



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

---



**Estudo do efeito do estresse crônico sobre a função  
cardiovascular em ratas normotensas e espontaneamente  
hipertensas (SHR).**

**JONAS OLIVEIRA VIEIRA**

**Araraquara  
2017**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

**Estudo do efeito do estresse crônico sobre a função  
cardiovascular em ratas normotensas e espontaneamente  
hipertensas (SHR).**

**Candidato:** Jonas de Oliveira Vieira

**Orientador**

Nome: Carlos Cesar Crestani

E-mail: [crestani@fcar.unesp.br](mailto:crestani@fcar.unesp.br)

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia.

Rodovia Araraquara-Jaú km 01, s/n. Campos Ville, 14800903 - Araraquara, SP - Brasil

Telefone: (16) 33016982

Fax: (16) 33016980

**Araraquara  
2017**



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 Jonas de Oliveira Vieira, realizada em 05/09/2017:

---

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani  
UNESP

---

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Correa  
USP

---

Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz  
UNIFESP

---

Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal  
UNESP

---

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin  
UNESP

Dedico esse trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, Valdomiro e  
Elisete, à minha esposa Hanna.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo dom da vida.

À minha esposa, por sempre me incentivar e oferecer motivos para seguir em frente. Tudo que passei teria sido muito mais complicado sem a presença dela. Agradeço a Deus por ter te colocado ao meu lado!

À minha família, em especial a uma guerreira. Com toda certeza, sem o apoio dela não estaria concluindo esse sonho. À você, MÃE.

À família da minha esposa, em especial aos seus pais Eduardo e Rô.

Ao professor Carlos, pelo acolhimento e por sempre estar disposto a contribuir. Obrigado pela sua paciência em todos os momentos.

Aos meus amigos de laboratório, Josiane, Willian, Jeferson, Ricardo, Leandro, Lucas G, Lucas B, Diego, Gessynger, Tatiane e Sheila. Desejo o melhor a vocês. Obrigado por me aturarem.

Elisabete Zocal Paro Lepera e Rosana Finoti Pupim Silva, foram pessoas imprescindíveis para a execução desse trabalho. Aprendi muito com vocês. Meu muito obrigado!

Manifesto aqui minha gratidão a todos os professores, funcionários e amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP – Araraquara, ao laboratório de farmacologia pela estrutura para o desenvolvimento deste trabalho, ao programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

Mais uma etapa foi vencida! Sei que ainda é só o começo...

"Eu sou a ressurreição e a vida. Quem crê em mim, ainda que morra, viverá; e quem vive e crê em mim nunca morrerá."

(Jesus Cristo)

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar as alterações fisiológicas, com ênfase na análise dos efeitos sobre a função cardiovascular, induzidas pela exposição ao estresse crônico em ratos e ratas normotensos. Além disso, investigamos uma possível vulnerabilidade de ratas espontaneamente hipertensas (do inglês, SHR), quando comparadas com ratas normotensas, para os efeitos fisiológicos e somáticos induzidos pelo estresse. Os animais foram expostos a protocolos de 10 dias de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Nós observamos que as fêmeas controle apresentaram valores basais de FC maiores do que os machos, e este efeito foi associado com uma atividade simpática cardíaca maior e atividade parassimpática cardíaca menor em relação aos machos. Além disso, tanto o ERR quanto o ECV provocaram aumento da FC nos machos, no qual foi relacionado com um aumento da atividade simpática cardíaca. No entanto, somente o ERR elevou a FC basal nas fêmeas, no qual também foi acompanhado de aumento na atividade simpática cardíaca. Tanto o ERR quanto o ECV elevaram os níveis plasmáticos de corticosterona nas fêmeas. Observamos que ambos os protocolos de estresse reduziram o ganho de peso corporal apenas nos machos. Além disso, o ECV causou hipertrofia da adrenal nos machos. Tanto o ERR quanto o ECV reduziram a resposta de bradicardia reflexa desencadeada por aumento na pressão arterial nos machos. Além disso, o ECV aumentou a resposta taquicárdica reflexa desencadeada por reduções na pressão arterial nos machos. Nenhum dos protocolos de estresse crônico influenciaram a atividade do barorreflexo nas fêmeas. Com relação a resposta vascular a agentes vasoativos, nós observamos que a resposta pressora decorrente da administração intravenosa de fenilefrina não foi alterada por nenhum dos protocolos de estresse crônico em ambos os gêneros. A resposta depressora da acetilcolina foi reduzida somente pelo ECV nos machos e aumentada pelos dois protocolos de estresse nas fêmeas. O ERR também aumentou a resposta depressora do NPS nos machos, porém nas fêmeas ambos os protocolos reduziram a resposta ao NPS. Com relação aos experimentos realizados nas ratas SHR, como esperado, nós observamos que as fêmeas SHR apresentaram valores basais de pressão arterial maior do que as fêmeas normotensas. A taquicardia de repouso induzida pelo ERR foi associado com aumento da atividade simpática cardíaca tanto nas ratas normotensas quanto nas ratas SHR. Ambos os protocolos de estresse crônico aumentaram os valores basais de corticosterona plasmática e reduziram o ganho de peso corporal tanto nas fêmeas SHR quanto nas normotensas. Além disso, o ECV e o ERR causaram hipertrofia das

glândulas adrenais nas ratas normotensas e aumentaram o peso do timo nas ratas SHR. Em suma, com relação à influência dos dimorfismos sexuais, os resultados indicam que, independente do tipo de estresse, os machos são vulneráveis para os efeitos somáticos e sobre o peso corporal, ao passo que as fêmeas parecem ser mais suscetíveis aos efeitos do estresse crônico sobre a atividade basal do eixo HPA. Além disso, os achados do presente estudo indicam que as fêmeas são seletivamente vulneráveis para os efeitos cardiovasculares de estressores homotípicos, ao passo que estressores heterotípicos e homotípicos afetam de maneira similar a função cardiovascular de animais machos. Com relação à influência da hipertensão, os achados não indicaram diferenças nas respostas cardiovasculares, somáticas e neuroendócrinas nas ratas SHR e normotensas.



## **ABSTRACT**

The aim of the present study was to investigate the physiological and somatic changes, with emphasis on the analysis of effects on cardiovascular function, induced by exposure to chronic stress in normotensive male and female rats. We also investigated the possible vulnerability of spontaneously hypertensive females rats (SHR) to physiological and somatic effects induced by stress protocols. The animals were exposed to 10 days protocols of repeated restraint stress (RRS) and chronic variable stress (CVS) protocols. We observed that control females presented basal HR values higher than males, and this effect was related to higher cardiac sympathetic activity and lower cardiac parasympathetic activity, when compared to males. In addition, both RRS and CVS caused HR increase in males, in which it was related to an increase in cardiac sympathetic activity. However, only RRS increased basal HR in females, in which it was also accompanied by an increase in cardiac sympathetic activity. Both RRS and CVS increased plasma corticosterone levels in females. We observed that both stress protocols decreased body weight gain only in males. In addition, CVS caused adrenal hypertrophy in males. Both RRS and CVS reduced the reflex bradycardia response triggered by increased blood pressure in males. In addition, CVS increased the reflex tachycardiac response triggered by decreases of blood pressure in males. Neither of the chronic stress protocols influenced baroreflex activity in females. Regarding the blood pressure response to vasoactive agents, we observed that the pressor response due to the intravenous administration of phenylephrine was not altered by neither of the chronic stress protocols in both genders. The response of acetylcholine was reduced only by CVS in males and increased by both stress protocols in females. The RRS also increased the SNP response in males, but in females both protocols decreased the response to SNP. As expected, we observed that SHR females had higher baseline blood pressure values than normotensive females. RRS caused an increase in basal heart rate in both normotensive and SHR female rats, in which it was related to an increase in cardiac sympathetic activity. Both chronic stress protocols increased baseline plasma corticosterone levels and reduced body weight gain in both SHR and normotensive females. In addition, CVS and RRS caused hypertrophy of the adrenal glands in normotensive rats and increased thymus weight in SHR rats. In summary, concerning to the influence of sexual dimorphisms, the results indicate that, regardless of the type of stress, males are vulnerable to somatic effects and on body weight, while females appear to be more susceptible to the effects of chronic stress on baseline HPA axis activity. In addition, present findings indicate that females are selectively vulnerable to cardiovascular and autonomic changes evoked by homotypic stressors, whereas homotypic and heterotypic

stressors similarly affect cardiovascular function and autonomic activity in males. Regarding an influence of hypertension, the findings did not indicate differences in cardiovascular, somatic and neuroendocrine responses induced by stress protocols in normotensive and SHR female rats.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1-** PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DO EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL E DA EXPOSIÇÃO REPETIDA AO ESTRESSE POR RESTRIÇÃO SOBRE A FUNÇÃO CARDIOVASCULAR EM RATOS E RATAS NORMOTENSOS. .... 35
- FIGURA 2-** PESO CORPORAL MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AOS PROTOCOLOS DE ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV) OU ESTRESSE DE RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR). .... 39
- FIGURA 3-** PESO RELATIVO (PESO DO ÓRGÃO/PESO CORPORAL) DO CORAÇÃO, ADRENAL E TIMO EM ANIMAIS MACHOS E FÊMEAS APÓS A EXPOSIÇÃO AOS PROTOCOLOS DE ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV) OU ESTRESSE DE RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR). .... 40
- FIGURA 4-** VALORES BASAIS DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA EM ANIMAIS MACHOS E FÊMEAS APÓS OS 10 DIAS DE EXPOSIÇÃO AOS PROTOCOLOS DE ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV) OU ESTRESSE POR RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR)..... 42
- FIGURA 5 -** VALORES BASAIS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS), PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (PAD) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) EM ANIMAIS MACHOS E FÊMEAS APÓS OS 10 DIAS DE EXPOSIÇÃO AOS PROTOCOLOS DE ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV) OU ESTRESSE POR RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR).44
- FIGURA 6 -** VARIAÇÃO DA FREQUÊNCIA CARDÍACA ( $\Delta FC$ ) INDUZIDA PELA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE PROPRANOLOL (ANTAGONISTA DE ADRENOCEPTORES  $\beta$ ) OU METILATROPINA (ANTAGONISTA DE RECEPTORES COLINÉRGICOS MUSCARÍNICOS) E FREQUÊNCIA CARDÍACA OBSERVADA APÓS A ADMINISTRAÇÃO COMBINADA DE METILATROPINA E PROPRANOLOL INTRÍNSECA (FC INTRÍNSECA) EM MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AOS PROTOCOLOS DE ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV) OU ESTRESSE DE RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR)..... 46
- FIGURA 7 -** ANÁLISE DE REGRESSÃO NÃO-LINEAR (GRÁFICOS SUPERIORES) E LINEAR (GRÁFICOS INFERIORES) DO BARORREFLEXO CORRELACIONANDO VARIAÇÕES DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA ( $\Delta PAM$ ) E A RESPOSTA REFLEXA DE FREQUÊNCIA CARDÍACA ( $\Delta FC$ ) EM MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR) OU ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV).. .... 48

- FIGURA 8** - VARIAÇÕES DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA ( $\Delta$  PAM) CAUSADA PELA INFUSÃO INTRAVENOSA DE DOSES CRESCENTES DE FENILEFRINA (FENIL, AGONISTA SELETIVO DE ADRENOCEPTORES  $\alpha_1$ ), ACETILCOLINA (ACH) E NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (NPS, DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO) ANIMAIS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR) OU AO ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV).. ..... 51
- FIGURA 9** - ANÁLISE COMPORTAMENTAL NO LABIRINTO DE CRUZ ELEVADA (LCE) (À ESQUERDA) E À DIREITA O TESTE DE CAMPO ABERTO EM RATOS MACHOS E FÊMEAS. 55
- FIGURA 10** - PESO CORPORAL DE ANIMAIS FÊMEAS NORMOTENSAS E SHR SUBMETIDOS AOS PROTOCOLOS DE ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV) OU ESTRESSE DE RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR). (A) VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL DURANTE A EXPOSIÇÃO AOS PROTOCOLOS DE ECV OU ERR. AS SESSÕES DE ESTRESSE TIVERAM INÍCIO NO DIA 1. (B) GANHO DE PESO CORPORAL (DIFERENÇA ENTRE O PESO INICIAL E NO 10o DIA)..... 59
- FIGURA 11** - PESO RELATIVO (PESO DO ÓRGÃO/PESO CORPORAL) DO CORAÇÃO, ADRENAL E TIMO EM ANIMAIS FÊMEAS NORMOTENSAS E SHR APÓS A EXPOSIÇÃO AOS PROTOCOLOS DE ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV) OU ESTRESSE DE RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR).60
- FIGURA 12** - VALORES BASAIS DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA EM ANIMAIS FÊMEAS NORMOTENSAS E SHR APÓS OS 10 DIAS DE EXPOSIÇÃO AOS PROTOCOLOS DE ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV) OU ESTRESSE POR RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR). ..... 62
- FIGURA 13-** VALORES BASAIS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS), PRESSÃO ARTERIAL DIASTÓLICA (PAD) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) EM FÊMEAS NORMOTENSAS E SHR APÓS OS 10 DIAS DE EXPOSIÇÃO AOS PROTOCOLOS DE ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV) OU ESTRESSE POR RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR).. ..... 64
- FIGURA 15** - ANÁLISE DE REGRESSÃO NÃO-LINEAR (GRÁFICOS SUPERIORES) E LINEAR (GRÁFICOS INFERIORES) DO BARORREFLEXO CORRELACIONANDO VARIAÇÕES DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA ( $\Delta$ PAM) E A RESPOSTA REFLEXA DE FREQUÊNCIA CARDÍACA ( $\Delta$ FC) EM FÊMEAS NORMOTENSAS E SHR SUBMETIDAS AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR) OU ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV). SÍMBOLOS NAS CURVAS SIGMOIDES INDICAM A PA50. CÍRCULOS REPRESENTAM A MÉDIA E AS BARRAS O ERRO PADRÃO DA MÉDIA NAS CURVAS DE REGRESSÃO LINEAR. .... 68

**FIGURA 16** - PARÂMETROS USADOS PARA A ANÁLISE DA ATIVIDADE DO BARORREFLEXO CORRELACIONANDO VARIAÇÕES DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA ( $\Delta PAM$ ) E A RESPOSTA REFLEXA DE FREQUÊNCIA CARDÍACA ( $\Delta FC$ ) EM FÊMEAS NORMOTENSAS E SHR SUBMETIDAS AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR) OU ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV). (A) VARIAÇÃO DA FC DIFERENÇA ENTRE P1 E P2; (B) PLATÔ MÁXIMO DA FC (P<sub>2</sub>); (C) PLATÔ MÍNIMO DA FC (P<sub>1</sub>); (D) GANHO, INCLINAÇÃO DA PORÇÃO LINEAR DA CURVA; (E) INCLINAÇÃO DA CURVA PROVOCADA PELO AUMENTO DA FC; (F) INCLINAÇÃO DA CURVA PROVOCADA PELA DIMINUIÇÃO DA FC..... 70

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1-</b> PROTOCOLO DE ESTRESSE VARIÁVEL .....	27
<b>TABELA 2 -</b> PESO DO CORAÇÃO, DA ADRENAL E DO TIMO EM ANIMAIS MACHOS E FÊMEAS APÓS OS 10 DIAS DOS PROTOCOLOS DE ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV) OU EXPOSIÇÃO REPETIDA AO ESTRESSE POR RESTRIÇÃO (ERR).....	41
<b>TABELA 3 -</b> PARÂMETROS DERIVADOS DA ANÁLISE DE REGRESSÃO NÃO-LINEAR (GANHO, P1, P2, VARIAÇÃO DA FC E PA50) E LINEAR (GANHO BRADICARDIA E GANHO TAQUICARDIA) DO BARORREFLEXO EM ANIMAIS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE 10 DIAS DE ESTRESSE POR RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR) OU ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV). .....	49
<b>TABELA 4 –</b> RESPOSTA MÁXIMA DA PAM (EMAX) E DOSE QUE PROMOVE 50% DA RESPOSTA MÁXIMA (ED50) DAS CURVAS DOSE-RESPOSTA PARA FENILEFRINA (FENIL), ACETILCOLINA (ACH) E NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (NPS) EM RATOS MACHOS E FÊMEAS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ESTRESSE POR RESTRIÇÃO REPETIDA (ERR) E ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV) POR 10 DIAS CONSECUTIVOS. ....	52
<b>TABELA 5 -</b> PESO DO CORAÇÃO, DA ADRENAL E DO TIMO EM ANIMAIS FÊMEAS NORMOTENSAS E SHR APÓS OS 10 DIAS DOS PROTOCOLOS DE ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV) OU EXPOSIÇÃO REPETIDA AO ESTRESSE POR RESTRIÇÃO (ERR).....	61
<b>TABELA 6 -</b> PARÂMETROS DERIVADOS DA ANÁLISE DE REGRESSÃO NÃO-LINEAR (GANHO, P1, P2, VARIAÇÃO DA FC E PA50) E LINEAR (GANHO BRADICARDIA E GANHO TAQUICARDIA) DO BARORREFLEXO EM FÊMEAS NORMOTENSAS E SHR SUBMETIDAS AO PROTOCOLO DE 10 DIAS DE ESTRESSE POR RESTRIÇÃO REPETIDO (ERR) OU ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV). ....	69
<b>TABELA 7 -</b> RESUMO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO ERR OU AO ECV EM MACHOS E FÊMEAS NORMOTENSOS E EM FÊMEAS SHR. ....	72

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 Estresse crônico e função cardiovascular .....	16
1.2 Estresse crônico e função cardiovascular: influência do tipo de estresse.....	19
1.3 Estresse crônico e função cardiovascular: influência de dimorfismos sexuais .....	20
1.4 Estresse crônico e função cardiovascular: influência da hipertensão.....	22
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 Animais.....	25
3.2. Protocolos de estresse crônico .....	25
3.2.1. Estresse por restrição repetido .....	26
3.2.2. Estresse crônico variável .....	26
3.3. Labirinto em cruz elevado .....	27
3.4. Campo aberto.....	28
3.5. Canulação da artéria e veia femorais .....	29
3.6. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	29
3.7. Infusão intravenosa de agentes vasoativos .....	29
3.8. Avaliação da atividade barorreflexa .....	30
3.9. Análise das variações de pressão arterial induzidas por agentes vasoativos.....	30
3.10. Avaliação da atividade autonômica cardíaca e da frequência cardíaca intrínseca	31
3.11. Medida de corticosterona plasmática .....	32
3.12. Soluções e drogas .....	33
3.13. Análise estatística .....	33
<b>4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</b> .....	34
Experimento 1: Efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular.....	34

