(195,3770)} = 2,14$ ,  $P < 0,001$ ), tempo x estresse ( $F_{(65,3770)} = 2,57$ ,  $P < 0,01$ ) e tempo x linhagem x estresse ( $F_{(195,3770)} = 1,62$ ,  $P < 0,01$ ). Entretanto, a análise não indicou efeito do estresse ( $F_{(1,58)} = 0,14$ ,  $P > 0,05$ ) e interação linhagem x estresse ( $F_{(3,58)} = 1,59$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* não revelou diferenças específicas entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Figura 23).

A análise das curvas temporais da resposta de FC indicou efeito do tempo ( $F_{(65,3770)} = 53,41$ ,  $P < 0,0001$ ), linhagem ( $F_{(3,58)} = 4,49$ ,  $P < 0,01$ ) e interações entre tempo x linhagem ( $F_{(195,3770)} = 7,62$ ,  $P < 0,001$ ), tempo x estresse ( $F_{(65,3770)} = 1,69$ ,  $P < 0,01$ ) e tempo x linhagem x estresse ( $F_{(195,3770)} = 1,83$ ,  $P < 0,01$ ); mas sem efeito do estresse ( $F_{(1,58)} = 2,06$ ,  $P > 0,05$ ) e interação linhagem x estresse ( $F_{(3,58)} = 1,45$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* não revelou diferenças específicas entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Figura 23).

A análise das curvas temporais da resposta de temperatura cutânea indicou efeito do tempo ( $F_{(14,812)} = 53,02$ ,  $P < 0,0001$ ), linhagem ( $F_{(3,58)} = 8,92$ ,  $P < 0,01$ ) e interação tempo x linhagem ( $F_{(42,812)} = 3,65$ ,  $P < 0,001$ ); mas, sem efeito do estresse ( $F_{(1,58)} = 0,03$ ,  $P > 0,05$ ) e interações linhagem x estresse ( $F_{(3,58)} = 0,69$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x estresse ( $F_{(14,812)} = 0,73$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x linhagem x estresse ( $F_{(42,812)} = 1,07$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* não revelou diferenças específicas entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Figura 23).

A análise da média da resposta de PAM ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ( $F_{(1,58)} = 63,33$ ,  $P < 0,001$ ), linhagem ( $F_{(3,58)} = 3,83$ ,  $P < 0,02$ ) e interações tempo x estresse ( $F_{(1,58)} = 6,02$ ,  $P < 0,02$ ) e tempo x linhagem x estresse ( $F_{(3,58)} = 3,10$ ,  $P < 0,04$ ); mas sem efeito do estresse ( $F_{(1,58)} = 0,10$ ,  $P > 0,05$ ) e interações linhagem x estresse ( $F_{(3,58)} = 1,68$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x linhagem ( $F_{(3,58)} = 0,29$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* não revelou diferença específica entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ) (Figura 23).

A análise da média da resposta de FC ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ( $F_{(1,58)} = 86,16$ ,  $P < 0,0001$ ), linhagem ( $F_{(3,58)} = 4,40$ ,  $P < 0,008$ ) e interação tempo x linhagem ( $F_{(3,58)} = 7,30$ ,  $P < 0,001$ ); mas sem efeito do estresse ( $F_{(1,58)} = 2,14$ ,  $P > 0,05$ ) e interações linhagem x estresse ( $F_{(3,58)} = 1,47$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x estresse ( $F_{(1,58)} = 3,24$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x linhagem x estresse ( $F_{(3,58)} = 2,02$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* revelou que os ratos Long-Evans ERR apresentaram valores menores de FC em relação ao respectivo grupo Wistar ( $P = 0,018$ ) (Figura 23). Durante o período de recuperação, os ratos Wistar ERR ( $P = 0,049$ ) e Holtzman ERR ( $P = 0,023$ ) apresentaram valores menores quando comparados aos seus respectivos grupos agudo, ao passo que os animais Long-Evans agudo

( $P=0,032$ ) e SHR agudo ( $P=0,023$ ) apresentaram valores menores em relação ao grupo Wistar agudo (Figura 23).

A análise da média da resposta de temperatura cutânea da cauda ao longo do período de restrição e recuperação indicou efeito do tempo ( $F_{(1,58)} = 95,64$ ,  $P < 0,00001$ ) e linhagem ( $F_{(3,58)} = 8,87$ ,  $P < 0,001$ ) e interação tempo x linhagem ( $F_{(3,58)} = 5,84$ ,  $P < 0,0001$ ); mas sem efeito do estresse ( $F_{(1,58)} = 0,004$ ,  $P > 0,05$ ) e interações linhagem x estresse ( $F_{(3,58)} = 0,67$ ,  $P > 0,05$ ), tempo x estresse ( $F_{(1,58)} = 0,0082$ ,  $P > 0,05$ ) e tempo x linhagem x estresse ( $F_{(3,58)} = 0,99$ ,  $P > 0,05$ ). A análise *post hoc* revelou que o grupo Long-Evans agudo teve maior redução da temperatura da cutânea da cauda durante o período de estresse ( $P=0,025$ ), que se manteve no período de recuperação ( $P=0,021$ ) (Figura 23).

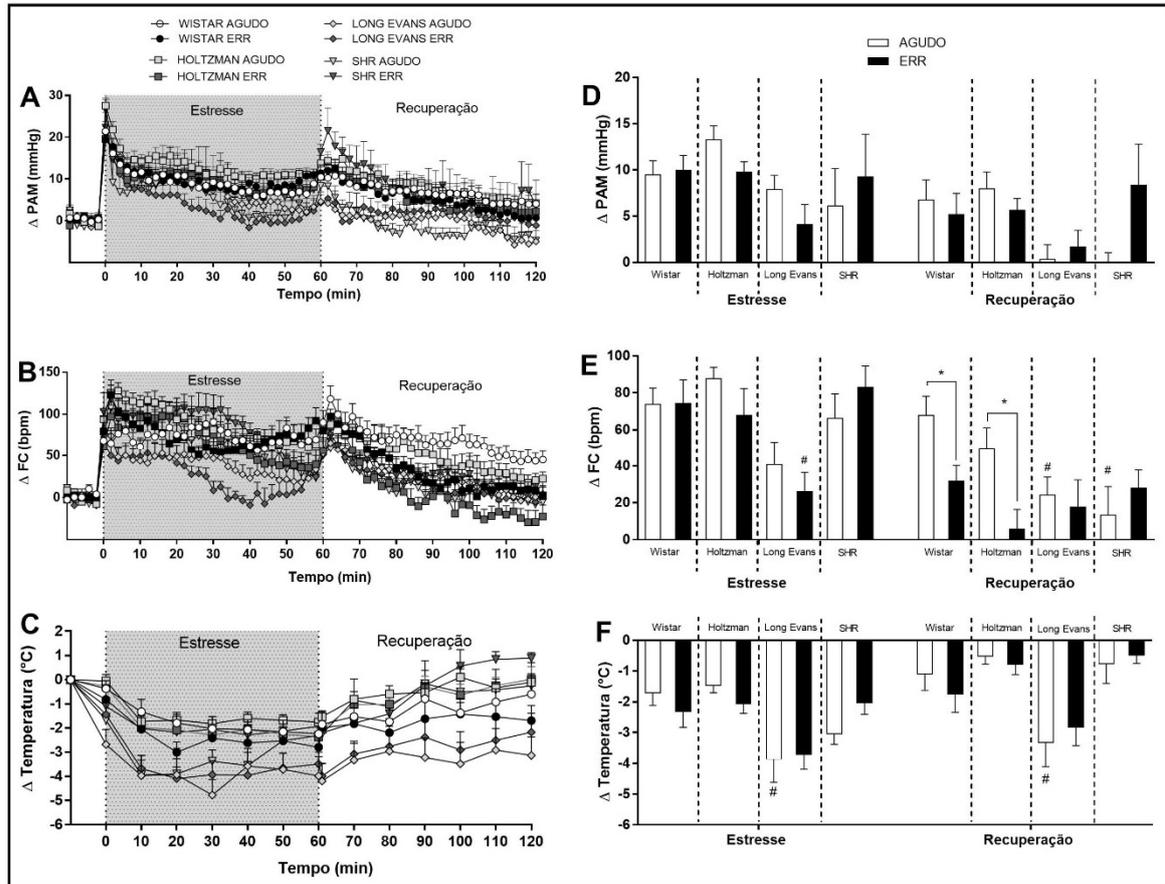


Figura 23 - Influência da linhagem do animal na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em ratos.