Experimento 2: Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de ratos e ratas normotensas .....	35
Experimento 3: Efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular de ratas normotensas e espontaneamente hipertensas (SHR) .....	36
<b>5. RESULTADOS</b> .....	37
5.1. Experimento 1: Efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular de ratos e ratas normotensos.....	37
5.1.1. Efeito do estresse crônico sobre os parâmetros somáticos e níveis basais de corticosterona plasmática em animais machos e fêmeas.....	37
5.1.2. Efeito do estresse crônico sobre os parâmetros basais de corticosterona plasmática em animais machos e fêmeas .....	42
5.1.3. Efeito do estresse crônico sobre os parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca em animais machos e fêmeas .....	43
5.1.4. Efeito do estresse crônico sobre a atividade simpática e parassimpática cardíaca e a frequência cardíaca intrínseca em animais machos e fêmeas.....	45
5.1.5. Efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo em ratos e ratas .....	47
5.1.6. Efeito do estresse crônico sobre a resposta de pressão arterial a agentes vasoativos em ratos e ratas. ....	50
5.2. Experimento 2: Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de ratos e ratas.....	53
5.3. Experimento 3: Efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular de ratas normotensas e espontaneamente hipertensas (SHR) .....	56
5.3.1. Efeito do estresse crônico sobre os valores de peso corporal, do coração, das adrenais e do timo em ratas normotensas e ratas SHR. ....	56
5.3.2. Efeito do estresse crônico sobre os parâmetros basais de corticosterona plasmática em animais fêmeas normotensas e SHR.....	62
5.3.3. Efeito do estresse crônico sobre os parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca em fêmeas normotensas e SHR.....	63
5.3.4. Efeito do estresse crônico sobre a atividade simpática e parassimpática cardíaca e a frequência cardíaca intrínseca em fêmeas normotensas e fêmeas SHR .....	65



5.3.5. Efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo em fêmeas normotensas e fêmeas SHR .....	67
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
6.1. Influência do tipo de estresse.....	75
6.2. Influência de dimorfismos sexuais .....	77
6.3. Influência da hipertensão.....	80
6.4. Mecanismo das alterações cardiovasculares provocadas pelo estresse: barorreflexo e resposta vascular a agentes vasoativos .....	84
6.4.1 Alterações na atividade do barorreflexo.....	84
6.4.2 Reatividade vascular a agentes vasoativos .....	87
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>93</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>94</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Estresse crônico e função cardiovascular**

É importante pontuarmos logo no início a definição de estresse no âmbito biológico. Estresse pode ser considerado uma ameaça, real ou implícita, à homeostase; é um evento ou série de eventos que são ameaçadores para o indivíduo que provocam respostas fisiológicas e comportamentais (MCEWEN, 2003). Especula-se que exista uma grande diferença entre o avanço e modernização tecnológica comparada com a lenta evolução dos seres humanos. Dessa maneira, é possível afirmar que o sistema fisiológico humano, na maioria das vezes, não tem acompanhado o avanço da sociedade e suas inerentes mudanças, de modo que a exaustão de nossos mecanismos de resposta ao estresse pode ser um fator decisivo no desenvolvimento de patologias (LIMA et al, 2010). Nesse sentido, evidências da literatura sustentam a relação entre estresse e diversas doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão (TRICHOPOULOS et al, 1981 ; KNOX e UVNÄS- MOBERG, 1998; ROZANSKI et al, 1999). Por exemplo, fatores como o estresse mental e a interação adversa entre o indivíduo e seu meio ambiente influenciam diretamente a etiologia e o desenvolvimento da hipertensão arterial. Entretanto, é sabido que o estresse é um evento difícil de ser definido e medido (PICKERING T.G et al, 2001), e o papel do estresse na elevação mantida da pressão arterial permanece ainda pouco compreendido.

Evidências em estudos epidemiológicos e experimentais indicam que tanto as características psicológicas quanto o estresse crônico podem contribuir para o desenvolvimento da hipertensão. Neste sentido, evidências correlacionam a exposição prolongada a eventos aversivos com a patogênese de problemas cardiovasculares (KNOX; UVNÄS-MOBERG, 1998; ROZANSKI et al, 1999).

Estudos pré-clínicos providenciaram suporte para a hipótese de que as alterações cardiovasculares desencadeadas pelo estresse estão associadas a disfunções autonômicas e comprometimento na função vascular (CORDELLINI e VASSILIEFF, 1998; GRIPPO et al,

2002, 2008; ISINGRINI et al, 2011). A avaliação do balanço autonômico cardíaco e da atividade do barorreflexo são medidas importantes empregadas na literatura para o estudo da função autonômica (NEGRÃO et al, 1992; GRIPPO et al, 2008; SANCHEZ et al, 2009; FLUES et al, 2010; CRESTANI et al, 2011). O barorreflexo é um mecanismo neural de controle momento a momento da pressão arterial (DAMPNEY, 1994). Os barorreceptores estão localizados principalmente no seio carotídeo e no arco da aorta, detectando variações da pressão arterial e transmitindo estas informações ao sistema nervoso central, nas quais levam a respostas autonômicas reflexas (SVED; GORDON, 1994). Além do controle reflexo da atividade autonômica, os barorreceptores também exercem um importante controle tônico da atividade simpática e parassimpática (DAMPNEY et al, 1994; SVED; GORDON, 1994).

Diversos estudos demonstram que redução na atividade deste mecanismo reflexo é comum em indivíduos com hipertensão essencial, e também em diversos modelos experimentais de hipertensão (BRISTOW et al, 1969; IRIGOYEN e KRIEGER, 1998). Além disso, diminuição na atividade do barorreflexo tem sido apontado como fator de risco para desenvolvimento de arritmias e morte súbita em diversas patologias cardiovasculares (FARRELL et al, 1991; TAKASE et al, 1992). Com relação ao estresse, foi demonstrado que ratos submetidos a protocolos de estresse crônico apresentaram comprometimento na atividade do barorreflexo (GRIPPO et al, 2008; DUARTE et al, 2015; CRUZ et al, 2016; CRESTANI et al, 2016), o que sugere que alterações na atividade desse mecanismo reflexo cardiovascular podem estar implicadas nas alterações cardiovasculares desencadeadas pela exposição prolongada a estímulos aversivos.

Alterações no balanço autonômico cardíaco (redução na atividade parassimpática e/ou aumento atividade simpática) também tem sido apontado como um fator de risco para o surgimento de patologias cardiovasculares como insuficiência cardíaca, isquemia do miocárdio e hipertensão (DYER et al, 1980; CARNEY et al, 1993; PALATINI e Julius, 1997; PALATINI et al, 1997; CARNEVALI; SGOIFO, 2014). Foi relatado que ratos expostos a

protocolos de estresse crônico apresentam alterações no balanço autonômico cardíaco em direção a uma predominância simpática, bem como aumento na atividade nervosa simpática (GRIPPO, 2009; GRIPPO; JOHNSON, 2009; SGOIFO et al, 2014; CARNEVALI e SGOIFO, 2014; CRESTANI, 2016). Deste modo, alterações autonômicas cardíacas parecem também estar associadas às complicações cardiovasculares do estresse.

Comprometimento na resposta vascular a agentes vasodilatadores e vasoconstritores é um indicador e um marcador de aterosclerose e de alterações na capacidade de contração e relaxamento da musculatura lisa vascular (HARRISON et al, 1987; RESSTEL et al, 2006; CRESTANI et al, 2011). Além disso, a alteração na reatividade vascular tem sido proposta como um dos mecanismos fisiopatológicos da hipertensão (CONWAY, 1958; CRESTANI et al 2011; GHIADONI et al, 2012). Estudos *in vitro* demonstraram que o estresse crônico variável (ECV) (estressor crônico heterotípico: relacionado com a exposição diária a diferentes estressores) reduziu a resposta de relaxamento vascular de agonistas colinérgicos em segmentos de aorta de camundongos, sem alterar a resposta contrátil da fenilefrina (agonista seletivo de adrenocetores  $\alpha_1$ ) (D'AUDIFFRET et al, 2010; ISINGRINI et al, 2011). Por outro lado, a exposição repetida ao mesmo estressor reduziu a resposta contrátil da noradrenalina e aumentou a resposta vasodilatadora da acetilcolina em anéis de aorta isoladas de ratos (CORDELLINI e VASSILIEFF, 1998). Apesar dos dados acima fornecerem evidências da reatividade vascular *in vitro*, não existem dados *in vivo* acerca do efeito do estresse crônico sobre a reatividade vascular. A reatividade vascular pode ser testada experimentalmente *in vivo* através do estudo das alterações na pressão arterial decorrente da infusão intravenosa de agentes vasoconstritores e vasodilatadores (RESSTEL et al, 2006; CRESTANI et al, 2011; ENGI et al, 2012).

Os dados apresentados acima claramente mostram uma relação entre estresse e comprometimento na função cardiovascular. Entretanto, a influência de fatores como o tipo

de estresse, dimorfismos sexuais e hipertensão arterial nas complicações cardiovasculares associados ao estresse ainda são pouco compreendidos.

## **1.2 Estresse crônico e função cardiovascular: influência do tipo de estresse**

Tem sido demonstrado que as respostas fisiológicas associadas ao estresse dependem das características do estímulo aversivo empregado (por exemplo: tipo, duração, frequência e intensidade) (NATELSON et al, 1988; MAGARINOS e MCEWEN, 1995; AGUILERA, 1998; JANKORD e HERMAN, 2008; CRESTANI, 2016). Alguns trabalhos mostram que as respostas fisiológicas adaptativas frente a situações aversivas agudas visam a manutenção da homeostase e a manter a própria subsistência (STERLING, 2012; STERLING e EYER, 1988). Entretanto, ativações crônicas dessas respostas podem resultar no desenvolvimento de doenças, e até mesmo gerar respostas inadequadas que podem levar a exaustão de mecanismos fisiológicos (MCEWEN; STELLAR,1993; MCEWEN,1998). Em animais, com o intuito de avaliar a capacidade de adaptação e a influência da previsibilidade, estudos tem comparado os efeitos fisiológicos e comportamentais de protocolos de estresse crônico emocional que envolvem a exposição diária ao mesmo tipo de estressor (estresse crônico repetido ou previsível) ou a diferente estressores (estresse crônico variável ou imprevisível) (CHEN e HERBERT, 1994; MAGARINOS e MCEWEN, 1995; GRIPPO et al, 2002; ULRICH-LAI e HERMAN, 2009). Nesse sentido, estudos demonstraram que alterações no ganho de peso corporal, na atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e na atividade comportamental em ratos foram mais pronunciadas acompanhando a exposição a protocolos de ECV, quando comparadas com aquelas evocadas por estressores homotípicos (i.e., exposição repetida ao mesmo estressor) (ORTIZ et al, 1996; MARIN et al, 2007; CRUZ et al, 2012). Contudo, em uma ampla busca na literatura, nós não encontramos nenhum estudo que tenha comparado, de maneira direta, os efeitos de diferentes protocolos de estresse crônico sobre a função cardiovascular. Entretanto, estudos isolados demonstraram que

animais submetidos a protocolos de estresse crônico variável apresentaram hipertensão moderada (GRIPPO et al, 2002, 2003, 2008), ao passo que a exposição repetida ao mesmo estressor parece não alterar os parâmetros cardiovasculares basais (CHEN e HERBERT, 1994; MCDOUGALL et al, 2000).

Os resultados apresentados acima suportam a hipótese de que os efeitos sobre a função cardiovascular podem estar relacionados com o paradigma de estresse crônico empregado. Diante disso, uma das hipóteses testadas no presente estudo foi a de que o ECV e a exposição repetida ao estresse por restrição influenciam de maneira diferente a função cardiovascular.

### **1.3 Estresse crônico e função cardiovascular: influência de dimorfismos sexuais**

Além do paradigma de estresse empregado, outro aspecto importante é a possível influência de dimorfismos sexuais nas patologias cardiovasculares associadas ao estresse. Diferenças entre gêneros aparecem na função cardiovascular durante a adolescência e persistem por toda a fase adulta (DUBEY et al, 2002). Dados epidemiológicos têm demonstrado que até a meia idade a pressão arterial e a prevalência de patologias cardiovasculares em homens é maior comparada com aquela observada em mulheres (BURT et al, 1995; AUGUST; OPARIL, 1999). Apesar de alguns estudos indicarem que níveis elevados de androgênios em indivíduos do sexo masculino possam contribuir para as diferenças de gênero na função cardiovascular (RECKELHOFF, 2001), numerosas evidências têm sugerido que os hormônios ovarianos, em especial o estrogênio, são responsáveis por um efeito protetor na função cardiovascular em mulheres (DUBEY et al, 2002; KNOWLTON). Neste sentido, dados epidemiológicos têm demonstrado que após o início da menopausa a incidência de hipertensão aumenta nas mulheres (STAESSEN et al, 1989, 1997), e as diferenças entre homens e mulheres desaparecem (DUBEY et al, 2002). Foi também observado que durante o ciclo menstrual a pressão arterial é menor durante a fase lútea (níveis elevados de estrogênio) do que durante a fase folicular (CHAPMAN et al, 1997). Apesar de

controverso (GIMENEZ et al, 2006; DIAS et al, 2010), vários estudos em roedores têm demonstrado que a privação de hormônios sexuais pela ovariectomia desencadeia aumento nos valores de pressão arterial (DANTAS et al, 1999; HERNÁNDEZ et al, 2000; CLARK et al, 2004; FLUES et al, 2010), e este efeito é revertido pela terapia com estrogênio (DANTAS et al, 1999; HERNÁNDEZ et al, 2000). Apesar dos mecanismos envolvidos com o efeito protetor dos hormônios ovarianos sobre a função cardiovascular não estarem totalmente elucidados, tem sido proposto que uma influência direta destes hormônios no controle do tônus vascular, da atividade do barorreflexo e do balanço autonômico cardíaco podem ser mecanismos importantes (DUBEY et al, 2002; MATURANA et al, 2007; DIAS DA SILVA et al, 2009; FLUES et al, 2010; KNOWLTON & Lee, 2012). Além disso, efeitos indiretos, como redução na prevalência de fatores de risco cardiovascular, também parecem contribuir (KNOWLTON e LEE, 2012).

Apesar de mulheres terem um efeito protetor sobre a função cardiovascular, a incidência de algumas patologias associadas ao estresse, como a depressão, é maior em indivíduos do sexo feminino (KESSLER et al, 1994; WEISSMAN et al, 1996). Apesar dos resultados clínicos serem controversos (KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2005), estudos em animais tem demonstrado que fêmeas tem valores basais dos hormônios adrenocorticotrofina (ACTH) e glicocorticóide maiores do que machos, e a ativação do eixo HPA durante situações de estresse emocional é maior em fêmeas (HANDA et al, 1994; MITSUSHIMA et al 2003; KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2005). Além disso, estudos em roedores também demonstraram diferenças de gênero nas consequências neuroquímicas desencadeadas por protocolos de estresse crônico (BOWMAN et al, 2003; TER HORST et al, 2009), nas quais podem explicar a vulnerabilidade de mulheres às patologias associadas ao estresse. Apesar das evidências acima, em uma ampla busca na literatura nós não encontramos evidências das consequências da exposição repetida ao estresse sobre a função cardiovascular em fêmeas. Os estudos publicados na literatura sobre estresse e função cardiovascular limitaram-se a

investigar as alterações cardiovasculares agudas observadas durante a exposição a situações aversivas. Neste sentido, foi demonstrado que a ativação simpática e as alterações cardiovasculares durante situações aversivas agudas são mais pronunciadas em fêmeas (WEINSTOCK et al, 1998; EIKELIS; VAN DEN BUUSE, 2000; ANISHCHENKO et al, 2007), e estas respostas são ainda maiores após a privação de hormônios ovarianos (OWENS et al, 1993; MORIMOTO et al, 2004).

Estes dados favorecem a hipótese de que fêmeas são mais vulneráveis às complicações cardiovasculares induzidas pelo estresse. Diante disso, uma segunda hipótese testada no presente estudo foi a de que ratas, quando comparadas com ratos, são mais vulneráveis aos efeitos do estresse crônico variável e do estresse por restrição repetido sobre a atividade cardiovascular.

#### **1.4 Estresse crônico e função cardiovascular: influência da hipertensão.**

Estudos tem demonstrado que indivíduos hipertensos e normotensos reagem de maneira diferente a eventos estressantes. Neste sentido, pacientes hipertensos, com ou sem tratamento, parecem reagir mais intensamente ao estresse do que seus pares normotensos (LIMA JR E et al, 2010). O tipo de desafio parece ser importante, uma vez que hipertensos parecem particularmente sensíveis às condições extenuantes e às atividades de enfrentamento com o meio ambiente (LIMA JR E et al, 2010).

Estudos pré-clínicos também têm demonstrado diferenças entre ratos normotensos e hipertensos nas repostas fisiológicas e comportamentais ao estresse. Foi demonstrado que ratos espontaneamente hipertensos (do inglês, SHR), um modelo de hipertensão amplamente utilizado devido suas similaridades com a hipertensão essencial (primária) em humanos (TRIPPODO NC e FROHLICH ED et al, 1981), apresentam respostas cardiovasculares, neuroendócrinas e comportamentais exacerbadas a vários estímulos aversivos, quando comparados com seus pares normotensos (MCCARTY, 1983; MCDUGALL et al, 2000,



2005; VAN DEN BUUSE et al, 2001; ROMAN et al, 2004). Com relação às respostas cardiovasculares, tem sido observado que a ativação simpática e a elevação da pressão arterial e frequência cardíaca desencadeadas por diversos estímulos aversivos são mais pronunciadas em animais SHR (MCCARTY, 1983; CASTRO e PRINTZ, 1990; VAN DEN BUUSE et al, 2001; MCDUGALL et al, 2005). Foi também relatado uma habituação das respostas pressora e taquicárdica após exposição repetida ao mesmo estressor nos animais SHR, mas não nos normotensos, de modo que as respostas dos SHR passaram a ser similares àqueles observados nos animais normotensos (MCDUGALL, 2000, 2005). No entanto, nenhum estudo investigou o efeito da exposição a protocolos de ECV sobre a função cardiovascular em animais SHR. Além disso, todos os estudos anteriores foram realizados em ratos, não havendo evidências em ratas.