(A, B, C) Curvas temporais da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM), frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) e temperatura da cauda ( $\Delta$  temperatura da cauda). Os símbolos representam a média e as barras o EPM. ANOVA trifatorial. (D, E, F) Média  $\Delta$ PAM,  $\Delta$ FC e  $\Delta$  temperatura da cauda ao longo do período de restrição e recuperação nos grupos agudo (Barras brancas), ERR (Barras pretas). As barras representam a média  $\pm$  SEM. \*  $P < 0,05$  versus respectivo grupo agudo, #  $P < 0,05$  versus respectivo grupo Wistar ANOVA trifatorial. Sessão aguda de restrição e todos os ensaios no protocolo ERR duraram 60 min.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo suportam a nossa hipótese inicial de que as respostas cardiovasculares habitam durante a exposição repetida ao estresse de restrição. A habituação das respostas cardiovasculares durante a exposição repetida ao estresse de restrição foi principalmente identificada como um retorno mais rápido da FC aos valores basais durante o período pós-estresse.

A avaliação da habituação da resposta de aumento da corticosterona sérica indicou diminuição da resposta na 10ª sessão de 60 minutos de restrição. A redução na resposta foi observada tanto durante a sessão de restrição quanto no período de recuperação. A grande maioria das informações sobre o processo de habituação durante a exposição repetida ao mesmo estressor (ou seja, estressor homotípico) foi obtida a partir de estudos que avaliaram a ativação simpática adrenal e do eixo HPA (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; MCCARTY, 2016; RABASA et al., 2015). Em relação a este último, a habituação foi consistentemente documentada em animais durante a exposição a diversos estressores, incluindo o estresse de restrição (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009). Tal como observado no presente estudo, a habituação da resposta de corticosterona ao estresse de restrição é observada como uma redução da resposta durante a sessão de restrição, que por sua vez resulta em menores valores durante o período de recuperação (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009). Esse padrão de habituação é diferente daqueles identificados no presente estudo para as respostas cardiovasculares. De fato, nós identificamos no presente estudo que a habituação das respostas cardiovasculares ao estresse foi observada principalmente em termos de um retorno mais rápido da FC aos valores basais durante o período pós-estresse. No entanto, os valores de FC durante a 10ª sessão foram semelhantes aos observados durante a sessão aguda de restrição. Além disso, o aumento da PAM e a queda da temperatura da cauda não demonstraram nenhum sinal de habituação. Em conjunto, os dados da corticosterona sérica e as respostas cardiovasculares ao estresse de restrição indicam que o processo habituação é específico para os diferentes sistemas fisiológicos, não constituindo uma resposta generalizada do corpo. De acordo, alguns autores propuseram que outros sistemas fisiológicos que não o eixo HPA, incluindo o sistema cardiovascular, são menos sensíveis ao processo de habituação. (RABASA et al., 2015). Uma explicação para a menor habituação das respostas cardiovasculares pode ser o impacto dramático que uma resposta insuficiente pode provocar na homeostase dos órgãos. De qualquer forma, mais estudos são necessários para avaliar sistematicamente as diferenças na habituação

das respostas neuroendócrinas versus cardiovasculares durante a exposição a estressores homotípicos.

Diminuição da expressão de c-fos após a exposição repetida ao estresse de restrição tem sido relatada em regiões encefálicas responsivas ao estresse e atuantes na geração das respostas cardiovasculares durante situações aversivas (CHEN; HERBERT, 1995; LACHUER et al., 1994; STAMP; HERBERT, 1999). Esses achados indicam que a habituação das respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse de restrição pode ser, ao menos em parte, devido à diminuição da ativação do circuito central de controle do sistema nervoso autônomo. Contudo, expressão c-fos sustentada após a exposição repetida ao estresse de restrição foi relatada em outras estruturas, como o septo lateral, a área pré-óptica lateral, o hipotálamo lateral e o locus coeruleus (CHEN; HERBERT, 1995; LACHUER et al., 1994; STAMP; HERBERT, 1999). Nesse sentido, a habituação pode também estar relacionada à ativação sustentada de estruturas encefálicas que desempenham papel inibitório nas respostas cardiovasculares ao estresse. De fato, foi documentado que o hipotálamo lateral e a área pré-óptica lateral desempenham papel inibitório no controle das respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse (DEOLINDO et al., 2013; DUARTE et al., 2017). De qualquer maneira, mais estudos são necessários para abordar as vias centrais relacionadas com a habituação das respostas cardiovasculares ao estresse.

Como abordado na Introdução, a adaptação ao estresse crônico é amplamente determinada pelo processo de habituação, que limita o impacto do estresse a longo prazo, diminuindo assim as implicações deletérias para a sobrevivência e o bem-estar (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; HERMAN, 2013; MCCARTY, 2016). Nesse sentido, as evidências obtidas no presente estudo indicam que a habituação das respostas cardiovasculares ao estresse constitui resposta adaptativa importante, constituindo um componente proeminente de enfrentamento do estresse. No entanto, evidências anteriores de habituação das respostas cardiovasculares ao estresse são inconsistentes na literatura (CRESTANI, 2016). Especificamente em relação às respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse de restrição, alguns estudos relataram habituação (BECHTOLD et al., 2009; CHEN; HERBERT, 1995), enquanto outros acharam que as respostas cardiovasculares não se habitam após a exposição repetida a esse estressor (CONTI et al., 2001; DAUBERT et al., 2012; MCDOUGALL et al., 2000; STAMP; HERBERT, 1999). Estas últimas descobertas suportaram proposições de que as respostas cardiovasculares podem não habituar (RABASA et al., 2015). No entanto, um importante ponto a notar é que as evidências de habituação no presente estudo foram identificadas principalmente como uma diminuição dos valores no período pós-restrição (ou

seja, período de recuperação). A identificação da habituação principalmente como retorno mais rápido aos valores basais durante o período pós-estresse também foi relatada em estudos que avaliaram a resposta do eixo HPA (RABASA et al., 2015). É importante ressaltar que alguns estudos que avaliaram as respostas cardiovasculares após a exposição repetida estímulos aversivos não incluíram a análise durante o período pós-estresse (BECHTOLD et al., 2009; CHEN; HERBERT, 1995; CONTI et al., 2001; STAMP; HERBERT, 1999). Isso pode, ao menos em parte, explicar a inconsistência na literatura. Claramente, a recuperação de parâmetros cardiovasculares em relação aos valores basais deve ser analisada em conjunto com as mudanças durante a exposição ao estresse, especialmente em estudos avaliando o processo de habituação.

### **6.1 Bloco 1: influência da duração, volume e frequência do estímulo estressor na habituação das respostas cardiovasculares**

Com relação à influência da duração, volume e frequência das sessões de estresse de restrição, nós observamos retorno mais rápido da FC aos valores basais durante o período pós-estresse da 10ª sessão em ratos submetidos a sessões diárias de 60 ou 120 min, mas não 30 min, de estresse de restrição. No entanto, o retorno mais rápido da FC aos valores basais durante o período pós-estresse observado na 10ª sessão em ratos expostos a sessões diárias de 60 min não foi identificado na 5ª e 20ª sessões. Com relação à frequência de apresentação das sessões de estresse de restrição, a taquicardia durante a 10ª sessão de restrição foi aumentada em ratos submetidos a 60 min de restrição apresentado em dias alternados, ao passo que redução dessa resposta foi observada no grupo de 5 dias + 72 h. Sessões de 30 minutos de restrição apresentadas duas vezes ao dia e o protocolo de três sessões diárias de 60 min seguidas de um dia de repouso não afetaram as respostas cardiovasculares causadas pelo estresse de restrição na 10ª sessão. Nenhuma evidência de habituação foi identificada para a resposta de vasoconstricção cutânea.

Em artigo clássico de Thompson & Spencer em 1966, revisado posteriormente por Rankin e colaboradores 2009 (RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966), foi proposto uma lista de características que parecem ser comuns ao processo de habituação de várias respostas em todos os organismos estudados. Embora algumas dessas regras não foram demonstradas experimentalmente (RABASA et al., 2015), as definições e critérios propostos forneceram um quadro teórico para a avaliação do processo de habituação das respostas

fisiológicas e comportamentais ao estresse crônico (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; MCCARTY, 2016). Uma suposição importante nos critérios é que a manipulação de variáveis relacionadas ao estímulo aversivo pode modificar a magnitude ou a velocidade de desenvolvimento da habituação (RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966). Essas variáveis manipuláveis podem ser o número ou a frequência das sessões de estresse, bem como a intensidade do estímulo (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966). A influência destas variáveis sobre a habituação das respostas do eixo HPA e do sistema simpático adrenal ao estresse tem sido amplamente discutida na literatura (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; MCCARTY, 2016; RABASA et al., 2015). No entanto, até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a avaliar de maneira sistemática a influência de variáveis como duração, frequência e número de sessões aversivas sobre a habituação das respostas cardiovasculares.