Deste modo, os dados apresentados suportam a hipótese de que animais SHR possuem uma capacidade reduzida em lidar com o estresse, podendo assim serem mais vulneráveis às consequências da exposição repetida a estímulos aversivos. Assim, uma última hipótese testada no presente estudo foi a de que ratas SHR, quando comparadas com seus pares normotensas, são mais vulneráveis aos efeitos do estresse crônico variável e do estresse por restrição repetido sobre a atividade cardiovascular.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral desse estudo foi comparar as consequências de um protocolo de estresse crônico imprevisível (ECV) e um protocolo de estresse crônico previsível (estresse de restrição repetido - ERR) sobre a função cardiovascular em ratas. Para tanto, os objetivos específicos foram:

1) Investigar uma vulnerabilidade de ratas normotensas, quando comparadas com ratos normotensos, às consequências do ECV e do ERR sobre os valores basais de pressão arterial, frequência cardíaca e corticosterona plasmática; a atividade cardíaca do barorreflexo; a

reatividade vascular; a atividade simpática e parassimpática cardíaca; e o peso do coração, rins, adrenais e timo; os efeitos dos protocolos de estresse crônico sobre comportamentos relacionados à ansiedade.

2) Investigar a possível vulnerabilidade de ratas SHR, quando comparadas com ratas normotensas, às consequências do ECV e do ERR sobre os valores basais de pressão arterial, frequência cardíaca e corticosterona plasmática; a atividade cardíaca do barorreflexo; a reatividade vascular; a atividade simpática e parassimpática cardíaca; e o peso do coração, rins, adrenais e timo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos e ratas Wistar normotensos e ratas SHR, todos com 60 dias. Os animais normotensos foram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Botucatu/SP) e as ratas SHR foram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram transferidos para o Biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP) no mínimo sete dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em 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 (protocolo: 02/2012).

#### **3.2. Protocolos de estresse crônico**

No presente estudo, grupos independentes de animais foram submetidos a dois protocolos de estresse crônico: o estresse por restrição repetido (ERR) e o estresse crônico variável (ECV). Ambos os protocolos tiveram início simultâneo. Os animais controle não foram manipulados, exceto no período de limpeza das caixas, sendo mantidos no biotério do laboratório de farmacologia da FCFAR/UNESP pelo mesmo período que os animais submetidos aos protocolos de estresse crônico. Todas as sessões de estresse foram realizadas em uma sala separada do biotério. Os animais foram acomodados em caixas coletivas, sendo 4 animais por caixa.

### 3.2.1. Estresse por restrição repetido

O estresse por restrição consistiu na introdução dos animais em tubos cilíndricos plásticos (diâmetro=6,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preenchem aproximadamente 20% do tubo para os animais adultos e diâmetro=4,5 cm, comprimento=15 cm, ventilados por buracos de ½ polegada que preenchem aproximadamente 20% do tubo para os animais fêmeas) (BARRON e VAN LOON, 1989; MCDUGALL et al, 2005; CRESTANI et al, 2009, 2010<sup>a</sup>, CRUZ et al, 2012). Cada animal foi submetido a sessões diárias de restrição com duração de uma hora por 10 dias consecutivos (MARIN et al, 2007; CRUZ et al, 2012; DUARTE et al, 2015). Em todas as sessões o estresse foi iniciado às 9:00 horas.

### 3.2.2. Estresse crônico variável

O ECV, modificado de Marin e colaboradores (2007), foi realizado mediante a exposição diária a diferentes estressores, alternando os estressores, durante 10 dias consecutivos. A Tabela 1 apresenta o protocolo *completo do estresse crônico variável*.

**Tabela 1-** Protocolo de estresse variável

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

### 3.3. Labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado para avaliação dos efeitos dos protocolos de estresse crônico sobre comportamentos relacionados à ansiedade (PELLOW & FILE, 1986). O aparato utilizado para o teste consiste em dois braços abertos e dois braços fechados, de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura cada um, unidos perpendicularmente e elevados 50 cm do solo. Os braços fechados possuem paredes de madeira de 40 cm de altura que os circundam, e os braços abertos possuem borda lateral de acrílico de 1 cm para evitar a queda dos animais. Os roedores evitam os braços abertos, e fármacos ansiolíticos normalmente aumentam a exploração dos braços abertos, sem interferir com o número de entradas nos braços fechados (PELLOW & FILE, 1986). No intervalo entre os testes de cada

animal o labirinto foi limpo com uma solução de álcool (70%). O comportamento foi gravado por uma câmera de vídeo (HNS-15B-Sony) por um período de 5 minutos. Os filmes foram analisados utilizando o programa de análise comportamental Any-maze® (Stoelting, EUA), sendo registrado o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados.

### **3.4. Campo aberto**

O teste de campo aberto (CA) foi utilizado para avaliação de comportamentos exploratórios e relacionados à ansiedade (GRIPPO et al., 2014; PRUT E BELZUNG, 2003). O CA consistiu em uma câmara de polímero sintético de 54 cm (largura) × 54 cm (comprimento) × 30 cm (altura). Uma área central no meio da câmara medindo 24 cm (largura) × 24 cm (comprimento) foi definida como campo exposto, e é referida como "centro". Os animais foram colocados individualmente no centro da caixa e foram permitidos explorar livremente o CA por 5 min.

Assim como o LCE, o CA explora a aversão natural dos roedores a espaços abertos. De fato, os roedores evitam naturalmente o centro do aparato, e compostos ansiolíticos geralmente aumentam a exploração na área central (PRUT E BELZUNG, 2003). Portanto, a análise dos comportamentos relacionados à ansiedade incluiu medidas da distância percorrida (locomoção central) e do tempo gasto no centro (tempo central). A distância total percorrida (isto é, centro + periferia) (locomoção total) foi utilizada como índice de atividade geral. Todas as sessões foram filmadas e a análise foi realizada usando o software Any-maze® (Stoelting, EUA).

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

Vinte e quatro horas antes do experimento, todos os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg, i.p.) e foi realizada cirurgia para implantação de um cateter na artéria femoral para registro dos parâmetros cardiovasculares, e outro na veia femoral para infusão de fármacos. Após implantação dos cateteres, estes foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica. Os animais foram mantidos em caixas individuais após a cirurgia. Como medida profilática, após a cirurgia os animais receberam 80.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil) aplicados em 0,2 mL (i.m.) e 2,5 mg/kg (s.c.) do anti-inflamatório não-esteroidal flunexina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brazil).

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

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

### **3.7. Infusão intravenosa de agentes vasoativos**

Infusão intravenosa de fenilefrina (70µg/mL a 0.4 mL/min/kg) (agonista seletivo dos adrenoceptores  $\alpha_1$ ), de nitroprussiato de sódio (NPS) (100µg/mL a 0.8 mL/min) (doador de óxido nítrico) e de acetilcolina (10 µg/mL a 1.2 mL/min) foi realizado utilizando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, EUA) (CRESTANI et al, 2006). Fenilefrina causa aumento na pressão arterial, e NPS e acetilcolina causam efeito depressor.

### **3.8. Avaliação da atividade barorreflexa**

A atividade do barorreflexo foi avaliada através de alterações na pressão arterial induzidas pela infusão intravenosa de fenilefrina ou de NPS (CRESTANI et al, 2006; ENGI et al, 2012). Fenilefrina e NPS causam aumento e redução na pressão arterial, respectivamente.

A análise foi feita relacionando a variação da PAM (10, 20, 30 e 40 mmHg) com a variação reflexa correspondente da FC. Utilizando os pontos obtidos da correlação na variação da pressão arterial e FC durante as infusões de fenilefrina e NPS, foram traçadas curvas sigmóides, como descritas na literatura (KORNER et al, 1972; HEAD; MCCARTY, 1987; CRESTANI et al, 2010b). A avaliação da curva sigmóide foi feita com base em cinco parâmetros: 1- platô mínimo da frequência cardíaca ( $P_1$ , bpm); 2- platô máximo da frequência cardíaca ( $P_2$ , bpm); 3- variação da FC ( $\Delta P$ , bpm, diferença entre  $P_1$  e  $P_2$ ); 4- pressão arterial média ( $PA_{50}$ , mmHg, valor de PAM que promove 50% de variação na FC) e 5- Ganho (G, bpm/ mmHg, inclinação da porção linear da curva) (HEAD; MCCARTY, 1987; CRESTANI et al, 2010b). Além disso, partindo dos mesmos pontos obtidos da correlação dos valores de pressão arterial e FC correspondente, foram traçadas curvas de regressão linear para análise individual da atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor na pressão arterial (CRESTANI et al, 2006, 2010b).

### **3.9. Análise das variações de pressão arterial induzidas por agentes vasoativos**

As alterações na PAM causadas pelas concentrações crescentes de fenilefrina, NPS e acetilcolina produzida pela infusão intravenosa destes agentes foram utilizadas para gerar curvas dose-resposta (RESSTEL et al, 2006; CRESTANI et al, 2011; ENGI et al, 2012). As curvas dose-resposta foram geradas para cada agente vasoativo usando valores de PAM correspondente ao tempo de registro cumulativo após o início da infusão (a cada 2 s para



fenilefrina e NPS e a cada 1s para acetilcolina). Curvas de regressão não-linear foram utilizadas para análise das variações da PAM. A avaliação das curvas foi realizada com base em dois parâmetros: 1- resposta máxima da pressão arterial ( $E_{max}$ ); 2-  $ED_{50}$ , dose que promove 50% da resposta máxima (RESSTEL et al, 2006; CRESTANI et al, 2011; ENGI et al, 2012).

### **3.10. Avaliação da atividade autonômica cardíaca e da frequência cardíaca intrínseca**

A atividade parassimpática e simpática cardíaca, bem como a FC intrínseca, foram avaliadas através da análise do efeito sobre a FC da administração intravenosa de metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) (3 mg/ml/kg) e propranolol (antagonista de adrenoceptores  $\beta$ ) (4 mg/ml/kg) (NEGRÃO et al, 1992; SOUZA et al, 2001; SANCHES et al, 2009). O protocolo foi realizado em dois dias, conforme descrito previamente (NEGRÃO et al, 1992; GRIPPO et al, 2002). No dia 1, metade dos animais em cada grupo experimental recebeu propranolol; e 15 minutos após metilatropina. A outra metade dos animais recebeu o mesmo tratamento em ordem invertida (metilatropina depois propranolol). Vinte quatro horas após (dia 2), os animais receberam novamente o tratamento combinado com os bloqueadores autonômicos cardíacos, mas na ordem oposta ao tratamento recebido no dia 1.

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

### 3.11. Medida de corticosterona plasmática

A análise das concentrações plasmáticas de corticosterona foi realizada utilizando a técnica de radioimunoensaio, de acordo com protocolo descrito em Cruz e colaboradores (2005). Brevemente, o sangue (200 $\mu$ L) foi colhido, (às 9h da manhã), a partir da cânula implantada na artéria femoral e armazenado em tubos plásticos com 5 $\mu$ L de heparina. As amostras foram centrifugadas a 2.000 x g durante 15 min a 4°C, e o plasma foi separado para dosagem de corticosterona. O anticorpo para corticosterona liofilizado (Sigma®) foi ressuspenso em 5mL de Tampão Tris pH 8,0 (0,05M Tris-HCl; 0,1M NaCl; 0,1% de Azida Sódica) e separado em alíquotas (solução estoque) e conservado a -20° C. Durante a realização do ensaio, a solução estoque foi diluída em tampão Tris na proporção de 1:2. Alíquotas de 200 ml de plasma foram adicionadas em 980 ml de tampão fosfato e incubadas em banho de água a 70°C durante 1 hora para deslocamento da corticosterona ligada à globulina plasmática. Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, e alíquotas de 100 ml foram transferidas para tubos ependorff contendo 100 ml da solução 1:2 do anticorpo para corticosterona e 3H-corticosterona a 40° C. Após a incubação, a 3H-corticosterona não ligada foi removida adicionando-se 500 ml de solução de carvão ativado seguido de centrifugação a 10 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a radioatividade no sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro de cintilação líquida.

### 3.12. Soluções e drogas

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

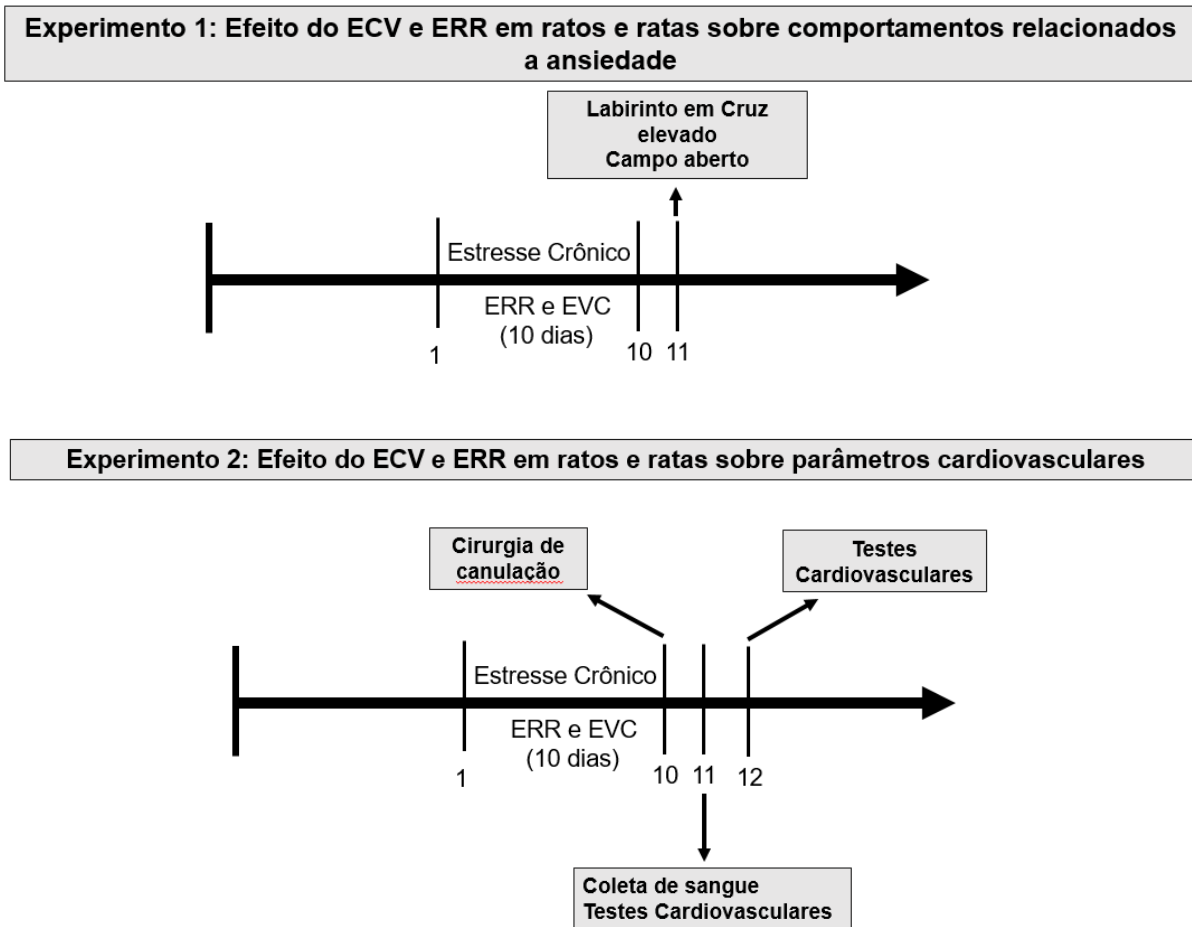
### 3.13. Análise estatística

Os dados foram expressos com média  $\pm$  EPM. As medidas de peso corporal foram analisadas usando ANOVA trifatorial, considerando os fatores tempo, gênero e estresse (experimento 1); ou fatores tempo, linhagem e estresse (experimento 2). Os demais parâmetros foram analisados usando a ANOVA bifatorial, considerando os fatores estresse (controle, ERR e ECV) e gênero (machos e fêmeas) (experimento1), estresse (controle, ERR e ECV) e linhagem (SHR e normotensas) (experimento 2) como fatores independentes. Para todas as análises, foi utilizado o pós-teste de Bonferroni para identificação de diferenças específicas entre os grupos experimentais. Os resultados do teste estatístico com  $P < 0.05$  foram considerados significantes. Todos os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 5.

#### **4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

##### **Experimento 1: Efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular em ratos e ratas normotensos.**

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



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

### **Experimento 2: Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de ratos e ratas normotensas**

Animais machos e fêmeas foram divididos aleatoriamente em três grupos:

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

Os animais dos grupos ERR e ECV foram submetidos a sessões diárias de estresse por 10 dias consecutivos, enquanto os animais do grupo controle permaneceram em repouso no biotério. Vinte quatro horas após a última sessão de estresse, os animais em todos os

grupos experimentais foram testados no labirinto em cruz elevado (LCE), e quatro horas depois foram avaliados os comportamentos no campo aberto (CA).

### **Experimento 3: Efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular de ratas normotensas e espontaneamente hipertensas (SHR)**

Ratas normotensas e ratas SHR foram divididas em três grupos experimentais:

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

O protocolo experimental foi realizado como descrito no *Experimento 1* (ver Figuras 1). Desse modo, tanto as fêmeas normotensas quanto SHR foram expostas aos protocolos de 10 dias de estresse crônico. No último dia dos protocolos de estresse crônico, após a última sessão de estresse, a artéria e veia femorais foram canuladas, e os testes cardiovasculares foram realizados 24 e 48h após a última sessão de estresse.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Experimento 1: Efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular de ratos e ratas normotensos

#### 5.1.1. Efeito do estresse crônico sobre os parâmetros somáticos e níveis basais de corticosterona plasmática em animais machos e fêmeas

**Peso Corporal** - A análise da variação do peso corporal durante a exposição aos protocolos de estresse crônico indicou que as fêmeas em todos os grupos experimentais apresentaram peso corporal menor em relação aos respectivos grupos machos nos dias 5 (controle:  $P < 0.05$ , ERR:  $P < 0.05$ , ECV:  $P < 0.05$ ) e 10 (controle:  $P < 0.05$ , ERR:  $P < 0.05$ , ECV:  $P < 0.05$ ). Além disso, o ERR ( $P < 0.05$ ) e o ECV ( $P < 0.05$ ) reduziram o ganho de peso corporal nos machos nos dias 5 e 10 (Figura 2). Entretanto, nenhum dos protocolos de estresse crônico afetaram o peso corporal das fêmeas (ECV:  $P > 0.05$ , ERR:  $P > 0.05$ ) (Figura 2). A análise ANOVA trifatorial indicou efeito significativo do gênero ( $F_{(1,33)}=38$ ,  $P < 0.0001$ ) e do tempo ( $F_{(2,66)}=72$ ,  $P < 0.0001$ ), porém sem efeito do estresse ( $F_{(2,33)}=2$ ,  $P > 0.05$ ). Também foi identificada interação entre os fatores gênero e tempo ( $F_{(2,66)}=18$ ,  $P < 0.0001$ ) e estresse e tempo ( $F_{(4,66)}=5$ ,  $P < 0.004$ ), porém não entre os fatores gênero e estresse ( $F_{(2,33)}=1$ ,  $P > 0.05$ ).

A análise do ganho de peso corporal no período (diferença entre o peso corporal inicial e no 10º dia) indicou que o ERR ( $P < 0.05$ ) e o ECV ( $P < 0.01$ ) reduziram o ganho de peso corporal nos machos (Figura 2). Além disso, as fêmeas dos grupos controle ( $P < 0.05$ ) e ERR ( $P < 0.05$ ) apresentaram ganho de peso corporal reduzido quando comparadas com os respectivos grupos machos (Figura 2). A análise indicou efeito significativo do gênero ( $F_{(1,31)}=23$ ,  $P < 0.0001$ ) e do estresse ( $F_{(2,31)}=5$ ,  $P < 0.009$ ), porém sem interação entre os fatores ( $F_{(2,31)}=2$ ,  $P > 0.05$ ).

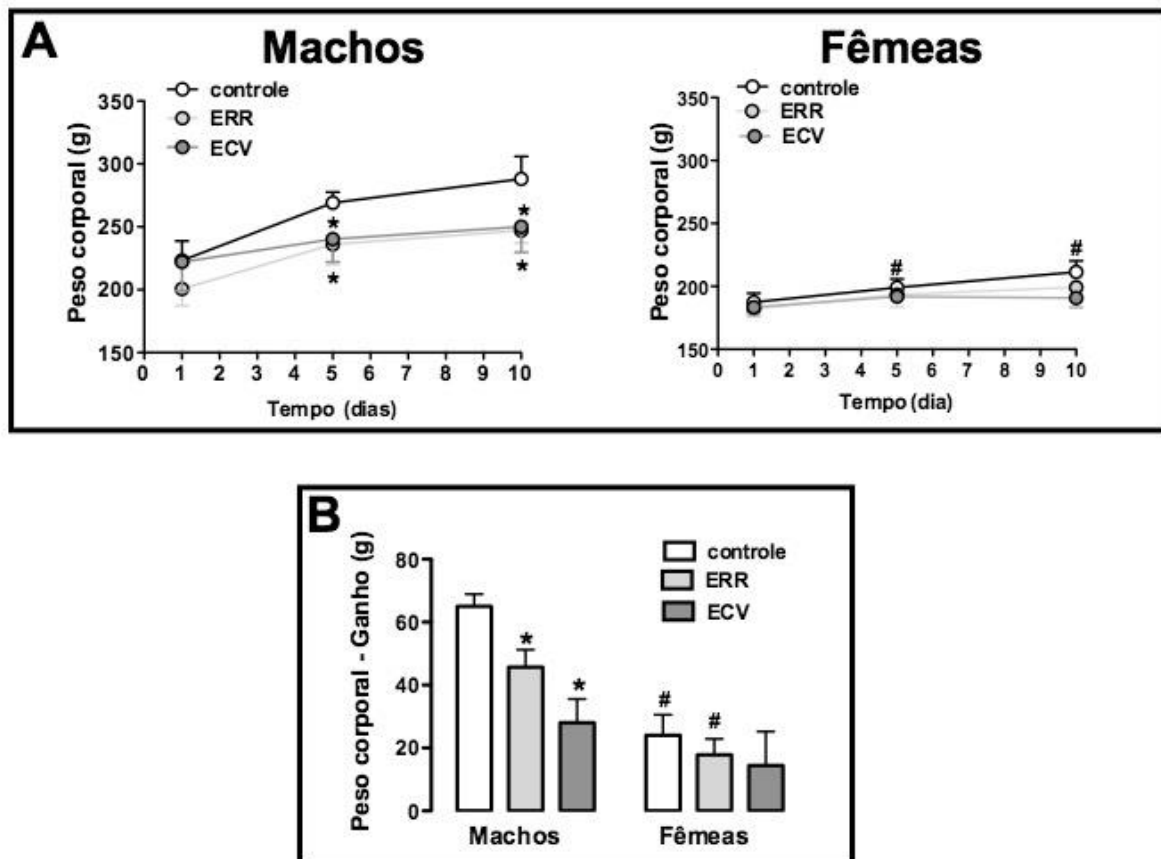
**Peso do Coração** - O peso absoluto do coração dos animais machos dos grupos controle ( $P < 0.05$ ) e ERR ( $P < 0.05$ ) foi maior quando comparados com os respectivos grupos fêmeas

(Tabela 2, Figura 3). Os protocolos de estresse crônico não afetaram o peso absoluto e relativo do coração em nenhum dos grupos experimentais ( $P>0.05$ ) (Tabela 2, Figura 3). A análise dos valores de peso absoluto do coração indicou efeito do gênero ( $F_{(1,31)}=29$ ,  $P<0.0001$ ), mas sem efeito do estresse ( $F_{(2,31)}=2$ ,  $P>0.05$ ) e interação entre os fatores estresse e gênero ( $F_{(2,31)}=1$ ,  $P>0.05$ ). A análise do peso relativo do coração indicou efeito do gênero ( $F_{(1,31)}=5$ ,  $P<0.03$ ) e interação entre os fatores ( $F_{(2,31)}=7$ ,  $P<0.003$ ), porém sem efeito do estresse ( $F_{(2,31)}=1$ ,  $P>0.05$ ).

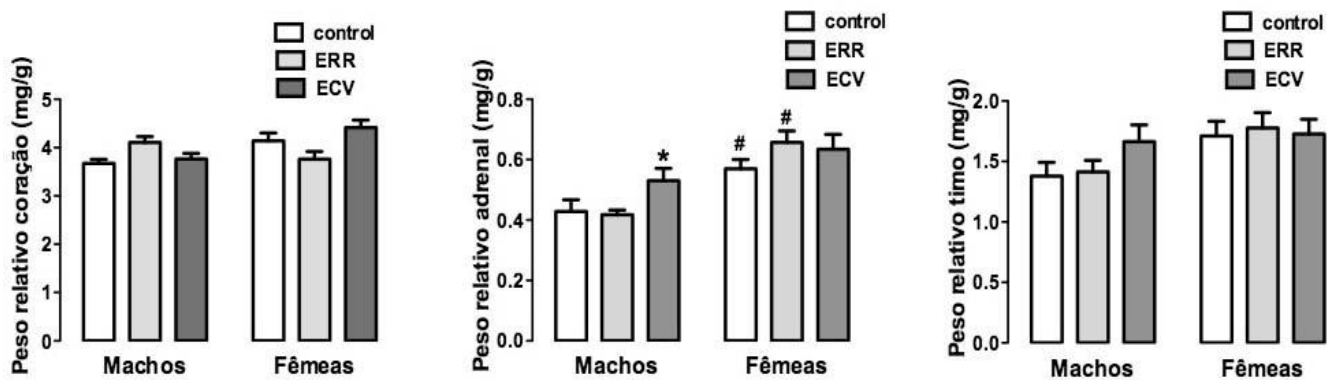
**Peso das adrenais** – Não houve efeito do estresse ( $P>0.05$ ) nem diferenças entre machos e fêmeas ( $P>0.05$ ) no peso absoluto das adrenais (Tabela 2, Figura 3). Entretanto, o peso relativo das adrenais foi maior nas fêmeas dos grupos controle ( $P<0.05$ ) e ERR ( $P<0.05$ ), quando comparadas com os respectivos grupos machos (Tabela 2, Figura 3). Além disso, o ECV aumentou o peso relativo das adrenais nos machos ( $P<0.05$ ) (Tabela 2, Figura 3). A análise dos valores absolutos de peso das adrenais não indicou efeito do gênero ( $F_{(1,31)}=1$ ,  $P>0.05$ ) e do estresse ( $F_{(2,31)}=0.5$ ,  $P>0.05$ ), nem interação entre os fatores ( $F_{(2,31)}=1$ ,  $P>0.05$ ). A análise do peso relativo das adrenais indicou efeito significativo do gênero ( $F_{(1,31)}=26$ ,  $P<0.0001$ ), porém sem efeito do estresse ( $F_{(2,31)}=2$ ,  $P>0.05$ ) e interação entre os fatores estresse e gênero ( $F_{(2,31)}=1$ ,  $P>0.05$ ).

**Peso do Timo** – Não houve efeito do estresse ( $P>0.05$ ) nem diferenças entre machos e fêmeas ( $P>0.05$ ) nos valores de peso absoluto e relativo do timo (Tabela 2, Figura 3). A análise do peso absoluto do timo não indicou efeito do gênero ( $F_{(1,31)}=3$ ,  $P>0.05$ ) e do estresse ( $F_{(2,31)}=0.2$ ,  $P>0.05$ ), nem interação entre os fatores gênero e estresse ( $F_{(2,31)}=0.2$ ,  $P>0.05$ ). A análise do peso relativo indicou efeito do gênero ( $F_{(1,31)}=6$ ,  $P<0.01$ ), porém sem efeito do estresse ( $F_{(2,31)}=1$ ,  $P>0.05$ ) e interação entre os fatores ( $F_{(2,31)}=1$ ,  $P>0.05$ ).





**Figura 2-** Peso corporal machos e fêmeas submetidos aos protocolos de estresse crônico variável (ECV) ou estresse de restrição repetido (ERR). (A) Variação do peso corporal durante a exposição aos protocolos de ECV ou ERR. As sessões de estresse tiveram início no dia 1. (B) Ganho de peso corporal (diferença entre o peso inicial e no 10o dia). Os dados são apresentados com média  $\pm$  EPM (n=6-7 animais por grupo). \*P<0.05 quando comparado com o grupo controle do mesmo gênero, #P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo macho. ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.



**Figura 3-** Peso relativo (peso do órgão/peso corporal) do coração, adrenal e timo em animais machos e fêmeas após a exposição aos protocolos de estresse crônico variável (ECV) ou estresse de restrição repetido (ERR). Os dados são apresentados com média  $\pm$  EPM (n=6-7 animais por grupo). \*P<0.05 quando comparado com o grupo controle do mesmo gênero, #P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo macho. ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

**Tabela 2** - Peso do coração, da adrenal e do timo em animais machos e fêmeas após os 10 dias dos protocolos de estresse crônico variável (ECV) ou exposição repetida ao estresse por restrição (ERR).

Grupos	Coração		Adrenal		Timo	
	Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo <sup>a</sup>	Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo <sup>a</sup>	Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo <sup>a</sup>
<b>Machos</b>						
Controle	1075±76	3.6±0.1	126±16	0.42±0.03	393±32	1.3±0.1
ERR	1030±50	4.1±0.1	109±5	0.41±0.01	356±15	1.4±0.1
ECV	930±57	3.7±0.1	118±9	0.54±0.04*	411±18	1.6±0.2
<b>Fêmeas</b>						
Controle	848±23 <sup>#</sup>	4.1±0.2	120±7	0.57±0.03 <sup>#</sup>	350±14	1.7±0.1
ERR	753±33 <sup>#</sup>	3.7±0.1	133±11	0.66±0.03 <sup>#</sup>	371±36	1.8±0.1
ECV	820±30	4.4±0.1	122±5	0.63±0.05	341±6	1.7±0.1

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

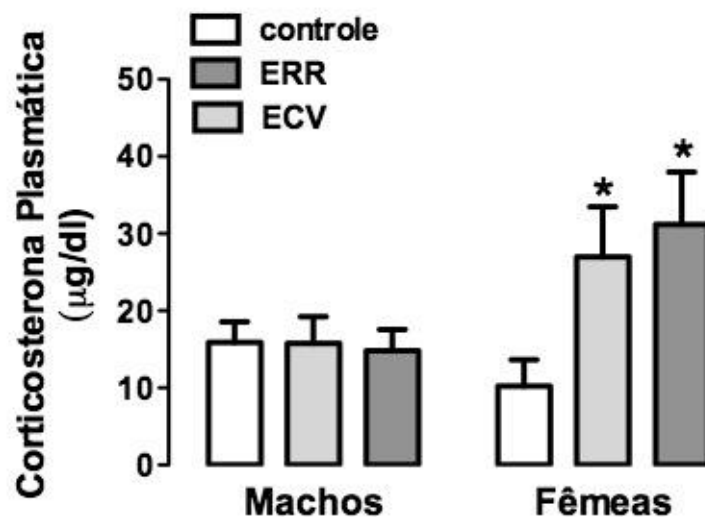
<sup>a</sup> Peso do órgão (mg) / peso corporal (g).

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

<sup>#</sup> P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo fêmeas.

5.1.2. Efeito do estresse crônico sobre os parâmetros basais de corticosterona plasmática em animais machos e fêmeas

A análise dos parâmetros basais de corticosterona plasmática indicou que o ERR ( $P < 0.05$ ) e o ECV ( $P < 0.01$ ) aumentaram os níveis plasmáticos de corticosterona nas fêmeas (Figura 4). Entretanto, nenhum dos protocolos de estresse crônico alteraram os níveis de corticosterona plasmática nos machos (ERR:  $P > 0.05$ , ECV:  $P > 0.05$ ) (Figura 4). A ANOVA bifatorial não indicou efeito do gênero ( $F_{(1,31)}=3$ ,  $P > 0.05$ ), do estresse ( $F_{(2,31)}=2$ ,  $P > 0.05$ ) e interação entre estresse e gênero ( $F_{(2,31)}=2$ ,  $P > 0.005$ ) (Figura 4).

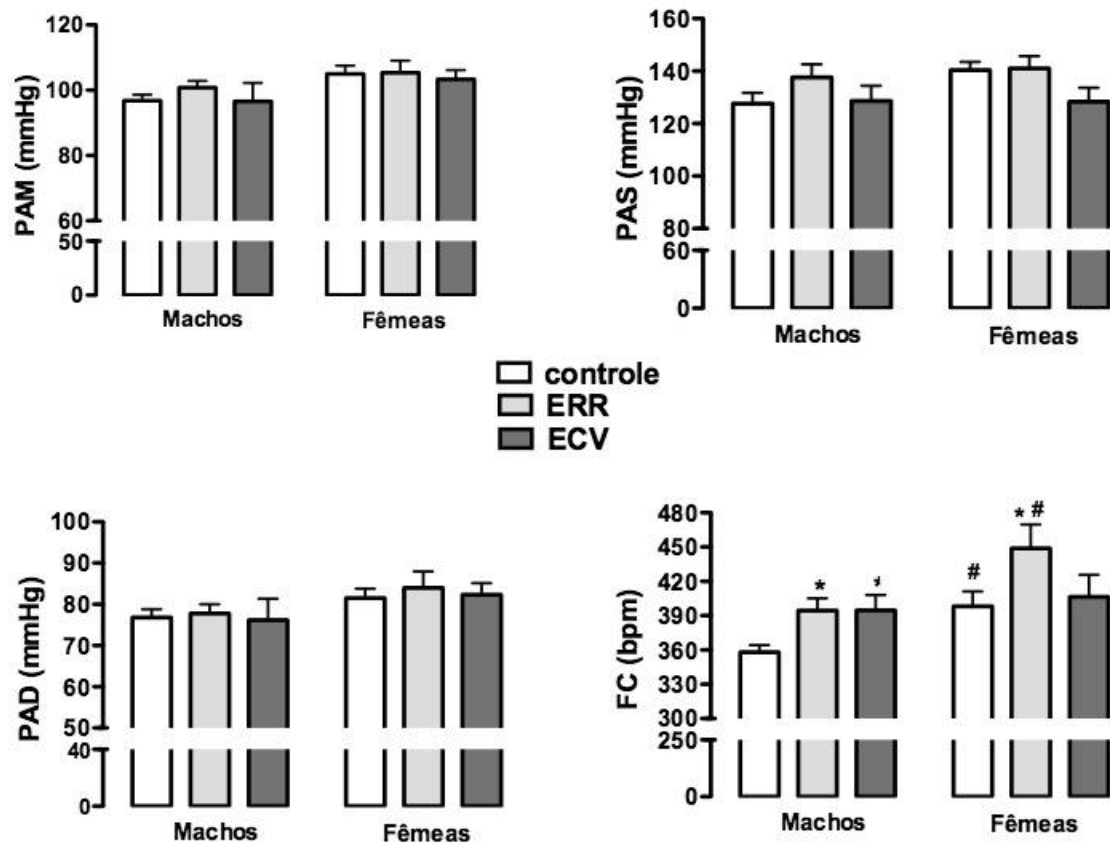


**Figura 4-** Valores basais de corticosterona plasmática em animais machos e fêmeas após os 10 dias de exposição aos protocolos de estresse crônico variável (ECV) ou estresse por restrição repetido (ERR). Os dados são apresentados com média  $\pm$  EPM (n=6-7 animais por grupo) \*  $P < 0.05$ , quando comparado com o grupo controle; ANOVA acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.1.3. Efeito do estresse crônico sobre os parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca em animais machos e fêmeas

A Figura 5 mostra o efeito dos protocolos de ECV e ERR sobre os parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em machos e fêmeas. A análise da PAM e da PAD indicou efeito do gênero (PAM:  $F_{(1,31)}=6$ ,  $P<0.02$ , PAD:  $F_{(1,31)}=4$ ,  $P<0.04$ ), porém sem efeito significativo do estresse (PAM:  $F_{(2,31)}=0.4$ ,  $P>0.05$ , PAD:  $F_{(2,31)}=0.2$ ,  $P>0.05$ ) e interação entre estresse e gênero (PAM:  $F_{(2,31)}=0.15$ ,  $P>0.005$ , PAD:  $F_{(2,31)}=0.1$ ,  $P>0.005$ ). A análise da PAS não indicou efeito significativo do estresse ( $F_{(2,27)}=2.26$ ,  $P>0.05$ ), do gênero ( $F_{(1,27)}=1.8$ ,  $P>0.05$ ) e interação entre estresse e gênero ( $F_{(2,27)}=1.0$ ,  $P>0.05$ ). O pós-teste não revelou efeito dos protocolos de estresse sobre a PAM (ERR:  $P>0.05$ , ECV:  $P>0.05$ ), PAS (ERR:  $P>0.05$ , ECV:  $P>0.05$ ) e PAD (ERR:  $P>0.05$ , ECV:  $P>0.05$ ) em machos e fêmeas. Também não foram identificados dimorfismos sexuais nos valores de PAM ( $P>0.05$ ), PAS ( $P>0.05$ ) e PAD ( $P>0.05$ ) em nenhum dos grupos experimentais.