Estudos que avaliaram as respostas de ativação do eixo HPA (DE BOER et al., 1990; MA; LIGHTMAN, 1998; ZHANG et al., 2014) e catecolaminas plasmáticas (DE BOER et al., 1990) forneceram evidências de que a diminuição da resposta está positivamente relacionada com a frequência de exposição ao estímulo estressor. Estes resultados suportam o critério de habituação que propõe que quanto maior a frequência de estimulação, mais rápida e/ou mais pronunciada é a habituação (RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966). Nossos resultados também são consistentes com esse critério. Por exemplo, os valores reduzidos de FC observados em ratos sujeitos a sessões diárias de 60 minutos de restrição não foram identificadas em protocolos em que a frequência de exposição ao estresse de restrição foi reduzida (por exemplo, a cada dois dias) ou quando dias de descanso foram incluídos entre as exposições diárias (por exemplo, 3 dias + 48h). A ausência de habituação em ratos submetidos a 30 minutos de restrição apresentado duas vezes ao dia pode não ser consistente com o critério. Entretanto, no protocolo que avaliamos a influência da duração da sessão diária também não identificamos habituação com 10 sessões diárias de 30 min de estresse por restrição. É interessante notar que mesmo aumentando a frequência (duas vezes ao dia) não identificamos habituação em ratos submetidos a 30 min de sessões de estresse de restrição. Como discutido abaixo, uma possibilidade é que 30 minutos de restrição pode ser um estímulo curto, precisando de mais sessões para o desenvolvimento do processo de habituação (RABASA et al., 2015).

Tem sido proposto que estressores como o estresse de restrição podem precisar de mais dias para alcançar a máxima habituação quando comparado com estressores mais severos, como o estresse de imobilização (RABASA et al., 2015). Ma e Lightman (1998) foram os primeiros que relataram redução progressiva da resposta de ativação do eixo HPA em função do número

de experiências anteriores com o estresse de restrição (MA; LIGHTMAN, 1998). No entanto, como os diferentes protocolos foram realizados com frequências diferentes, não é possível isolar a influência do número de sessões. No entanto, outros estudos indicaram uma progressiva resposta de habituação do eixo HPA com o número de exposições ao estresse de imobilização ou de restrição (MÁRQUEZ; NADAL; ARMARIO, 2004; RABASA et al., 2015). No presente estudo, investigamos a possível influência do número de exposições (volume) ao estresse de restrição (5, 10 ou 20 dias), mas sem alterar a frequência e duração das sessões de estresse (ou seja, 60 min/dia). Os resultados relatados no presente estudo são em grande parte consistente com os achados obtidos em estudos que avaliaram a resposta do eixo HPA descritos acima, uma vez que valores de FC diminuídos durante o período de recuperação foram identificados em ratos submetidos a 10 sessões, mas não a cinco sessões de restrição. Contudo, nenhuma alteração foi identificada em ratos submetidos a 20 sessões diárias de estresse de restrição. Este último achado foi surpreendente, já que uma habituação progressiva era esperada aumentando o volume do estressor crônico. Alguns autores tem proposto que a habituação pode atingir um “efeito teto” com exposições repetidas (RABASA et al., 2015). Além disso, os critérios de habituação incluem a proposição de recuperação espontânea quando a exposição às sessões de estresse é interrompida (RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966). Entretanto, até onde sabemos, os resultados reportados aqui são os primeiros a indicar uma recuperação da habituação durante a exposição a um protocolo de estresse crônico. Mais estudos são necessários para esclarecer os fatores e mecanismos relacionados com esta recuperação espontânea.

A duração das sessões diárias de estresse foi proposta como um fator crítico que afeta o processo de habituação (RABASA et al., 2015). Este fator não foi considerado nos critérios definidos por Thompson & Spencer (1966) e revisado por Rankin et al (2009), mas resultados mais recentes indicaram que a habituação está positivamente relacionada com a duração das sessões diárias de estresse (RABASA et al., 2015). Por exemplo, foi identificada uma diminuição maior da resposta de ACTH em ratos expostos a 3 horas de estresse de imobilização em relação àqueles submetidos a sessões de 1 hora do mesmo estressor (RABASA et al., 2015). Os resultados relatados no presente estudo estão em consonância com essas descobertas. De fato, observamos que sessões diárias de 30 minutos não provocaram qualquer mudança nas respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse de restrição. No entanto, sessões diárias de 60 minutos diminuíram valores de FC no período pós-restrição da 10ª sessão, enquanto sessões diárias de 120 minutos diminuíram os valores de pressão arterial e FC durante a recuperação da

10<sup>o</sup> sessão. Assim, conforme relatado para a resposta do eixo HPA, a habituação das respostas cardiovasculares é fortemente dependente da duração das sessões diárias de estresse.

A diminuição progressiva das respostas fisiológicas e comportamentais durante a exposição repetida ao mesmo estressor foi proposta como um processo dependente de aprendizado (MCCARTY, 2016; RABASA et al., 2015). Assim, a influência de fatores como duração, frequência e número de sessões podem ser explicados pelo processo de aprendizagem relacionado à habituação. Neste sentido, a habituação necessitará de mais tempo para uma completa consolidação se a duração de cada sessão de estresse for muito curta (RABASA et al., 2015). Assim, no caso da ausência de habituação em ratos submetidos a sessões de 30 minutos de estresse de restrição é possível que mesmo aumentando a frequência das sessões (duas vezes por dia versus diariamente) mais sessões de estresse são necessárias para a consolidação da memória nessa situação. Por outro lado, os maiores sinais de habituação em ratos expostos a sessões diárias de 120 minutos estão possivelmente relacionados a uma facilitação do processo de aprendizagem. Tem sido demonstrado que os principais mediadores liberados no estresse, como catecolaminas e glicocorticoides, aumentam a aquisição e a consolidação de memórias (QUAEDFLIEG; SCHWABE, 2018). Assim, maior contato com os mediadores liberados durante o estresse pode explicar a facilitação na habituação observada com aumento da frequência de exposição a situações aversivas. Qualquer aprendizado é possivelmente um processo contínuo, o que pode explicar a progressiva habituação com o número de sessões. A falta de habituação identificada em ratos submetidos a 20 dias de estresse de restrição pode estar relacionado ao comprometimento da memória evocada pelo estresse (QUAEDFLIEG; SCHWABE, 2018). Assim, é possível que a evocação de memórias consolidadas durante as fases iniciais do estresse crônico seja prejudicada posteriormente por protocolos longos de estresse, proporcionando assim uma recuperação espontânea da habituação. No entanto, como dito acima, os presentes achados são os primeiros a indicar uma recuperação espontânea da habituação durante um protocolo de estresse crônico. Mais estudos são necessários para investigar se esse efeito se estende a outros sistemas fisiológicos, bem como para explorar os mecanismos envolvidos.

## 6.2 Bloco 2: influência da exposição a outros estressores e do treinamento físico em esteira na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição

Os resultados relatados no presente estudo fornecem a primeira evidência de que a exposição a outros estressores crônicos prejudica o desenvolvimento da habituação das respostas fisiológicas a estressores homotípicos. De fato, identificamos que a habituação das respostas cardiovasculares identificadas na 10ª sessão de 60 minutos de estresse de restrição foi caracterizada principalmente como um retorno mais rápido da FC aos valores basais durante o período pós-estresse. A habituação da resposta da FC foi completamente inibida em animais que foram previamente expostos a protocolo de ECV ou simultaneamente expostos ao estresse de isolamento social durante o ERR. O treinamento físico em esteira também inibiu a habituação da taquicardia ao estresse de restrição. Além disso, o ECV aumentou a resposta de PAM em animais submetidos ao ERR, enquanto o isolamento social aumentou tanto a taquicardia durante uma sessão aguda de restrição quanto a queda da temperatura da cauda em ratos submetidos ao ERR.

Um dos critérios definidos por Thompson & Spencer (1966) e revisado por Rankin e colaboradores (2009) (característica 8) propõe que “*a apresentação de outro estímulo (geralmente forte) resulta na recuperação da resposta habituada (desabituação)*” (RANKIN et al., 2009; THOMPSON; SPENCER, 1966). Embora este critério não tenha sido investigado experimentalmente, mesmo em termos de resposta do sistema simpático adrenal e do eixo HPA (MCCARTY, 2016), essa desabituação propõe que uma resposta anteriormente habituada deveria apresentar pelo menos os níveis basais de resposta durante a exposição a um novo estímulo. Em outras palavras, a habituação não é uma resposta generalizada a todos os estímulos aversivos, de modo que uma determinada resposta habituada a um estímulo específico (por exemplo, restrição) deve ser apresentada como normal durante a exposição a um outro estressor. Nesse sentido, embora a proposta do presente estudo tenha sido estudar a interação de um estressor homotípico que promove habituação com outros estímulos estressores, a hipótese testada no presente estudo é diferente dos critérios propostos por Thompson e Spencer (1966), uma vez que investigamos o impacto da exposição a outros estressores crônicos na aquisição da habituação, e não na “desabituação” de uma resposta habitual. Assim, até onde sabemos, o presente estudo fornece a primeira evidência de que a exposição a outros estímulos aversivos pode afetar o processo de habituação.

O ECV é um estresse crônico que não promove habituação, e que tem sido demonstrado causar alterações na atividade e resposta do eixo HPA, comportamentos do tipo ansiolítico e depressivo e disfunções autônomas e cardiovasculares (ALMEIDA et al., 2015; DUARTE et al., 2015; GRIPPO; JOHNSON, 2009; WILLNER, 2005, 2017). Além disso, foi relatado que esse estressor crônico aumenta as respostas fisiológicas a estressores novos (isto é, diferentes daqueles apresentados durante o protocolo) (CRESTANI, 2016; HERMAN, 2013). Nesse sentido, estudos anteriores identificaram aumento das respostas de pressão arterial e FC ao estresse por jato de ar (isto é, novo estressor) em ratos previamente expostos ao protocolo ECV (GRIPPO et al., 2006; GRIPPO; MOFFITT; JOHNSON, 2002). Nossos resultados de aumento da resposta de PAM durante o estresse restrição no grupo ECV + agudo estão de acordo com esses achados anteriores. Além disso, a resposta aumentada de PAM observada no grupo ECV+ERR fornece evidências adicionais de que o impacto do ECV é observado mesmo após a exposição repetida ao novo estressor. Os resultados reportados aqui também fornecem novas evidências de que o ECV prejudica o processo de habituação das respostas cardiovasculares. Nossos resultados constituem a primeira evidência de que o ECV afeta o desenvolvimento da habituação durante a exposição repetida a um mesmo estressor.

A interação com membros da mesma espécie é um fator social muito importante, que pode afetar as funções fisiológicas e a responsividade ao estresse. Nesse sentido, estudos em humanos e em animais demonstraram que a ruptura dos laços sociais e a percepção de isolamento (solidão) estão associados a um aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular (CRUZ et al., 2016; ROZANSKI; BLUMENTHAL; KAPLAN, 1999; STEPTOE; KIVIMAKI, 2012). Nesse sentido, similarmente ao ECV, o isolamento social potencializou as respostas cardiovasculares evocadas pelo estresse de restrição, como evidenciado pelo aumento da taquicardia e queda da temperatura cutânea da cauda no grupo agudo isolado. Até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a investigar o impacto do isolamento social nas respostas cardiovasculares a um estressor novo. Apesar da evidência de habituação da resposta do eixo HPA durante o isolamento social crônico (HODGES; MCCORMICK, 2015; MCCORMICK et al., 2007), um estudo que avaliou a resposta do eixo HPA identificou que 16 sessões diárias seguidas de 1h de isolamento social aumentou a resposta de corticosterona evocada pelo estresse de restrição em ratas, mas não em ratos (MCCORMICK et al., 2005). Além disso, o aumento de corticosterona causada pelo estresse de restrição foi facilitado em ratas adultas submetidas ao isolamento social durante a adolescência, enquanto a resposta foi diminuída em animais machos adultos. (WEINTRAUB; SINGARAVELU; BHATNAGAR, 2010). Apesar das diferenças no protocolo de isolamento social, bem como algumas evidências

de que o isolamento social durante a adolescência aumentou a resposta do eixo HPA a outros estressores (por exemplo, nado forçado e sobressalto) (MATHEWS et al., 2008; WEISS et al., 2004), os resultados descritos acima indicam que as respostas do eixo HPA e cardiovasculares evocadas pela restrição são diferentemente afetadas pelo isolamento social. Nós também identificamos no presente estudo que o isolamento social prejudicou a habituação da resposta de FC durante a exposição repetida ao estresse de restrição. Nosso achado contrasta com evidências anteriores de que o isolamento social pós-desmame não afetou a habituação da reatividade de sobressalto ao estresse acústico em diferentes linhagens de ratos (VARTY; GEYER, 1998). Uma possível influência do isolamento social na habituação das respostas fisiológicas durante a exposição a estressores homotípicos nunca foi avaliada anteriormente. Portanto, apesar da diferença entre o protocolo de isolamento social e o estressor avaliado, as evidências citadas acima juntamente com os resultados do presente estudo indicam que o isolamento social afeta diferentemente a habituação das respostas comportamentais e cardiovasculares ao estresse.

Embora o exercício físico gere respostas similares às aquelas identificadas durante situações aversivas, como ativação do eixo HPA e alterações cardiovasculares, uma distinção com estresse emocional foi proposta em termos de “estresse bom” (por exemplo, exercício) e “estresse ruim” (por exemplo, estresse emocional), com base nas alterações fisiológicas e no impacto na etiologia e desenvolvimento de patologias (HEIJNEN et al., 2016). Até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a investigar o efeito do treinamento físico em esteira nas respostas cardiovasculares ao estresse em roedores. No entanto, a ausência de efeito do treinamento nas alterações cardiovasculares evocadas pelo estresse restrição contrasta com evidências anteriores de que a corrida voluntária em roda diminuiu as respostas cardiovasculares a uma sessão aguda de campo aberto, troca de gaiola e estresse de restrição (MASINI et al., 2011; MORIMOTO et al., 2000). Além disso, a inibição da habituação da resposta de taquicardia evocada pelo estresse de restrição nos ratos treinados também contrasta com evidências de que a corrida voluntária em roda aumentou a habituação das respostas cardiovasculares observadas após a exposição repetida ao estresse audiogênico (MASINI et al., 2011). A ausência de efeito não está relacionada a um protocolo de treinamento ineficiente, uma vez que os animais treinados apresentaram melhor desempenho físico na esteira (Figura 18). Nesse sentido, as discrepâncias com estudos anteriores podem estar relacionadas a diferenças no tipo de treinamento físico e/ou estímulo aversivo. Em relação ao tipo de estressor, evidências anteriores indicaram que o impacto do exercício é dependente do tipo de estresse (CAMPEAU et al., 2010; DROSTE et al., 2003, 2006, 2007). De fato, estudos avaliando as

respostas neuroendócrinas identificaram que a corrida espontânea em roda reduziu as respostas do eixo HPA a estressores de menor intensidade (CAMPEAU et al., 2010; DROSTE et al., 2003, 2006, 2007), enquanto que esta resposta foi aumentada em estressores mais intensos, incluindo o estresse de restrição (DROSTE et al., 2003, 2006). Juntamente com as evidências relatadas aqui, esses resultados sugerem que as respostas cardiovasculares (sem efeito) e do eixo HPA (reforçada) ao estresse de restrição são afetadas diferentemente pelo exercício. Em relação ao tipo de treinamento físico, embora o treinamento em esteira possa ser potencialmente mais estressante do que a corrida voluntária em roda, esse possível componente estressante parece não explicar as discrepâncias. De fato, como dito acima, estudos prévios identificaram aumento da resposta de corticosterona ao estresse de restrição em animais submetidos a corrida voluntária (DROSTE et al., 2003, 2006). Além disso, estudos anteriores relataram habituação de ratos aos procedimentos de treinamento físico em esteira (WHITE-WELKLEY et al., 1995). Portanto, novos estudos comparando diretamente diferentes protocolos de treinamento são necessários para avaliar a influência do tipo de treinamento físico nas respostas cardiovasculares ao estresse.