A análise da FC basal indicou efeito do estresse ( $F_{(2,31)}=4$ ,  $P<0.03$ ) e do gênero ( $F_{(1,31)}=8$ ,  $P<0.009$ ), porém sem interação entre os fatores ( $F_{(2,31)}=1$ ,  $P>0.05$ ). O pós-teste revelou que as fêmeas dos grupos controle ( $P<0.05$ ) e ERR ( $P<0.05$ ) apresentaram valores de FC basal significativamente maior do que os respectivos animais machos. O ERR aumentou os parâmetros basais de FC nas fêmeas ( $P<0.05$ ) e machos ( $P<0.05$ ), ao passo que o ECV elevou a FC somente nos machos ( $P<0.05$ ).



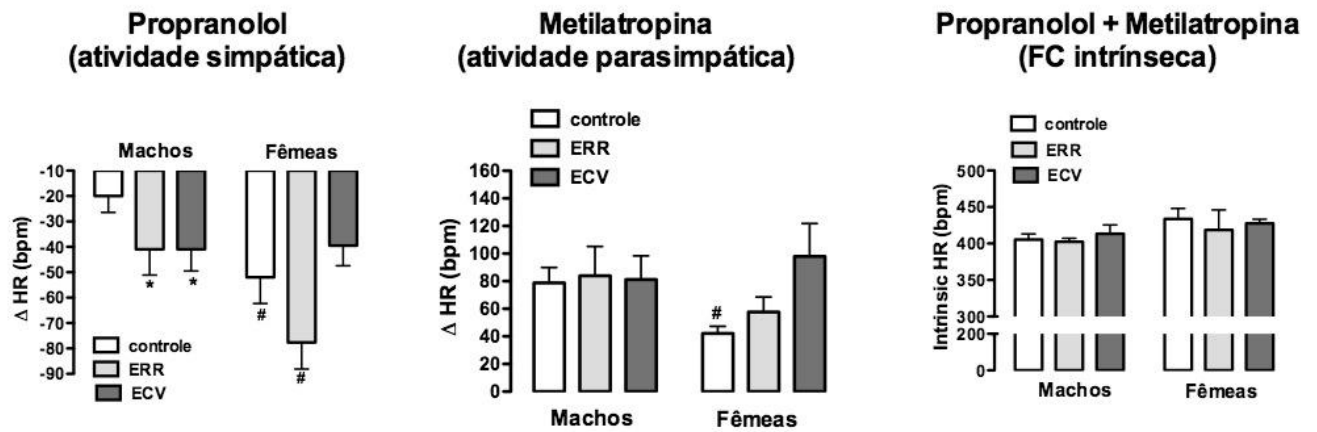
**Figura 5** - Valores basais de pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em animais machos e fêmeas após os 10 dias de exposição aos protocolos de estresse crônico variável (ECV) ou estresse por restrição repetido (ERR). Os dados são apresentados com média  $\pm$  EPM (N= 6-7 animais por grupo) \*P<0.05 quando comparado com o grupo controle do mesmo gênero, #P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo macho. ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.1.4. Efeito do estresse crônico sobre a atividade simpática e parassimpática cardíaca e a frequência cardíaca intrínseca em animais machos e fêmeas

O efeito do tratamento intravenoso (i.v.) com propranolol (antagonista de adrenoceptores  $\beta$ ) e/ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) sobre a FC é mostrado na Figura 6. A variação da FC ( $\Delta FC$ ) induzida pela administração i.v. de propranolol (atividade simpática) nos grupos controle ( $P < 0.05$ ) e ERR ( $P < 0.05$ ) foi maior nas fêmeas quando comparados com os respectivos grupos machos (grupo controle). Além disso, o ERR e o ECV aumentaram a  $\Delta FC$  induzida pela administração i.v. propranolol nos machos ( $P < 0.001$ ). A análise estatística indicou efeito do estresse ( $F_{(2,31)}=4$ ,  $P < 0.04$ ) e do gênero ( $F_{(1,31)}=9$ ,  $P < 0.005$ ), porém sem interação entre os fatores ( $F_{(2,31)}=1$ ,  $P > 0.05$ ).

A análise da  $\Delta FC$  induzida pela administração i.v. metilatropina (atividade parassimpática) não indicou efeito do estresse ( $F_{(2,31)}=2$ ,  $P > 0.05$ ) e do gênero ( $F_{(1,25)}=1$ ,  $P > 0.005$ ), nem interação entre estresse e gênero ( $F_{(2,31)}=2$ ,  $P > 0.05$ ). Entretanto, o pós-teste revelou que a resposta do grupo controle fêmea foi menor, quando comparado ao respectivo grupo macho ( $P < 0.05$ ).

A análise dos valores de FC após o tratamento combinado com propranolol e metilatropina (FC intrínseca) não mostrou efeito do estresse ( $F_{(2,31)}=0.3$ ,  $P > 0.05$ ) e do gênero ( $F_{(1,31)}=2$ ,  $P > 0.05$ ), nem interação entre os fatores estresse e gênero ( $F_{(2,31)}=0.1$ ,  $P > 0.05$ ).



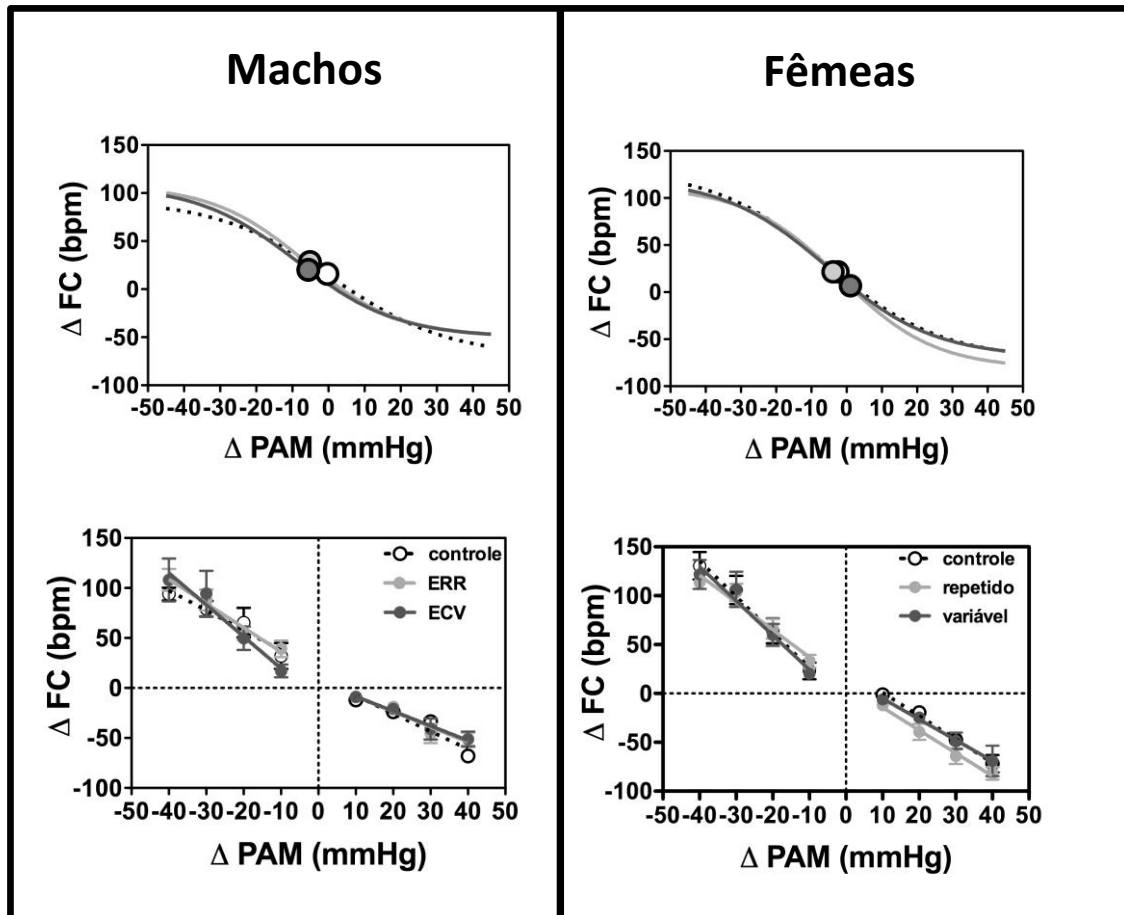
**Figura 6** - Variação da frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) induzida pela administração intravenosa de propranolol (antagonista de adrenoceptores  $\beta$ ) ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) e frequência cardíaca observada após a administração combinada de metilatropina e propranolol intrínseca (FC intrínseca) em machos e fêmeas submetidos aos protocolos de estresse crônico variável (ECV) ou estresse de restrição repetido (ERR). Os dados são apresentados com média  $\pm$  EPM (N= 6-7 animais por grupo) \* $P < 0.05$  quando comparado com o grupo controle do mesmo gênero, # $P < 0.05$  quando comparado com o respectivo grupo macho. ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.



### 5.1.5. Efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo em ratos e ratas

A Figura 7 e a Tabela 3 apresentam os resultados das análises de regressão não-linear e linear do barorreflexo. A análise de regressão não-linear do barorreflexo indicou que as fêmeas controle apresentaram valores maiores no parâmetro  $P_2$ , quando comparadas com o respectivo grupo macho ( $P < 0.01$ ). Tanto o ERR ( $P < 0.01$ ) quanto o ECV ( $P < 0.01$ ) reduziram o  $P_1$  nos machos, porém não nas fêmeas ( $P > 0.05$ ). Além disso, os machos sujeitos ao ECV tiveram redução no ganho ( $P < 0.01$ ), quando comparados com o respectivo grupo controle.

A análise de regressão linear foi utilizada para análise individual da atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor da pressão arterial. Esta análise indicou que as fêmeas do grupo controle, quando comparadas com os respectivos machos, apresentaram maiores respostas de bradicardia ( $P < 0.01$ ) e taquicardia ( $P < 0.01$ ) reflexas. Além disso, os animais machos sujeitos ao ECV obtiveram o aumento da resposta de taquicardia reflexa ( $P < 0.05$ ), quando comparados com seu grupo controle.



**Figura 7** - Análise de regressão não-linear (gráficos superiores) e linear (gráficos inferiores) do barorreflexo correlacionando variações de pressão arterial média ( $\Delta PAM$ ) e a resposta reflexa de frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) em machos e fêmeas submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Símbolos nas curvas sigmóides indicam a PA50. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média nas curvas de regressão linear.

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

Grupo	Ganho (bpm/mmHg)	P <sub>1</sub> (bpm)	P <sub>2</sub> (bpm)	Variação da FC (bpm)	PA <sub>50</sub> (mmHg)	Ganho bradicardia (bpm/mmHg)	Ganho taquicardia (bpm/mmHg)
<b>Machos</b>							
Controle	-2.2±0.2	-69±5	94±6	162±10	-1±1	-1.8±0.2	-1.9±0.3
ERR	-1.9±0.1	-51±6*	108±9	159±9	-6±4	-1.5±0.2	-2.5±0.4
ECV	-1.5±0.1*	-51±6*	108±18	158±27	-6±5	-1.4±0.3	-3.3±0.4*
<b>Fêmeas</b>							
Controle	-2.0±0.1	-71±8	130±11 <sup>#</sup>	202±17	-3±2	-2.5±0.2 <sup>#</sup>	-3.7±0.4 <sup>#</sup>
ERR	-2.4±0.2	-81±6 <sup>#</sup>	112±5	190±12	-3±1	-2.4±0.2	-2.8±0.3
ECV	-1.9±0.02	-69±11	121±12	187±24	-2±3	-2.1±0.4	-3.6±0.5
<i>Interação</i>	$F_{(2,30)}=2.8$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=1.7$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=1.1$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=0.04$ $P>0.05$	$F_{(2,25)}=0.4$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=0.2$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=2.4$ $P>0.05$
<i>Estresse</i>	$F_{(2,30)}=4.8$ $P<0.05$	$F_{(2,30)}=1.02$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=0.07$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=0.1$ $P>0.05$	$F_{(2,25)}=0.2$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=1.2$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=2.3$ $P>0.05$
<i>Idade</i>	$F_{(1,30)}=3.2$ $P>0.05$	$F_{(1,30)}=8.1$ $P<0.05$	$F_{(1,30)}=3.8$ $P>0.05$	$F_{(1,30)}=4.8$ $P<0.05$	$F_{(1,25)}=0.2$ $P>0.05$	$F_{(1,32)}=11.8$ $P<0.005$	$F_{(1,30)}=6.3$ $P<0.05$

Valores expressos como média ± EPM

\* P<0.05 vs grupo controle. # P<0.05 vs respectivo grupo macho.

ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

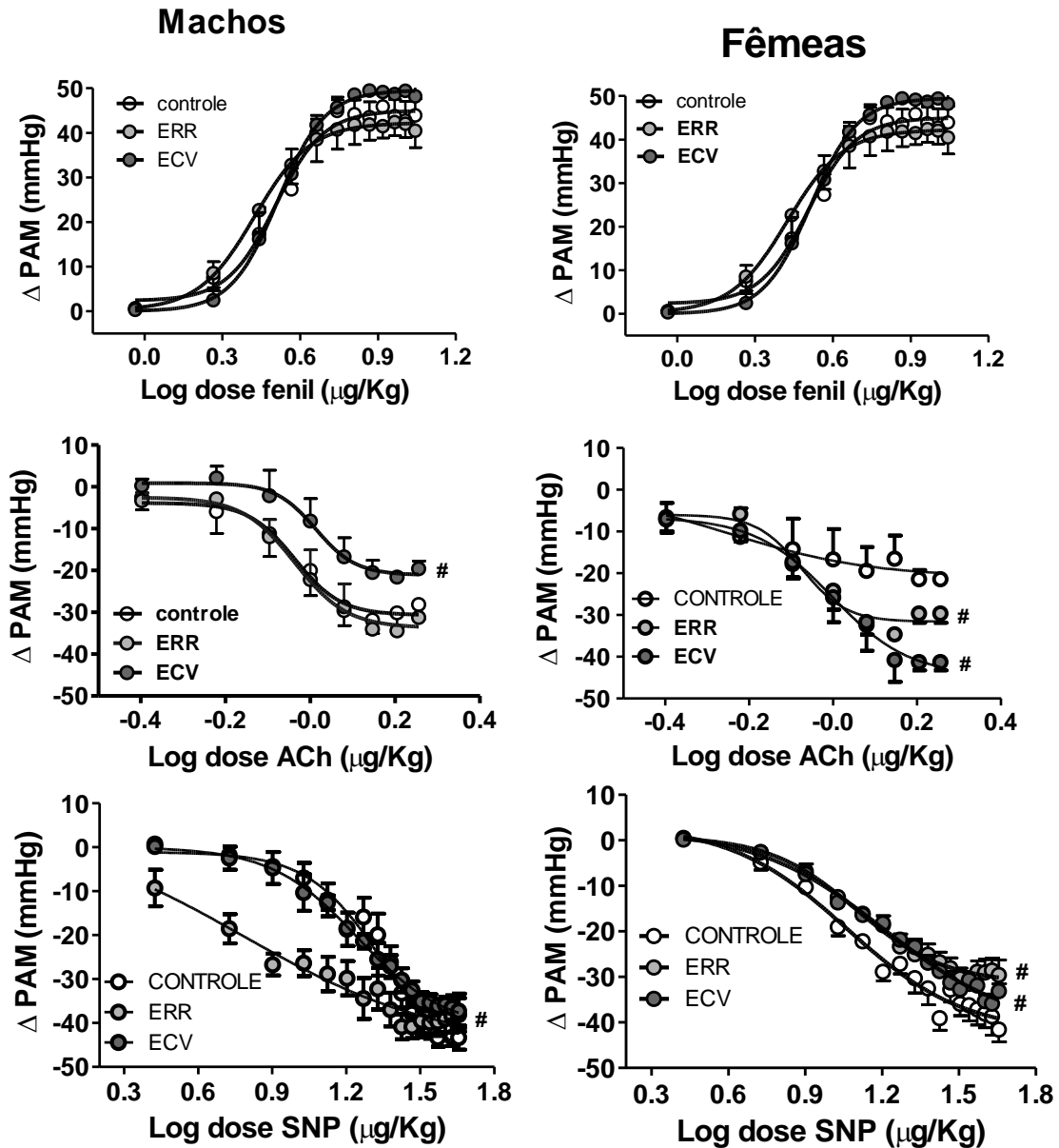
5.1.6. Efeito do estresse crônico sobre a resposta de pressão arterial a agentes vasoativos em ratos e ratas.