A sensibilização de respostas fisiológicas ao estresse tem sido relatada principalmente em termos de respostas aumentadas em animais cronicamente estressados diante de um estressor novo (RABASA et al., 2015). Desse modo, as respostas cardiovasculares aumentadas ao estresse de restrição relatadas no presente estudo em animais submetidos ao ECV e ao isolamento social estão de acordo com essas evidências anteriores. A sensibilização foi descrita como subjacente a vários distúrbios fisiológicos, neurológicos e psiquiátricos; incluindo patologias cardiovasculares (RABASA et al., 2015; URSIN, 2014). De fato, estudos documentaram que hiperresponsividade da pressão arterial ao estresse está associada a risco aumentado de doenças cardiovasculares (JENNINGS et al., 2004; STEPTOE et al., 1996). Portanto, o presente estudo fornece evidências adicionais de que a reatividade cardiovascular aumentada para novos estressores pode ser um mecanismo proeminente relacionado a disfunções cardiovasculares relacionadas à exposição crônica a eventos adversos. Em relação ao processo de habituação, como exposto na introdução, propõe-se que a adaptação ao estresse crônico seja amplamente determinada pelo processo de habituação, que limita o impacto do estresse a longo prazo, diminuindo as implicações deletérias para a sobrevivência e o bem-estar. (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; HERMAN, 2013; MCCARTY, 2016). Nesse sentido, os resultados relatados no presente estudo fornecem novas evidências de que patologias relacionadas ao estresse podem também ser consequência de um comprometimento do processo de habituação a estressores homotípicos.

### **6.3 Bloco 3: Influência do sexo, da linhagem e da idade na habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição**

Os resultados fornecem evidências de habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em ratos Wistar (grupo controle), sendo essa resposta principalmente caracterizada por um retorno mais rápido da FC aos valores basais durante o período pós-estresse nos animais expostos repetidamente ao estresse de restrição (isto é, 10<sup>o</sup> sessão). Independentemente das diferenças nos parâmetros cardiovasculares basais (valores pré-estresse), o perfil de habituação identificado nos ratos Wistar foi similar nas fêmeas Wistar, nos ratos Wistar idosos e nos ratos Holtzman. A habituação nos animais ratos adolescentes Wistar foi identificada em termos de resposta reduzida de FC durante o período de estresse da 10<sup>o</sup> sessão. Entretanto, nós não identificamos sinais de habituação nos ratos Long-Evans e SHR. Além disso, a comparação das respostas durante a sessão aguda de restrição indicou um retorno mais rápido da FC aos valores basais no período pós-estresse nos animais Long-Evans e SHR adultos e nos ratos Wistar adolescentes, ao passo que os ratos Wistar idosos apresentaram resposta de pressão arterial reduzida durante os períodos de estresse e recuperação. A análise da resposta de queda da temperatura cutânea da cauda indicou respostas mais acentuada nas fêmeas ERR em relação ao grupo fêmea agudo e nos ratos Long-Evans agudo em relação aos ratos Wistar agudo.

Com relação à influência do sexo, nós não identificamos diferenças na fase do ciclo estral das ratas controle e submetidas ao ERR, o que indica que 10 dias de estresse de restrição não causou alterações no ciclo estral. Alguns estudo reportaram alterações do ciclo estral após a exposição a estressores crônicos, porém esses estressores foram mais intensos, e essas alterações parecem ser mais evidentes com protocolos de estresse mais longos (>10 dias) (GRONROOS; KAUPPILA, 1959). Foi observado redução nos níveis do hormônio estradiol após 21 dias de estresse de restrição (GALEA et al., 1997), o que pode estar relacionado com as alterações no ciclo estral .

A análise dos parâmetros cardiovasculares basais indicou que as ratas apresentaram valores maiores de FC e temperatura cutânea cauda em relação aos animais machos. Os dimorfismos sexuais nos parâmetros basais de FC são bem descritos na literatura (VIEIRA et al., 2018; YANG et al., 2007), sendo observados em animais e humanos (DART; DU; KINGWELL, 2002; VIEIRA et al., 2018; YANG et al., 2007). Entretanto, nós não identificamos diferenças entre os machos e fêmeas nas respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. Estudos anteriores mostraram que as respostas de aumento na atividade simpática,

pressão arterial e FC foram maiores em animais fêmeas quando comparadas com seus pares machos (ANISHCHENKO et al., 2007; AZAR; SHARP; LAWSON, 2005; EIKELIS; VAN DEN BUUSE, 2000). As razões para a discrepância com os achados obtidos em nosso estudo não estão claros. Entretanto, cabe também destacar que em um estudo prévio do nosso grupo nós observamos que o ECV aumentou a FC basal e a atividade simpática cardíaca em machos, mas sem afetar esses parâmetros nas fêmeas; ao passo que o ERR aumentou a atividade simpática e a FC em ambos os sexos (VIEIRA et al., 2018). Desse modo, os dados disponíveis não fornecem evidências conclusivas em termos de vulnerabilidade ou resiliência das fêmeas para os efeitos cardiovasculares do estresse. Isso nos mostra que mais estudos são necessários para elucidar o dimorfismo sexual nas respostas cardiovasculares ao estresse crônico.

Assim como observado nos animais machos, nas fêmeas identificamos que a habituação das respostas cardiovasculares na 10<sup>a</sup> sessão de 60 minutos de restrição foi caracterizada principalmente como um retorno mais rápido da FC aos valores basais durante o período pós-estresse. Como discutido acima, a diminuição progressiva dos efeitos fisiológicos e respostas comportamentais durante a exposição repetida ao mesmo estressor é proposto como um processo dependente de aprendizado (MCCARTY, 2016; RABASA et al., 2015). Nesse sentido, fêmeas superaram os machos na aprendizagem de associar estímulos ao longo do tempo (DALLA et al., 2009), assim indicando que as fêmeas podem aprender e reconhecer melhor o estímulo aversivo. Estudos anteriores reportaram que apesar das fêmeas apresentarem valores absolutos maiores de corticosterona no período basal e durante a exposição ao estresse (OYOLA; HANDA, 2017), a habituação do eixo HPA durante a exposição repetida ao estresse de restrição em fêmeas foi semelhante aos machos (BABB et al., 2014). Desse modo, em conjunto com os resultados obtidos no presente estudo, os dados de habituação do eixo HPA indicam que apesar das diferenças na memória, animais machos e fêmeas parecem apresentar mesmo perfil de habituação das respostas fisiológicas ao estresse de restrição.

A resposta de temperatura da cauda foi facilitada nas ratas ERR em relação às ratas do grupo controle. Uma possível explicação para este resultado pode ser um aumento causado pelo estresse na reatividade vascular a agentes vasoativos. Nesse sentido, em um estudo recente do nosso grupo nós observamos que estressores crônicos, incluindo o ERR, causaram alterações na reatividade vascular a agentes vasoativos em ratas (VIEIRA et al., 2018).

Com relação à influência das linhagens, do nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a avaliar de maneira sistemática a influência das linhagens na habituação das respostas cardiovasculares durante a exposição a um estressor homotípico. A análise dos parâmetros cardiovasculares basais revelou diferenças entre as linhagens na PAM, sendo que os animais

Long-Evans e SHR apresentaram valores maiores em relação aos ratos Wistar. Os animais SHR constituem modelo experimental para estudo da hipertensão, no qual se tornam espontaneamente hipertensos durante fases iniciais da vida (OKAMOTO; AOKI, 1963). Entretanto, os animais Long-Evans não são considerados animais hipertensos. Desse modo, uma possível explicação para os valores maiores de PAM seja a hiperresponsividade desses animais. De fato, foi demonstrado valores maiores de corticosterona nos animais Long-Evans quando comparado com a linhagem Wistar (TOHEI et al., 2003), e essa linhagem também apresentou escores cumulativos de úlcera maiores que outras linhagens (Lewis, Wistar, SHR e Sprague-Dawley) quando expostos a sessões diárias de 2h de estresse de restrição em água por 10 dias (REDEI et al., 1994). Desse modo, as manipulações experimentais podem ter influenciado mais esses animais do que as demais linhagens, o que pode explicar os valores maiores de PAM. Na FC as linhagens Long-Evans e Holtzman apresentaram valores maiores. As explicações para essas diferenças não estão claras, mas comparando nossos dados com aqueles de estudos anteriores que usaram as mesmas linhagens foi possível observar que nossos valores de FC então discretamente mais altos (BIANCHI et al., 2019; MELO et al., 2019; SPERETTA et al., 2016). Entretanto, estudos futuros são necessários para uma melhor exploração dessas diferenças. De maneira interessante, o ERR não foi capaz de alterar os parâmetros basais avaliados. Esses dados estão de acordo com dados prévios que não identificaram alterações em parâmetros basais de PAM e FC após a exposição a protocolos de ERR (BENINI et al., 2019; MCDUGALL et al., 2000).