Os resultados das alterações na pressão arterial induzidas pela infusão de fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio (NPS) são apresentados na Figura 8 e na Tabela 4.

**Fenilefrina** – A análise da resposta pressora causada pela infusão intravenosa de fenilefrina (agonista seletivo de adrenoceptores  $\alpha_1$ ) não indicou dimorfismos sexuais ( $P>0.05$ ), nem efeitos dos protocolos de estresse crônico nos animais machos e fêmeas ( $P>0.05$ ).

**Acetilcolina** – A análise da resposta depressora causada pela infusão intravenosa de acetilcolina indicou que o ECV ( $P<0.01$ ), porém não o ERR ( $P>0.05$ ), reduziu o  $E_{max}$  nos machos. Por outro lado, o ERR ( $P<0.01$ ) e o ECV ( $P<0.001$ ) aumentaram o  $E_{max}$  da curva dose-resposta nas fêmeas. A análise não identificou diferenças entre machos e fêmeas dos grupos controle ( $P>0.05$ ).

**Nitroprussiato de sódio** – A análise da resposta depressora induzida pela infusão intravenosa de NPS (doador de óxido nítrico) indicou que o ERR diminuiu a  $ED_{50}$  ( $P<0.01$ ) da curva dose-resposta, porém sem afetar o  $E_{max}$  ( $P>0.05$ ) em machos. Além disso, ambos os protocolos de estresse crônico reduziram o  $E_{max}$  nas fêmeas (ERR:  $P<0.01$ , ECV:  $P<0.05$ ). A análise não identificou diferenças entre machos e fêmeas dos grupos controle ( $P>0.05$ ).



**Figura 8** - Variações da pressão arterial média ( $\Delta$  PAM) causada pela infusão intravenosa de doses crescentes de fenilefrina (Fenil, agonista seletivo de adrenoreceptores  $\alpha_1$ ), acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS, doador de óxido nítrico) animais machos e fêmeas submetidos ao estresse de restrição repetido (ERR) ou ao estresse crônico variável (ECV). Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média.

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

Grupo	Fenil		Ach		NPS	
	$ED_{50}$	$E_{max}$	$ED_{50}$	$E_{max}$	$ED_{50}$	$E_{max}$
<b>Machos</b>						
Controle	0.68±0.07	41±1	-0.08±0.06	-28±3	1.3±0.05	-43±3
ERR	0.50±0.07	37±2	-0.05±0.2	-31±0.1	0.6±0.1*	-38±3
ECV	0.45±0.09	47±2	0.04±0.07	-19±2*	1.2±0.03	-37±4
<b>Fêmeas</b>						
Controle	0.47±0.05	43±3	0.04±0.1	-21±1	1.05±0.04	-41±2
ERR	0.41±0.04	49±4	-0.11±0.09	-30±2*	1.1±0.04	-30±3*
ECV	0.49±0.05	47±2	0.01±0.09	-41±2*	1.1±0.05	-33±1*
<i>Interação</i>	$F_{(2,24)}=1.7$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=0.2$ $7 P>0.05$	$F_{(2,24)}=0.4$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=24$ $P<0.001$	$F_{(2,24)}=10.1$ $P<0.001$	$F_{(2,30)}=0.7$ $P>0.05$
<i>Gênero</i>	$F_{(2,24)}=1.8$ $P>0.05$	$F_{(1,30)}=1$ $P>0.05$	$F_{(1,24)}=0.01$ $P>0.05$	$F_{(1,30)}=7.6$ $P<0.05$	$F_{(1,24)}=1$ $P>0.05$	$F_{(1,30)}=4$ $P>0.05$
<i>Estresse</i>	$F_{(1,24)}=1.3$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=5$ $P<0.05$	$F_{(2,24)}=0.5$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=5.1$ $P<0.05$	$F_{(2,24)}=12$ $P<0.001$	$F_{(2,30)}=5$ $P<0.05$

## 5.2. Experimento 2: Efeito do estresse crônico sobre o comportamento de ratos e ratas.

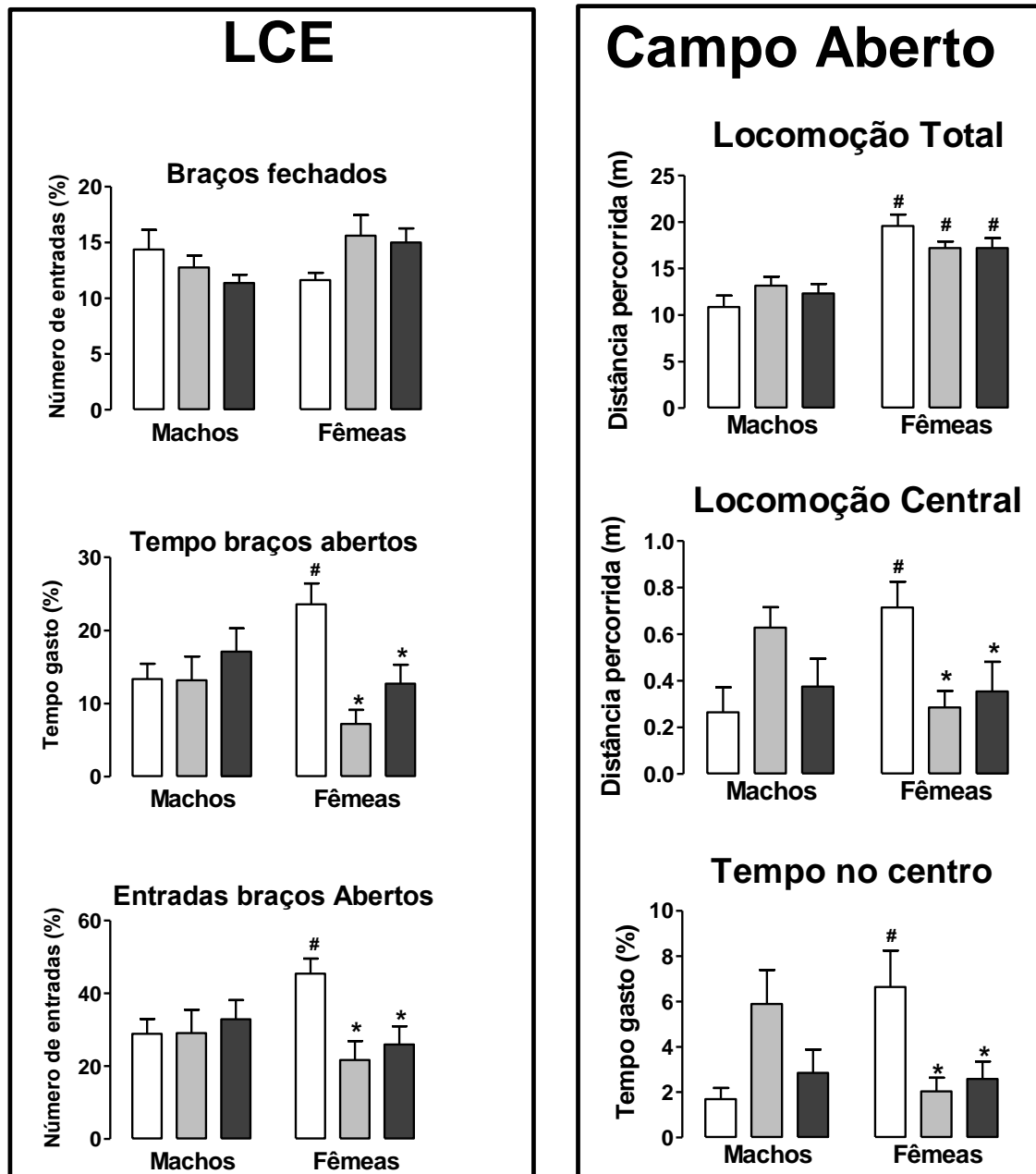
**Labirinto em cruz elevado (LCE)** - A análise do número de entradas nos braços fechados indicou uma interação entre estresse e gênero ( $F_{(2,42)}=4$ ,  $P<0.03$ ), porém sem efeito do tipo de estresse ( $F_{(2,42)}=0.5$ ,  $P>0.05$ ) e do gênero ( $F_{(1,42)}=1$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 9). No entanto, a análise pos-hoc não revelou diferenças entre os grupos experimentais ( $P>0,05$ ) (Fig. 9).

A análise da porcentagem de tempo nos braços abertos indicou efeito do estresse ( $F_{(2,42)}=5$ ,  $P<0.01$ ), e uma interação entre estresse x gênero ( $F_{(2,42)}=6$ ,  $P<0.007$ ), porém sem efeito do gênero ( $F_{(1,42)}=0.001$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 10). A análise da porcentagem de entradas do braço aberto indicou interação entre estresse x gênero, mas sem efeito do estresse ( $F_{(2,42)}=3$ ,  $P>0.05$ ) ou do gênero ( $F_{(1,42)}=0.03$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 10). A análise pos-hoc revelou que a porcentagem de tempo ( $P<0,05$ ) e o número de entradas nos braços abertos ( $P<0,05$ ) foram maiores no grupo controle fêmeas, quando comparado com o respectivo grupo dos machos (Fig. 10). Além disso, ambos os protocolos de estresse diminuíram o tempo gasto (ERR:  $P<0.05$ , ECV:  $P<0.05$ ) e o número de entradas nos braços abertos (ERR:  $P<0.05$ , ECV:  $P<0.05$ ) das fêmeas, mas sem afetar a exploração dos braços abertos dos machos (Fig. 9).

**Campo Aberto (CA)** – A análise da distância percorrida e do tempo gasto no centro indicou interação entre estresse e gênero (distância:  $F_{(2,42)}=7$ ,  $P<0.002$ ; tempo:  $F_{(2,42)}=8$ ,  $P<0.0009$ ), porém sem efeito do estresse (distância:  $F_{(2,42)}=0.8$ ,  $P>0.05$ ; time:  $F_{(2,42)}=1$ ,  $P>0.05$ ) e do gênero (distância:  $F_{(1,42)}=0.2$ ,  $P>0.05$ ; time:  $F_{(1,42)}=1$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 9). A análise pós-hoc revelou que tanto a distância percorrida ( $P <0.05$ ) como o tempo gasto ( $P <0,05$ ) no centro foram maiores nas fêmeas do grupo controle, quando comparadas com o respectivo grupo dos machos (Fig. 9). Além disso, ambos ERR ( $P <0.05$ ) e ECV ( $P <0,05$ ) diminuíram a distância percorrida e o tempo no centro em fêmeas, mas sem afetar a exploração no centro nos grupos machos (Fig. 9).

A análise da distância total percorrida (ou seja, centro + periferia) (locomoção total) indicou efeito do gênero ( $F_{(1,42)}=47$ ,  $P<0.0001$ ), mas sem influência do estresse ( $F_{(2,42)}=0.1$ ,  $P>0.05$ ) e interação entre estresse x gênero ( $F_{(2,42)}=3$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 9). A análise pps-hoc revelou que a locomoção total foi maior em todos os grupos das fêmeas em relação aos respectivos grupos dos machos (Fig. 9).





**Figura 9** - Análise comportamental no labirinto de cruz elevada (LCE) (à esquerda) e à direita o teste de campo aberto em ratos machos e fêmeas. Os animais controle estão representados pela barra branca, animais submetidos ao ERR (cinza claro) e os animais submetidos ao ECV (cinza escuro). (**Esquerda**) número de entradas nos braços fechados, porcentagem do tempo gasto nos braços abertos e entradas nos braços abertos no LCE. (**Direita**) Locomoção total (distância percorrida na periferia + central), distância percorrida (locomoção central) e tempo gasto (tempo no centro) no centro no aparato do CA. As barras representam a média  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  versus respectivo grupo controle, # $P < 0,05$  vs respectivo grupo dos machos. ANOVA bifatorial seguida do teste post-hoc de Bonferroni ( $n=8$ /grupo).

### **5.3. Experimento 3: Efeito do estresse crônico sobre a função cardiovascular de ratas normotensas e espontaneamente hipertensas (SHR)**

#### 5.3.1. Efeito do estresse crônico sobre os valores de peso corporal, do coração, das adrenais e do timo em ratas normotensas e ratas SHR.

**Peso Corporal** - A análise da variação do peso corporal durante a exposição aos protocolos de estresse crônico indicou que as fêmeas SHR em todos os grupos experimentais apresentaram peso corporal menor em relação aos respectivos grupos normotensas durante todo o período de análise (controle:  $P < 0.05$ , ERR:  $P < 0.05$ , ECV:  $P < 0.05$ ) (Figura 10). Além disso, o ERR ( $P < 0.05$ ) e o ECV ( $P < 0.05$ ) reduziram o ganho de peso corporal nas fêmeas normotensas no dia 10, ao passo que a redução do peso corporal nas ratas SHR foi identificada nos dias 5 (ECV:  $P < 0.05$ , ERR:  $P < 0.05$ ) e 10 (ECV:  $P < 0.05$ , ERR:  $P < 0.05$ ) (Figura 10). A análise ANOVA trifatorial indicou efeito significativo da linhagem ( $F_{(1,53)}=189$ ,  $P < 0.0001$ ), do estresse ( $F_{(2,53)}=5$ ,  $P > 0.009$ ) e do tempo ( $F_{(2,106)}=7$ ,  $P < 0.001$ ). Também foi identificada interação entre os fatores tempo e estresse ( $F_{(4,106)}=6$ ,  $P < 0.0002$ ), porém não entre os fatores linhagem e estresse ( $F_{(2,53)}=0,1$ ,  $P > 0.05$ ) e tempo e linhagem ( $F_{(2,106)}=1$ ,  $P > 0.05$ ).

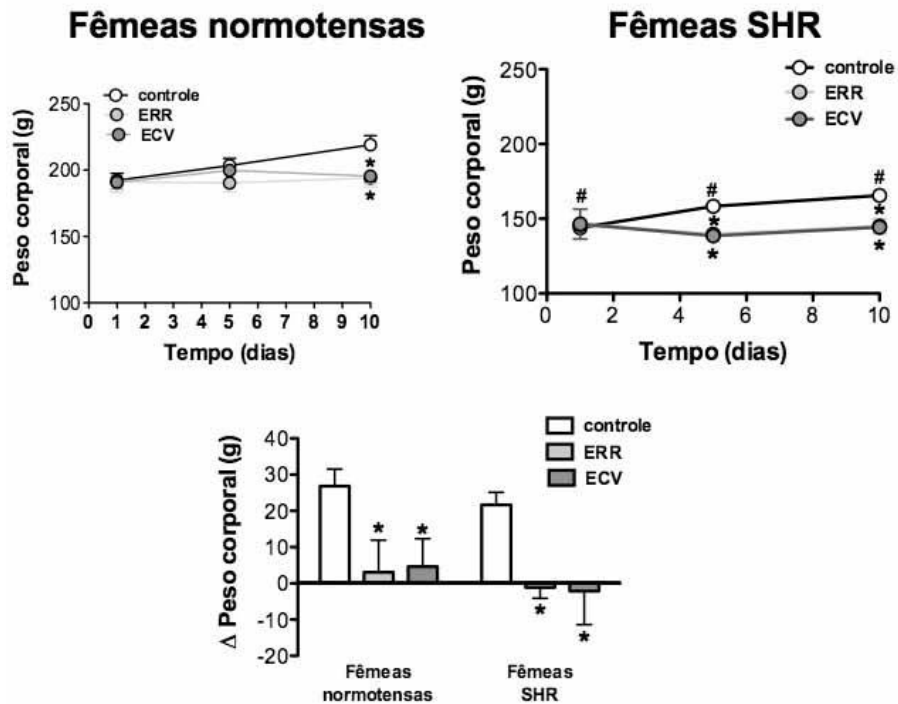
A análise do ganho de peso corporal no período (diferença entre o peso corporal inicial e no 10º dia) indicou que o ERR e o ECV reduziram o ganho de peso corporal tanto das ratas normotensas (ECV:  $P < 0.05$ , ERR:  $P < 0.05$ ) quanto das ratas SHR (ECV:  $P < 0.05$ , ERR:  $P < 0.05$ ) (Figura 10). A análise ANOVA bifatorial indicou efeito do estresse ( $F_{(2,53)}=8$ ,  $P < 0.0009$ ), porém sem influência significativa da linhagem ( $F_{(1,53)}=1$ ,  $P > 0.05$ ) e interação entre estresse e linhagem ( $F_{(2,53)}=0,1$ ,  $P > 0.05$ ).

**Peso do Coração** – O ERR aumentou os valores de peso absoluto do coração tanto nas ratas normotensas ( $P<0.05$ ) quanto nas ratas SHR ( $P<0.05$ ) (Tabela 5). A análise dos valores relativos do peso do coração (peso coração/peso corporal) indicou que as ratas SHR dos grupos controle ( $P<0.05$ ) e ERR ( $P<0.05$ ) apresentaram valores maiores, quando comparadas com os respectivos grupos de ratas normotensas (Tabela 5 e Figura 11). Além disso, o ECV aumentou o peso relativo do coração das ratas normotensas ( $P<0.05$ ) (Tabela 5 e Figura 11). A análise dos valores de peso absoluto do coração indicou efeito da linhagem ( $F_{(1,41)}=5$ ,  $P<0.02$ ) e do estresse ( $F_{(2,41)}=6$ ,  $P<0.003$ ), porém sem interação entre os fatores estresse e linhagem ( $F_{(2,41)}=0.3$ ,  $P>0.05$ ). A análise do peso relativo do coração indicou efeito da linhagem ( $F_{(1,41)}=9$ ,  $P<0.004$ ), porém sem efeito do estresse ( $F_{(2,41)}=1$ ,  $P>0.05$ ) e interação entre os fatores estresse e linhagem ( $F_{(2,41)}=2$ ,  $P>0.05$ ).