Nós observamos retorno mais rápido da FC aos valores basais durante o período pós-estresse da 10ª sessão de 60 minutos de estresse de restrição em ratos Wistar e Holtzman, mas não em ratos Long-Evans e SHR. Estudos anteriores demonstraram habituação da resposta do eixo HPA ao estresse em animais SHR (KVETNANSKY et al., 1979). Entretanto, os nossos achados estão de acordo com dados de (MCDUGALL et al., 2000) que não identificaram habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em animais SHR. Do nosso conhecimento, os dados reportados aqui são os primeiros a avaliar a habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição em ratos Long-Evans. Como discutido acima, a adaptação ao estresse crônico é amplamente determinada pelo processo de habituação, que limita o impacto a longo prazo do estresse, diminuindo as implicações deletérias para a sobrevivência e bem-estar (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009; HERMAN, 2013; MCCARTY, 2016). Desse modo, a evidência de comprometimento no processo de habituação nos animais Long-Evans e SHR indica que essas linhagens podem ser mais suscetíveis aos efeitos deletérios do estresse.

Foi reportado previamente que animais Long-Evans e SHR apresentaram valores basais e respostas ao estresse de corticosterona maiores em relação a ratos Wistar (TOHEI et al., 2003). Como discutido acima, a diminuição progressiva dos efeitos fisiológicos e respostas comportamentais após exposição repetida ao mesmo estressor foi proposto como um processo de aprendizado (MCCARTY, 2016; RABASA et al., 2015). Desse modo, considerando que concentrações elevadas de corticosterona podem comprometer o processo de aprendizado (COBURN-LITVAK et al., 2003; MCLAY; FREEMAN; ZADINA, 1998), uma possibilidade é que diferenças na atividade e responsividade do eixo HPA possam explicar a ausência de habituação das respostas cardiovascular nas linhagens SHR e Long-Evans. De qualquer modo, estudos futuros são necessários para explorar os mecanismos que explicam as diferenças nessas linhagens em termos de habituação das respostas cardiovasculares ao estresse.

Independentemente da exposição crônicas ao estresse, os animais adolescentes apresentaram valores basais aumentados de FC em relação aos ratos adultos e idosos. Esse achado está de acordo com estudos anteriores que identificaram valores basais aumentados de FC em roedores adolescentes em relação aos seus pares adultos (CANESE et al., 2009; DUARTE et al., 2015; RISTUCCIA; SPEAR, 2008). Nós também identificamos que o ERR não alterou os valores basais de PAM e FC nos animais adolescentes, o que está de acordo com dados anteriores do nosso grupo (DUARTE et al., 2015). Entretanto, a habituação das respostas cardiovasculares avaliada na 10ª sessão de 60 minutos de estresse de restrição foi identificada como uma redução da resposta taquicárdica durante a sessão de restrição, mas não durante a fase de recuperação, um perfil diferente de habituação ao ERR em relação àquele identificado nos animais adultos (isto é, redução da FC somente durante a fase de recuperação). Estudos prévios identificaram que a resposta de corticosterona durante a exposição repetida ao estresse de restrição não habitou-se na 12ª nem 22ª exposição a esse estímulo estressor em animais adolescentes (BARHA et al., 2011). Desse modo, nossos achados corroboram com evidências prévias de que o processo de habituação parece ocorrer de maneira diferente em animais adultos versus adolescentes (BARHA et al, 2011).

As diferenças na habituação das respostas cardiovasculares nos animais adolescentes e adultos podem estar relacionadas a diferenças ontológicas nos circuitos encefálicos relacionados com as respostas fisiológicas ao estresse. Nesse sentido, foi reportado que a exposição de animais adolescentes ao ERR reduziu os potenciais pós-sinápticos excitatórios na região pré-límbica do córtex pré-frontal medial (CPFM), um efeito que não foi observado em animais adultos (NEGRÓN-OYARZO et al., 2014). Esse efeito é importante, já

que a redução dos potenciais excitatórios no CPFM pode levar a redução na ativação de outras regiões envolvidas com as respostas ao estresse, o que pode diminuir as respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse. De qualquer modo, estudos futuros são necessários para explorar os mecanismos neurobiológicos relacionados com as diferenças observadas em animais adolescentes e adultos no processo de habituação.

Sabe-se que o envelhecimento é um processo complexo que resulta em declínio funcional e aumento da suscetibilidade a uma variedade de injúrias nos múltiplos sistemas do organismo. O tecido cerebral e seu metabolismo representa um ponto crítico, que pode culminar em maior susceptibilidade a doenças neurodegenerativas (CAMANDOLA; MATTSON, 2017). Declínio cognitivo relacionado à idade é relacionado com mudanças neuroanatômicas e neurofuncionais (CAMANDOLA; MATTSON, 2017; THAL, 2004). Neste sentido, estudos mostram redução da responsividade ao estresse a uma sessão de restrição em animais idosos (BUECHEL et al., 2014), o que suporta os achados de resposta reduzida de aumento da PAM durante a sessão aguda de estresse nos animais idosos observado no presente estudo. Entretanto, mesmo com as alterações características do envelhecimento, nossos resultados evidenciaram que os animais idosos demonstraram habituação similar em relação aos animais adultos das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. Do nosso conhecimento, os achados reportados aqui constituem a primeira evidência de habituação das respostas fisiológicas ao estresse em animais idosos.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo fornece evidências de habituação das respostas cardiovasculares após exposições repetidas ao estresse de restrição. Nossos resultados sugerem que a habituação é evidenciada principalmente durante o período pós-estresse, com retorno mais rápido da FC aos valores basais. Notavelmente, a diminuição das respostas cardiovasculares durante o estresse é dependente da duração, frequência e número de exposições às sessões aversivas.

Com relação à influência de outros estressores crônicos e do treinamento físico, nossos dados indicam que a exposição a outros estressores crônicos, como o ECV e o isolamento social, bem como o treinamento físico em esteira, inibem a habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. Esses achados fornecem novas evidências de que as patologias evocadas pelo estresse podem estar relacionadas a um comprometimento no processo de habituação a estressores homotípicos.

Por fim, com relação à influência de características individuais, apesar de diferenças na responsividade cardiovascular durante a sessão aguda, nossos dados não indicam dimorfismos sexuais no processo de habituação das respostas cardiovasculares ao estresse de restrição. Os ratos SHR e Long-Evans podem ser mais suscetíveis aos efeitos deletérios do estresse em relação às outras linhagens avaliadas, já que esses animais apresentaram comprometimento no processo de habituação. A influência da idade foi somente evidenciada como uma diferença no perfil de habituação nos animais adolescentes, apresentando sinais mais claros em relação aos animais adultos e idosos. Esses achados sugerem que a adolescência pode constituir fase ontogênica de melhor adaptação a estressores homotípicos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. et al. Effects of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment on depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. **Stress**, v. 18, n. 4, p. 462–474, jul. 2015.
- ANISHCHENKO, T. G. et al. Sex-related differences in cardiovascular stress reactivity in healthy and hypertensive rats. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, 2007.
- AZAR, T.; SHARP, J.; LAWSON, D. Stress-like cardiovascular responses to common procedures in male versus female spontaneously hypertensive rats. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, 2005.
- BABB, J. A. et al. Habituation of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones to repeated homotypic stress and subsequent heterotypic stressor exposure in male and female rats. **Stress**, 2014.
- BARHA, C. K. et al. Chronic restraint stress in adolescence differentially influences hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and adult hippocampal neurogenesis in male and female rats. **Hippocampus**, v. 21, n. 11, p. 1216–1227, nov. 2011.
- BECHTOLD, A. G. et al. Chronic blockade of hindbrain glucocorticoid receptors reduces blood pressure responses to novel stress and attenuates adaptation to repeated stress. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 5, p. R1445–R1454, 2009.
- BENINI, R. et al. Habituation of the cardiovascular responses to restraint stress in male rats: influence of length, frequency and number of aversive sessions. **Stress**, v. 22, n. 1, p. 151–161, 2 jan. 2019.
- BIANCHI, P. C. et al. Prolonged exposure to alcohol vapor causes change in cardiovascular function in female but not in male rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, 2019.
- BLESSING, W. W. Lower brainstem pathways regulating sympathetically mediated changes in cutaneous blood flow. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2003.
- BUECHEL, H. M. et al. Aged rats are hypo-responsive to acute restraint: Implications for psychosocial stress in aging. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 2014.
- BUSNARDO, C. et al. Paraventricular nucleus of the hypothalamus glutamate neurotransmission modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 11, p. 1611–22, nov. 2013.
- BUSNARDO, C. et al. Nitergic neurotransmission in the paraventricular nucleus of the hypothalamus modulates autonomic, neuroendocrine and behavioral responses to acute restraint stress in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2019.
- CAMANDOLA, S.; MATTSON, M. P. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. **The EMBO Journal**, 2017.
- CAMARGO, L. H. A. et al. Involvement of N-methyl-d-aspartate glutamate receptor and nitric oxide in cardiovascular responses to dynamic exercise in rats. **European Journal of Pharmacology**, 2013.
- CAMPEAU, S. et al. Hypothalamic pituitary adrenal axis responses to low-intensity stressors are reduced after voluntary wheel running in rats. **Journal of Neuroendocrinology**, 2010.
- CAMPEAU, S.; WATSON, S. J. Neuroendocrine and Behavioral Responses and Brain Pattern of C Fos Induction Associated with Audiogenic Stress. **J**

**NEUROENDOCRINOL**, 1997.

CANESE, R. et al. Peculiar response to methylphenidate in adolescent compared to adult rats: A phMRI study. **Psychopharmacology**, 2009.

CARNEVALI, L. et al. Structural and electrical myocardial remodeling in a rodent model of depression. **Psychosomatic Medicine**, v. 75, n. 1, p. 42–51, 2013.

CHEN, X.; HERBERT, J. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: Correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. **Neuroscience**, 1995.

COBURN-LITVAK, P. . et al. Chronic administration of corticosterone impairs spatial reference memory before spatial working memory in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, n. 1, p. 11–23, jul. 2003.

CONTI, L. H. et al. Repeated restraint stress-induced increase in baroreceptor reflex sensitivity: Role of corticotropin-releasing factor. **Neuropeptides**, v. 35, n. 2, p. 71–81, 2001.

COSTOLI, T. et al. Effects of chronic psychosocial stress on cardiac autonomic responsiveness and myocardial structure in mice. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, n. 6, p. H2133–H2140, jun. 2004.

CRESTANI, C. C. Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. **Frontiers in Physiology**, v. 7, 24 jun. 2016.

CRUZ, F. C. et al. Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic social stress: Immediate and long-term effects of social isolation during adolescence. **Developmental Neurobiology**, 2016.

CULLINAN, W. E. et al. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, v. 64, n. 2, p. 477–505, jan. 1995.

DALLA, C. et al. Female rats learn trace memories better than male rats and consequently retain a greater proportion of new neurons in their hippocampi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 8, p. 2927–2932, 24 fev. 2009.

DAMPNEY, R. A. L. Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 5, p. R429–R443, 2015.

DANESE, A.; MCEWEN, B. S. Adverse childhood experiences, allostasis, allostatic load, and age-related disease. **Physiology & behavior**, v. 106, n. 1, p. 29–39, abr. 2012.

DART, A. M.; DU, X. J.; KINGWELL, B. A. **Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system** **Cardiovascular Research**, 2002.

DAUBERT, D. L. et al. Nucleus of the solitary tract catecholaminergic neurons modulate the cardiovascular response to psychological stress in rats. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 19, p. 4881–4895, 2012.

DAYAS, C. V.; BULLER, K. M.; DAY, T. A. Medullary neurones regulate hypothalamic corticotropin-releasing factor cell responses to an emotional stressor. **Neuroscience**, 2001.

DE BOER, S. F. et al. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: Effect of interstressor interval length. **Physiology and Behavior**, 1990.

DEOLINDO, M. V et al. NMDA receptors in the lateral hypothalamus have an inhibitory influence on the tachycardiac response to acute restraint stress in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 3, p. 2374–2381, ago. 2013.

DROSTE, S. K. et al. Effects of Long-Term Voluntary Exercise on the Mouse Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3012–3023, jul. 2003.

DROSTE, S. K. et al. Long-Term Voluntary Exercise and the Mouse

Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis: Impact of Concurrent Treatment with the Antidepressant Drug Tianeptine. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, n. 12, p. 915–925, dez. 2006.

DROSTE, S. K. et al. Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis mainly at the adrenal level. **Neuroendocrinology**, 2007.

DUARTE, J. O. et al. Stress vulnerability during adolescence: Comparison of chronic stressors in adolescent and adult rats. **Psychosomatic Medicine**, 2015.

DUARTE, J. O. et al. Role of the lateral preoptic area in cardiovascular and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **Physiology and Behavior**, v. 175, p. 16–21, jun. 2017.

EIKELIS, N.; VAN DEN BUUSE, M. Cardiovascular responses to open-field stress in rats: Sex differences and effects of gonadal hormones. **Stress**, 2000.

ENGI, S. A.; PLANETA, C. S.; CRESTANI, C. C. Effect of voluntary ethanol consumption combined with testosterone treatment on cardiovascular function in rats: Influence of exercise training. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146974, jan. 2016.

F.K.MARCONDES; F.J.BIANCHI; A.P.TANNO. Determination of the estrous cycle phases of rats : some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, 2002.

FARADAY, M. M. Rat sex and strain differences in responses to stress. **Physiology and Behavior**, 2002.

FINNELL, J. E. et al. Physical versus psychological social stress in male rats reveals distinct cardiovascular, inflammatory and behavioral consequences. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, 2017.

FONE, K. C. F.; PORKESS, M. V. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 32, n. 6, p. 1087–102, ago. 2008.

GALEA, L. A. M. et al. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. **Neuroscience**, 1997.

GIROTTI, M. et al. Habituation to repeated restraint stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. **Neuroscience**, 2006.

GOMES-DE-SOUZA, L. et al. Involvement of endocannabinoid neurotransmission in the bed nucleus of stria terminalis in cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **British Journal of Pharmacology**, 2016.

GOULD, E.; TANAPAT, P. **Stress and hippocampal neurogenesis**. Biological Psychiatry. **Anais...**1999

GRIPPO, A. J. et al. The Effects of Chronic Fluoxetine Treatment on Chronic Mild Stress-Induced Cardiovascular Changes and Anhedonia. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 4, p. 309–316, fev. 2006.

GRIPPO, A. J.; JOHNSON, A. K. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: A review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. **Stress**, v. 12, n. 1, p. 1–21, 7 jan. 2009.

GRIPPO, A. J.; MOFFITT, J. A.; JOHNSON, A. K. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 2002.

GRISSOM, N.; BHATNAGAR, S. Habituation to repeated stress: get used to it. **Neurobiology of learning and memory**, v. 92, n. 2, p. 215–24, set. 2009.

GRONROOS, M.; KAUPPILA, O. HORMONAL-CYCLIC CHANGES IN RATS UNDER NORMAL CONDITIONS AND UNDER STRESS AS REVEALED BY VAGINAL SMEARS AFTER SHORR STAINING. **European Journal of Endocrinology**, v. XXXII, n. II, p. 261–271, 1 out. 1959.