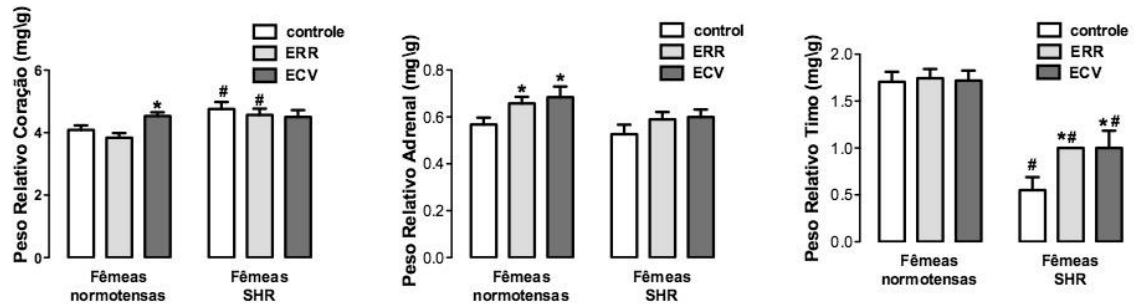
**Peso das adrenais** – As ratas SHR de todos os grupos experimentais apresentaram valores menores de peso das glândulas adrenais, quando comparadas com os respectivos grupos de ratas normotensas (Tabela 5). A análise dos valores relativos do peso das adrenais (peso adrenais/peso corporal) indicou que o ERR ( $P<0.05$ ) e o ECV ( $P<0.05$ ) causaram hipertrofia da glândula nas ratas normotensas (Tabela 5 e Figura 11). A análise dos valores absolutos de peso das adrenais indicou efeito da linhagem ( $F_{(1,41)}=29$ ,  $P<0.0001$ ), porém não houve efeito do estresse ( $F_{(2,41)}=0.1$ ,  $P>0.05$ ) e nem interação entre os fatores linhagem e estresse ( $F_{(2,41)}=0.9$ ,  $P>0.05$ ). A análise do peso relativo das adrenais indicou efeito significativo da linhagem ( $F_{(1,41)}=5$ ,  $P<0.04$ ) e do estresse ( $F_{(2,41)}=4$ ,  $P<0.02$ ), porém sem interação entre os fatores estresse e linhagem ( $F_{(2,41)}=0.2$ ,  $P>0.05$ ).

**Peso do Timo** – As ratas SHR de todos os grupos experimentais apresentaram valores menores de peso absoluto e relativo (peso timo/peso corporal) do timo, quando comparadas com os respectivos grupos de ratas normotensas (Tabela 5 e Figura 11). Além disso, o ERR e

o ECV aumentaram os valores relativos de peso do timo nas ratas SHR (Tabela 5 e Figura 11). A análise do peso absoluto do timo indicou efeito da linhagem ( $F_{(1,41)}=51$ ,  $P<0.0001$ ), porém sem efeito do estresse ( $F_{(2,41)}=0.61$ ,  $P>0.05$ ) e interação entre os fatores linhagem e estresse ( $F_{(2,41)}=0.01$ ,  $P>0.05$ ). A análise do peso relativo indicou efeito da linhagem ( $F_{(1,41)}=73$ ,  $P<0.0001$ ), porém sem efeito do estresse ( $F_{(2,41)}=2$ ,  $P>0.05$ ) e interação entre os fatores ( $F_{(2,41)}=2$ ,  $P>0.05$ ).



**Figura 10** - Peso corporal de animais fêmeas normotensas e SHR submetidos aos protocolos de estresse crônico variável (ECV) ou estresse de restrição repetido (ERR). (A) Variação do peso corporal durante a exposição aos protocolos de ECV ou ERR. As sessões de estresse tiveram início no dia 1. (B) Ganho de peso corporal (diferença entre o peso inicial e no 10o dia). Os dados são apresentados com média  $\pm$  EPM (n=7-11 animais por grupo). \*P<0.05 quando comparado com o grupo controle da mesma linhagem, #P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo das ratas normotensas. ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.



**Figura 11** - Peso relativo (peso do órgão/peso corporal) do coração, adrenal e timo em animais fêmeas normotensas e SHR após a exposição aos protocolos de estresse crônico variável (ECV) ou estresse de restrição repetido (ERR). Os dados são apresentados com média  $\pm$  EPM (n=7-9 animais por grupo). \*P<0.05 quando comparado com o grupo controle da mesma linhagem, #P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo normotenso. ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

**Tabela 5** - Peso do coração, da adrenal e do timo em fêmeas normotensas e SHR após os 10 dias dos protocolos de estresse crônico variável (ECV) ou exposição repetida ao estresse por restrição (ERR).

Grupos	Coração		Adrenal		Timo	
	Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo <sup>a</sup>	Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo <sup>a</sup>	Peso Absoluto (mg)	Peso Relativo <sup>a</sup>
<b>Fêmeas normotensas</b>						
Controle	856±24	4.1±0.1	120±8	0.56±0.03	326±16	1.70±0.1
ERR	757±27*	3.9±0.1	131±12	0.66±0.02*	311±41	1.74±0.09
ECV	791±29	4.5±0.1*	118±5	0.69±0.04*	342±4	1.71±0.1
<b>Fêmeas SHR</b>						
Controle	820±56	4.7±0.2 <sup>#</sup>	91±5 <sup>#</sup>	0.52±0.04	185±23 <sup>#</sup>	0.55±0.1 <sup>#</sup>
ERR	668±23*	4.5±0.2 <sup>#</sup>	81±5 <sup>#</sup> .4	0.59±0.03	175±16 <sup>#</sup>	1.0±0.0* <sup>#</sup>
ECV	720±39	4.5±0.2	86±6 <sup>#</sup>	0.60±0.03	198±23 <sup>#</sup>	1.0±0.2* <sup>#</sup>

Os dados são apresentados com média ± EPM (n= 7-9 animais por grupo)

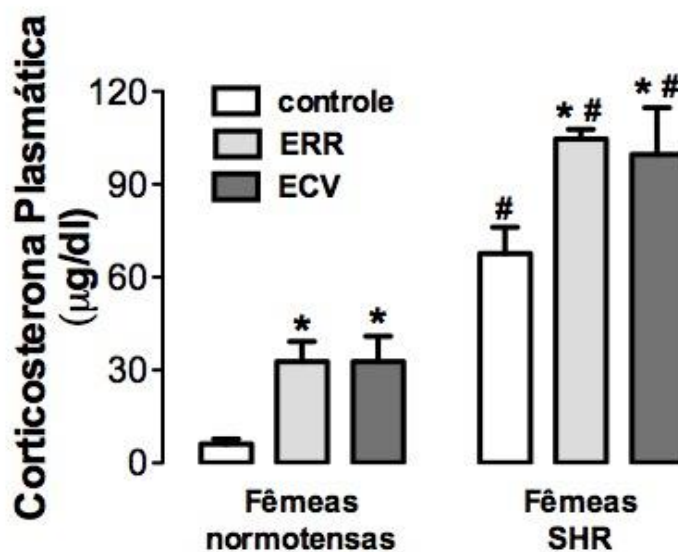
<sup>a</sup> Peso do órgão (mg) / peso corporal (g).

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

<sup>#</sup> P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo fêmea normotensa.

5.3.2. Efeito do estresse crônico sobre os parâmetros basais de corticosterona plasmática em animais fêmeas normotensas e SHR

A análise dos parâmetros basais de corticosterona plasmática indicou que as fêmeas SHR em todos os grupos experimentais apresentaram valores maiores em relação aos respectivos grupos de ratas normotensas (Figura 12). Além disso, o ERR e o ECV aumentaram os níveis plasmáticos de corticosterona tanto nas fêmeas normotensas (ERR:  $P < 0.05$ , ECV:  $P < 0.05$ ) quanto nas SHR (ERR:  $P < 0.01$ , ECV:  $P < 0.05$ ) (Figura 12). A ANOVA bifatorial indicou efeito da linhagem ( $F_{(1,32)}=96$ ,  $P < 0.0001$ ) e do estresse ( $F_{(2,32)}=9$ ,  $P < 0.0009$ ), porém não identificou interação entre os fatores estresse e linhagem ( $F_{(2,32)}=0.2$ ,  $P > 0.05$ ) (Figura 12).



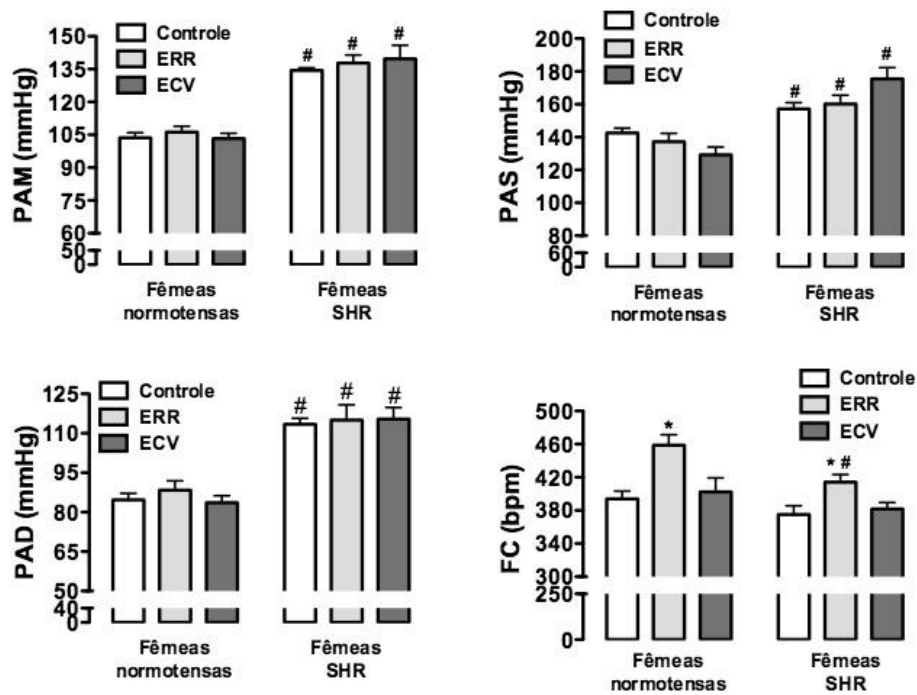
**Figura 12** - Valores basais de corticosterona plasmática em animais fêmeas normotensas e SHR após os 10 dias de exposição aos protocolos de estresse crônico variável (ECV) ou estresse por restrição repetido (ERR). Os dados são apresentados com média  $\pm$  EPM (n=6-7 animais por grupo) \*  $P < 0.05$ , quando comparado com o grupo controle; #  $P < 0.05$  quando comparado com o respectivo grupo fêmea normotensa. ANOVA bifatorial acompanhada do pós-teste de Bonferroni.



5.3.3. Efeito do estresse crônico sobre os parâmetros basais de pressão arterial e frequência cardíaca em fêmeas normotensas e SHR

A Figura 13 mostra o efeito dos protocolos de ECV e ERR sobre os parâmetros basais de pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em fêmeas normotensas e SHR. As ratas SHR de todos os grupos experimentais apresentaram valores maiores de PAM ( $P < 0.05$ ), PAS ( $P < 0.05$ ) e PAD ( $P < 0.05$ ), quando comparadas com seus respectivos grupos normotensos (Figura 13). A análise da PAM, PAD e PAS indicou efeito da linhagem (PAM:  $F_{(1,41)}=149$ ,  $P < 0.0001$ , PAD:  $F_{(1,41)}=87$ ,  $P < 0.0001$ , PAS:  $F_{(1,41)}=48$ ,  $P < 0.0001$ ), porém sem efeito significativo do estresse (PAM:  $F_{(2,41)}=0.4$ ,  $P > 0.05$ , PAD:  $F_{(2,41)}=0.2$ ,  $P > 0.05$ , PAS:  $F_{(2,41)}=0.3$ ,  $P > 0.05$ ). A análise da PAS ( $F_{(2,41)}=5$ ,  $P < 0.01$ ), porém não da PAM ( $F_{(2,41)}=0.4$ ,  $P > 0.05$ ) e PAD ( $F_{(2,41)}=0.2$ ,  $P > 0.05$ ), indicou interação entre os fatores linhagem e estresse.

O ERR aumentou os valores basais de FC nas ratas normotensas ( $P < 0.001$ ) e SHR ( $P < 0.05$ ) (Figura 13). A análise da FC basal indicou efeito do estresse ( $F_{(2,41)}=12$ ,  $P < 0.0001$ ) e da linhagem ( $F_{(1,41)}=9$ ,  $P < 0.003$ ), porém sem interação entre os fatores estresse e linhagem ( $F_{(2,41)}=1$ ,  $P > 0.05$ ).



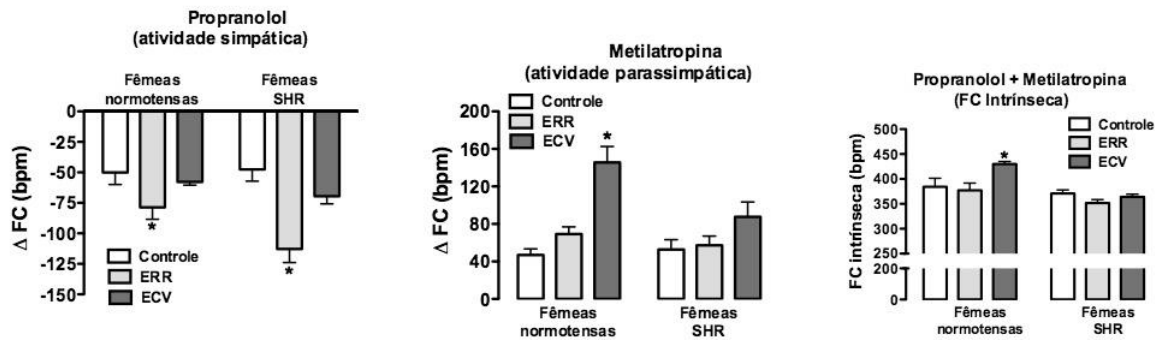
**Figura 13-** Valores basais de pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em fêmeas normotensas e SHR após os 10 dias de exposição aos protocolos de estresse crônico variável (ECV) ou estresse por restrição repetido (ERR). Os dados são apresentados com média  $\pm$  EPM (n= 7-9 animais por grupo). \*P<0.05 quando comparado com o grupo controle da mesma linhagem, #P<0.05 quando comparado com o respectivo grupo normotenso. ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.3.4. Efeito do estresse crônico sobre a atividade simpática e parassimpática cardíaca e a frequência cardíaca intrínseca em fêmeas normotensas e fêmeas SHR

O efeito do tratamento intravenoso (i.v.) com propranolol (antagonista de adrenoceptores  $\beta$ ) e/ou metilatropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos) sobre a FC é mostrado na Figura 14. O ERR aumentou a variação da FC ( $\Delta$ FC) induzida pela administração i.v de propranolol (atividade simpática) nas ratas normotensas ( $P < 0.05$ ) e SHR ( $P < 0.001$ ). A análise estatística indicou efeito do estresse ( $F_{(2,41)}=15$ ,  $P < 0.01$ ), porém sem influência da linhagem ( $F_{(1,41)}=3$ ,  $P > 0.05$ ) e interação entre os fatores estresse e linhagem ( $F_{(2,41)}=2$ ,  $P > 0.05$ ).

O ECV aumentou a  $\Delta$ FC induzida pela administração i.v. metilatropina (atividade parassimpática) nas ratas normotensas ( $P < 0.001$ ). A análise indicou efeito do estresse ( $F_{(2,41)}=18$ ,  $P < 0.0001$ ), da linhagem ( $F_{(1,41)}=5$ ,  $P < 0.03$ ) e interação entre estresse e linhagem ( $F_{(2,41)}=4$ ,  $P < 0.02$ ).

O ECV aumentou os valores de FC após o tratamento combinado com propranolol e metilatropina (FC intrínseca) nas ratas normotensas ( $P < 0.05$ ). A análise indicou efeito do estresse ( $F_{(2,41)}=5$ ,  $P < 0.01$ ) e da linhagem ( $F_{(1,41)}=15$ ,  $P < 0.0004$ ), porém sem interação entre os fatores estresse e linhagem ( $F_{(2,41)}=3$ ,  $P < 0.05$ ).

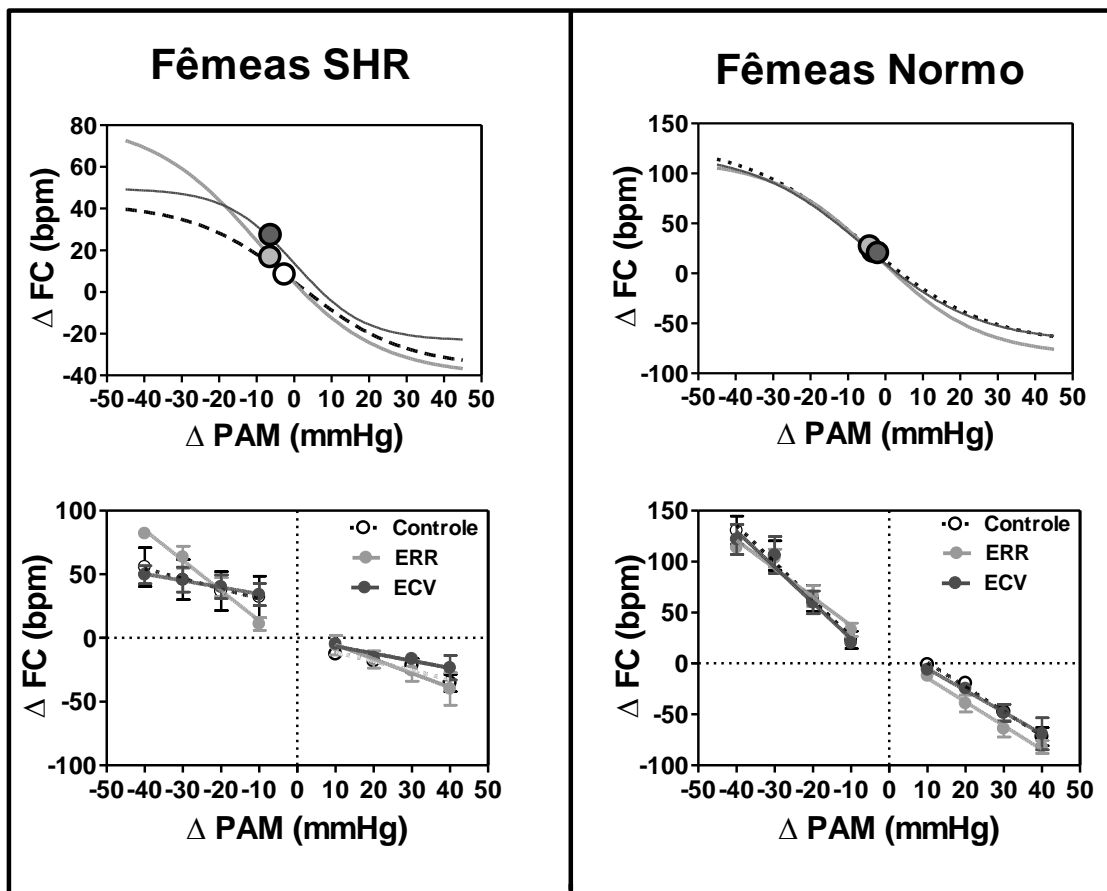


**Figura 14** - Variação da frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) induzida pela administração intravenosa de propranolol (antagonista de adrenoceptores  $\beta$ , atividade simpática) ou metilotropina (antagonista de receptores colinérgicos muscarínicos, atividade parassimpática) e frequência cardíaca observada após a administração combinada de metilotropina e propranolol intrínseca (FC intrínseca) em fêmeas normotensas e SHR submetidas aos protocolos de estresse crônico variável (ECV) ou estresse de restrição repetido (ERR). Os dados são apresentados com média  $\pm$  EPM ( $n = 7-9$  animais por grupo) \* $P < 0.05$  quando comparado com o grupo controle da mesma linhagem, # $P < 0.05$  quando comparado com o respectivo grupo normotenso. ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.