- HEIJNEN, S. et al. Neuromodulation of Aerobic Exercise — A Review. v. 6, n. January, p. 1–6, 2016.
- HERMAN, J. P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, 2013.
- HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, 1997.
- HODGES, T. E.; MCCORMICK, C. M. Adolescent and adult male rats habituate to repeated isolation, but only adolescents sensitize to partner unfamiliarity. **Hormones and Behavior**, v. 69, p. 16–30, mar. 2015.
- JENNINGS, J. R. et al. Exaggerated Blood Pressure Responses During Mental Stress Are Prospectively Related to Enhanced Carotid Atherosclerosis in Middle-Aged Finnish Men. **Circulation**, v. 110, n. 15, p. 2198–2203, out. 2004.
- KVETNANSKY, R. et al. Sympatho-adrenal responses of spontaneously hypertensive rats to immobilization stress. **The American journal of physiology**, 1979.
- LACHUER, J. et al. The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronically daily restraint stress is stress specific like that of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Brain Research**, v. 638, n. 1–2, p. 196–202, fev. 1994.
- LAGRAAUW, H. M.; KUIPER, J.; BOT, I. Acute and chronic psychological stress as risk factors for cardiovascular disease: Insights gained from epidemiological, clinical and experimental studies. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2015.
- LI, H. Y.; SAWCHENKO, P. E. Hypothalamic effector neurons and extended circuitries activated in “neurogenic” stress: A comparison of footshock effects exerted acutely, chronically, and in animals with controlled glucocorticoid levels. **Journal of Comparative Neurology**, 1998.
- LUPIEN, S. J.; LEPAGE, M. **Stress, memory, and the hippocampus: Can’t live with it, can’t live without it**. Behavioural Brain Research. **Anais...2001**
- MA, X. M.; LIGHTMAN, S. L. The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. **Journal of Physiology**, 1998.
- MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiology and Behavior**, 2007.
- MÁRQUEZ, C.; NADAL, R.; ARMARIO, A. The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: Individual differences. **Neuroscience**, 2004.
- MASINI, C. V. et al. Effects of voluntary wheel running on heart rate, body temperature, and locomotor activity in response to acute and repeated stressor exposures in rats. **Stress**, 2011.
- MATHEWS, I. Z. et al. Increased depressive behaviour in females and heightened corticosterone release in males to swim stress after adolescent social stress in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 190, n. 1, p. 33–40, jun. 2008.
- MCCARTY, R. Learning about stress: neural, endocrine and behavioral adaptations. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 19, n. 5, p. 449–75, set. 2016.
- MCCORMICK, C. M. et al. Long-lasting, sex- and age-specific effects of social stressors on corticosterone responses to restraint and on locomotor responses to psychostimulants in rats. **Hormones and Behavior**, v. 48, n. 1, p. 64–74, jun. 2005.
- MCCORMICK, C. M. et al. Social instability in adolescence alters the central and peripheral hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a repeated homotypic stressor in male and female rats. **Journal of Neuroendocrinology**, 2007.
- MCDUGALL, S. J. et al. Restraint Stress : Differential Cardiovascular Responses

in Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 126–129, 2000.

MCEWEN, B. S. Protective and damaging effects of mediators. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 3, p. 171–179, 1998a.

MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1998b.

MCEWEN, B. S. STRESS AND HIPPOCAMPAL PLASTICITY. **Annual Review of Neuroscience**, 1999.

MCLAY, R. N.; FREEMAN, S. M.; ZADINA, J. E. Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes maze. **Physiology and Behavior**, 1998.

MELO, M. R. et al. Importance of the commissural nucleus of the solitary tract in renovascular hypertension. **Hypertension Research**, 2019.

MORIMOTO, K. et al. Spontaneous wheel running attenuates cardiovascular responses to stress in rats. **Pflügers Archiv**, v. 440, n. 2, p. 216, 2000.

MOSTOFISKY, E.; PENNER, E. A.; MITTLEMAN, M. A. Outbursts of anger as a trigger of acute cardiovascular events: A systematic review and meta-analysis. **European Heart Journal**, 2014.

NALIVAICO, E. **Animal models of psychogenic cardiovascular disorders: What we can learn from them and what we cannot** **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 2011.

NEGRÓN-OYARZO, I. et al. Effects of chronic stress in adolescence on learned fear, anxiety, and synaptic transmission in the rat prelimbic cortex. **Behavioural Brain Research**, v. 259, p. 342–353, fev. 2014.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, 1963.

OYOLA, M. G.; HANDA, R. J. **Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity** **Stress**, 2017.

PACCOLA, C. et al. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. **Animal Reproduction**, 2013.

QUAEDFLIEG, C. W. E. M.; SCHWABE, L. **Memory dynamics under stress** **Memory**, 2018.

RABASA, C. et al. Adaptation of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis to daily repeated stress does not follow the rules of habituation: A new perspective. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 56, p. 35–49, set. 2015.

RANKIN, C. H. et al. Habituation revisited: An updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, n. 2, p. 135–138, 2009.

REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, 1988.

REDEI, E. et al. Strain differences in hypothalamic-pituitary-adrenal activity and stress ulcer. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 266, n. 2, p. R353–R360, fev. 1994.

RISTUCCIA, R. C.; SPEAR, L. P. Autonomic responses to ethanol in adolescent and adult rats: a dose-response analysis. **Alcohol**, 2008.

ROMEO, R. D. et al. Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic-pituitary-adrenal axis plasticity. **Endocrinology**, 2006.

ROZANSKI, A.; BLUMENTHAL, J. A.; KAPLAN, J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. **Circulation**, 1999.

SAPOLSKY, R. M. et al. Hippocampal damage associated with prolonged

glucocorticoid exposure in primates. **Journal of Neuroscience**, 1990.

SAWCHENKO, P. E.; LI, H.-Y.; ERICSSON, A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. In: [s.l.: s.n.].

SGOIFO, A. et al. Incidence of arrhythmias and heart rate variability in wild-type rats exposed to social stress. **The American journal of physiology**, 1997.

SGOIFO, A. et al. Different sympathovagal modulation of heart rate during social and nonsocial stress episodes in wild-type rats. **Physiology and Behavior**, 1999.

SGOIFO, A. et al. Intermittent Exposure to Social Defeat and Open-field Test in Rats: Acute and Long-term Effects on ECG, Body Temperature and Physical Activity. **Stress**, v. 5, n. 1, p. 23–35, jan. 2002.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, 2000.

SPERETTA, G. F. et al. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. **Life Sciences**, 2016.

STAMP, J. .; HERBERT, J. Multiple immediate-early gene expression during physiological and endocrine adaptation to repeated stress. **Neuroscience**, v. 94, n. 4, p. 1313–1322, nov. 1999.

STEPTOE, A. et al. Cardiovascular Risk and Responsivity to Mental Stress: The Influence of Age, Gender and Risk Factors. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 3, n. 1, p. 83–93, fev. 1996.

STEPTOE, A.; KIVIMAKI, M. Stress and cardiovascular disease.(Report). **Nature Reviews Cardiology**, 2012.

STERLING, P. Allostasis: A model of predictive regulation. **Physiology and Behavior**, v. 106, n. 1, p. 5–15, 2012.

THAL, D. R. Neurodegeneration in Normal Brain Aging and Disease. **Science of Aging Knowledge Environment**, v. 2004, n. 23, p. pe26–pe26, 9 jun. 2004.

THOMPSON, R. F.; SPENCER, W. A. Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. **Psychological Review**, v. 73, n. 1, p. 16–43, 1966.

TOHEI, A. et al. Strain Difference in Pituitary-adrenal Axis between Wistar-Imamichi and Long Evans Adult Male Rats. **Experimental Animals**, v. 52, n. 5, p. 437–439, 2003.

UEYAMA, T. et al. Emotional stress induces transient left ventricular hypocontraction in the rat via activation of cardiac adrenoceptors: a possible animal model of “tako-tsubo” cardiomyopathy. **Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society**, 2002.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. **Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses** **Nature Reviews Neuroscience**, 2009.

URSIN, H. Brain sensitization to external and internal stimuli. **Psychoneuroendocrinology**, v. 42, p. 134–145, abr. 2014.

VARTY, G. B.; GEYER, M. A. Effects of isolation rearing on startle reactivity, habituation, and prepulse inhibition in male Lewis, Sprague-Dawley, and Fischer F344 rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, n. 6, p. 1450–1457, 1998.

VIANNA, D. M. L.; CARRIVE, P. Changes in cutaneous and body temperature during and after conditioned fear to context in the rat. **European Journal of Neuroscience**, 2005.

VIEIRA, J. O. et al. Sex differences in cardiovascular, neuroendocrine and behavioral changes evoked by chronic stressors in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 426–437, fev. 2018.

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

v. 1343, p. 83–92, jul. 2010.

WEISS, I. C. et al. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 152, n. 2, p. 279–295, jul. 2004.

WHITE-WELKLEY, J. E. et al. Treadmill exercise training and estradiol differentially modulate hypothalamic-pituitary-adrenal cortical responses to acute running and immobilization. **Physiology & Behavior**, v. 57, n. 3, p. 533–540, mar. 1995.

WILLNER, P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v. 52, n. 2, p. 90–110, 2005.

WILLNER, P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. **Neurobiology of Stress**, v. 6, p. 78–93, fev. 2017.

WOOLLEY, C. S.; GOULD, E.; MCEWEN, B. S. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. **Brain Research**, 1990.

YANG, J.-N. et al. Sex differences in mouse heart rate and body temperature and in their regulation by adenosine A<sub>1</sub> receptors. **Acta Physiologica**, v. 190, n. 1, p. 63–75, maio 2007.

ZHANG, W. et al. Greater physiological and behavioral effects of interrupted stress pattern compared to daily restraint stress in rats. **PLoS ONE**, 2014.