5.3.5. Efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo em fêmeas normotensas e fêmeas SHR

A Figura 15 e a Tabela 6 apresentam os resultados das análises de regressão não-linear e linear do barorreflexo. A análise de regressão não-linear do barorreflexo indicou valores menores de P1 ( $P < 0.05$ ), P2 ( $P < 0.05$ ), variação da FC ( $P < 0.05$ ) em todos os grupos de ratas SHR, em relação aos respectivos grupos normotensas. Os valores de ganho das ratas SHR dos grupos controle ( $P < 0.05$ ) e ERR ( $P < 0.05$ ) também foram menores em relação aos respectivos grupos de ratas normotensas. Além disso, o ERR aumentou os valores de P<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ) e variação da FC ( $P < 0.05$ ) nas ratas SHR.

A análise de regressão linear foi utilizada para análise individual da atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor da pressão arterial. Esta análise indicou que as fêmeas SHR de todos os grupos experimentais apresentaram valores de ganho menores para as respostas de taquicardia (controle:  $P < 0.05$ , ERR:  $P < 0.05$ , ECV:  $P < 0.05$ ) e bradicardia reflexas (controle:  $P < 0.05$ , ERR:  $P < 0.05$ , ECV:  $P < 0.05$ ), quando comparadas com os respectivos grupos normotensas. Além disso, o ERR aumentou o ganho da resposta de taquicardia nas ratas ERR ( $P < 0.05$ ).



**Figura 15** - Análise de regressão não-linear (gráficos superiores) e linear (gráficos inferiores) do barorreflexo correlacionando variações de pressão arterial média ( $\Delta PAM$ ) e a resposta reflexa de frequência cardíaca ( $\Delta FC$ ) em fêmeas normotensas e SHR submetidas ao estresse de restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). Símbolos nas curvas sigmóides indicam a PA50. Círculos representam a média e as barras o erro padrão da média nas curvas de regressão linear.

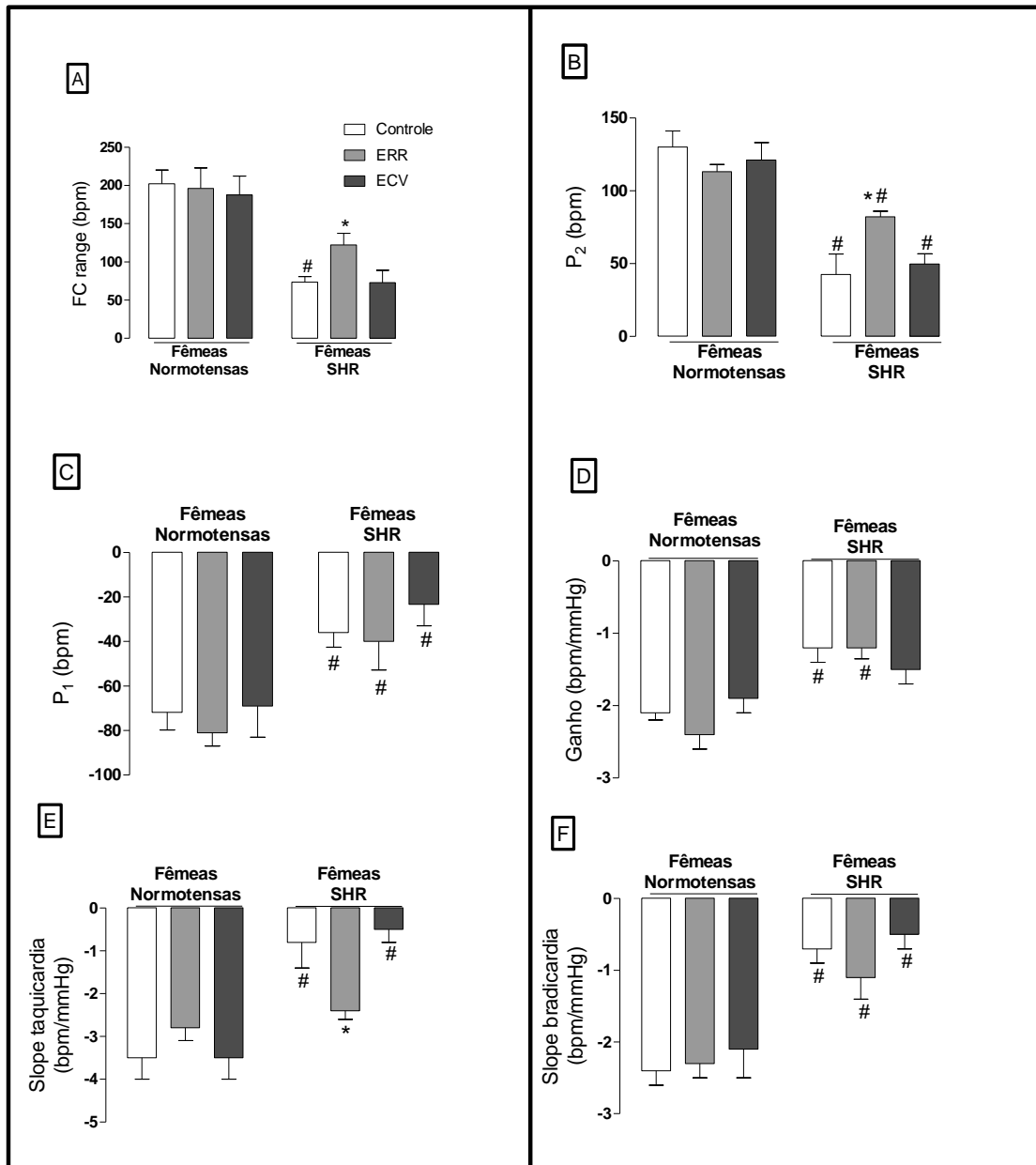
**Tabela 6** - Parâmetros derivados da análise de regressão não-linear (Ganho, P1, P2, variação da FC e PA<sub>50</sub>) e linear (ganho bradicardia e ganho taquicardia) do barorreflexo em fêmeas normotensas e SHR submetidas ao protocolo de 10 dias de estresse por restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV).

Grupo	Ganho (bpm/mmHg)	P <sub>1</sub> (bpm)	P <sub>2</sub> (bpm)	Variação da FC (bpm)	PA <sub>50</sub> (mmHg)	Ganho bradicardia (bpm/mmHg)	Ganho taquicardia (bpm/mmHg)
<b>Fêmeas Normo</b>							
Controle	-2.1±0.1	-71±8	130±11	202±17	-3±2	-2.4±0.2	-3.7±0.4
ERR	-2.4±0.2	-81±6	112±5	196±12	-3±1	-2.3±0.2	-2.8±0.3
ECV	-1.9±0.2	-69±11	121±12	187±24	-2±3	-2.1±0.4	-3.5±0.5
<b>Fêmeas SHR</b>							
Controle	-1.2±0.1 <sup>#</sup>	-36±3 <sup>#</sup>	42±16 <sup>#</sup>	74±17 <sup>#</sup>	-1±2	-0.7±0.2 <sup>#</sup>	-0.8±0.6 <sup>#</sup>
ERR	-1.2±0.2 <sup>#</sup>	-40±6 <sup>#</sup>	82±5 <sup>#*</sup>	122±12 <sup>#*</sup>	-6±1	-1.1±0.2 <sup>#</sup>	-2.4±0.2
ECV	-1.5±0.2	-23±8 <sup>#</sup>	50±12 <sup>#</sup>	73±14 <sup>#</sup>	-6±3	-0.5±0.4 <sup>#</sup>	-0.5±0.3 <sup>#</sup>
<i>Interação</i>	$F_{(2,32)}=2.4$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=0.12$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=4$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=1.1$ $P<0.05$	$F_{(2,27)}=0.4$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=0.5$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=5.6$ $P>0.05$
<i>Estresse</i>	$F_{(2,32)}=0.3$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=1.04$ $P>0.05$	$F_{(2,32)}=0.9$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=1.2$ $P>0.05$	$F_{(2,27)}=0.18$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=1.1$ $P>0.05$	$F_{(2,30)}=1.1$ $P>0.05$
<i>Linhagem</i>	$F_{(1,30)}=30.6$ $P<0.0001$	$F_{(1,30)}=25$ $P<0.0001$	$F_{(1,32)}=55$ $P<0.0001$	$F_{(1,30)}=46$ $P<0.0001$	$F_{(1,27)}=0.25$ $P>0.05$	$F_{(1,30)}=50$ $P<0.0001$	$F_{(1,30)}=34.5$ $P<0.0001$

Valores expressos como média ± EPM

\* P<0.05 vs grupo controle. # P<0.05 vs respectivo grupo fêmea.

ANOVA bifatorial acompanhado do pós-teste de Bonferroni.



**Figura 16** - Parâmetros usados para a análise da atividade do barorreflexo correlacionando variações de pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e a resposta reflexa de frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) em fêmeas normotensas e SHR submetidas ao estresse de restrição repetido (ERR) ou estresse crônico variável (ECV). (A) variação da FC diferença entre P1 e P2; (B) platô máximo da FC (P<sub>2</sub>); (C) platô mínimo da FC (P<sub>1</sub>); (D) Ganho, inclinação da porção linear da curva; (E) Inclinação da curva provocada pelo aumento da FC; (F) Inclinação da curva provocada pela diminuição da FC.



## 6. DISCUSSÃO

Os resultados referentes a comparação dos efeitos do ERR e do ECV em machos e fêmeas (*experimentos 1 e 2*), bem como a comparação dos efeitos dos estressores crônicos em fêmeas normotensas e fêmeas SHR (*experimento 3*) são sumarizados na Tabela 7.

**Tabela 7** - Sumário dos efeitos da exposição ao ERR ou ao ECV em machos e fêmeas normotensos e em fêmeas SHR.

Exposição ao estresse		Machos		Fêmeas normotensas		Fêmeas SHR	
		ERR	ECV	ERR	ECV	ERR	ECV
<b>Parâmetros somáticos</b>	<i>Peso corporal</i> #§	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	<i>Peso coração</i>	--	--	--	↑	--	--
	<i>Peso adrenal</i> #	--	↑	↑	↑	--	--
	<i>Peso timo</i> §	--	--	--	--	↑	↑
<b>Eixo HPA</b>	<i>Corticosterona</i> §	--	--	↑	↑	↑	↑
<b>Cardiovascular basal</b>	<i>Pressão arterial</i> #§	--	--	--	--	--	--
	<i>FC</i> #	↑	↑	↑	--	↑	--
<b>Atividade autonômica</b>	<i>Atividade simpática cardíaca</i> #	↑	↑	↑	--	↑	--
	<i>Atividade parassimpática cardíaca</i> #	--	--	--	↑	--	--
	<i>FC intrínseca</i>	--	--	--	↑	--	--
	<i>Bradicardia reflexa</i> #§	↓	↓	--	--	--	--
	<i>Taquicardia reflexa</i> #§	--	↑	--	--	↑	--
<b>Função vascular</b>	<i>Resposta pressora da fenilefrina</i>	--	--	--	--	NA	NA
	<i>Resposta depressora da Acetilcolina</i> #	--	↓	↑	↑	NA	NA
	<i>Efeito depressor do NPS</i>	↑	--	↓	↓	NA	NA
<b>Comportamento</b>	<i>Ansiedade</i> #	--	--	↑	↑	NA	NA

Setas para cima e para baixo indicam aumento e redução, respectivamente.

# - dimorfismo sexuais no grupo controle.

§ - diferenças entre ratas normotensas e SHR no grupo controle.

NA – parâmetro não-avaliado.

Além dos efeitos dos protocolos de estresse crônico sobre a atividade cardiovascular e autonômica, a comparação dos animais controle evidenciou importantes dimorfismos sexuais. Por exemplo, a FC basal foi maior nas fêmeas quando comparadas com os animais machos. Esse efeito foi acompanhado de uma menor atividade parassimpática e uma maior atividade simpática cardíaca em fêmeas. Nossos resultados estão de acordo com dados clínicos e pré-clínicos, nos quais tem reportado que mulheres e ratas normotensas possuem valores maiores de FC basal quando comparadas com seus pares machos (MARIS et al, 2005; JOHNSON et al, 2011). Dados clínicos acerca do balanço autonômico cardíaco obtidos através da análise da variabilidade da FC indicaram valores menores em mulheres de parâmetros relacionados com a atividade parassimpática (por exemplo: RMSSD e pNN50) (STEIN et al, 1997; SMETANA; MALIK, 2013), apesar de alguns parâmetros obtidos nesta análise (por exemplo: variabilidade de baixa frequência e alta frequência) não se correlacionarem com a taquicardia de repouso observada em mulheres (SMETANA; MALIK, 2013). Nossos resultados também são suportados por dados pré-clínicos demonstrando que fêmeas possuem valores maiores em parâmetros da análise de variabilidade da FC relacionados com a atividade simpática cardíaca (variabilidade de baixa frequência), ao passo que parâmetros associados com a atividade parassimpática (variabilidade de alta frequência) são menores (JOHNSON et al, 2011). Valores elevados de FC e diferenças no balanço autonômico cardíaco no sentido de um aumento da contribuição simpática tem sido considerado um fator de risco para o surgimento de diversas patologias cardiovasculares (DYER, 1980; CARNEY et al, 1993; PALATINI et al, 1997). Deste modo, apesar dos diversos efeitos protetores dos hormônios ovarianos (em especial estrogênio) na função cardíaca e vascular (DUBEY et al, 2002; KNOWLTON; LEE, 2012), dimorfismos sexuais no balanço autonômico cardíaco e na FC basal pode constituir um fator de risco cardiovascular em mulheres.

A comparação dos animais controle também evidência importantes diferenças entre as ratas normotensas e as ratas SHR (*Experimento 3*). Como esperado, nós observamos que as

fêmeas SHR apresentaram valores maiores de PAM, bem como de PAS e PAD, quando comparadas às ratas normotensas. Esses resultados estão de acordo com evidências de que animais SHR começam a desenvolver hipertensão arterial com 5 semanas de vida, já apresentando valores de pressão arterial significativamente elevados a partir da 7ª semana de vida (YAMORI et al, 1984). Com relação aos valores basais de FC, nós não identificamos diferenças significativas entre os grupos controle normotenso e hipertenso. Contrário ao dado consistente de hipertensão observado nos animais SHR, diferenças nos valores basais de FC em animais normotensos e SHR são controversos. Por exemplo, alguns autores reportaram que a hipertensão é acompanhada de aumento da FC basal, na qual foi relacionada a um aumento na atividade simpática e diminuição da atividade parassimpática cardíaca (MASSON et al, 2014; CHAAR et al, 2015; MASSON et al, 2015); ao passo que outros estudos não identificaram diferenças na FC basal e na atividade autonômica em ratos SHR comparados com animais normotensos (TAMARGO et al, 1995; PONTIERI et al, 1998; MCDUGALL et al, 2000; VAN DEN BUUSE et al, 2001; BLANCO et al, 2015). Os dados de estudos que compararam fêmeas normotensas e SHR também são inconsistentes. Alguns autores reportaram valores maiores de FC basal nas ratas SHR comparadas com ratas normotensas, no qual foi relacionado com valores elevados de atividade simpática e reduzidos de atividade parassimpática para o coração (DIAS et al, 2010); porém outros estudos não identificaram diferenças na FC basal de ratas Wistar e SHR (AZAR et al, 2012; SHIMOJO et al, 2015). Deste modo, os resultados reportados no presente relatório são consistentes com evidências prévias de que a hipertensão em ratas SHR não é acompanhada de alterações na FC basal e na atividade autonômica cardíaca (AZAR et al, 2012; SHIMOJO et al, 2015).

Abaixo é apresentada discussão das alterações fisiológicas, somáticas e comportamentais induzidas pelos estressores crônicos em termos da influência do tipo de estresse, de dimorfismos sexuais e da hipertensão. O envolvimento de alterações na atividade

do barorreflexo e na responsividade vascular a agentes vasoativos nas respostas cardioasculares aos estressores crônicos é discutida na última sessão.

### **6.1. Influência do tipo de estresse**

Resultados obtidos em ratos têm demonstrado que as respostas somáticas (por exemplo: hipertrofia da glândula adrenal e atrofia do timo) e as alterações na atividade do eixo HPA são observados principalmente após a exposição a protocolos de ECV, ao passo que protocolos que envolvem a exposição repetida ao mesmo estressor (isto é, homotípico) afetam minimamente estes parâmetros (MAGARINOS; MCEWEN, 1995; MARIN et al, 2007; KOPP et al, 2013). Essas diferenças parecem decorrer, ao menos em parte, do processo de habituação durante a exposição repetida ao mesmo estressor (HERMAN, 2013; CRESTANI, 2016). Estes resultados suportam os nossos dados indicando que somente o ECV aumentou o peso das adrenais nos machos. Entretanto, nenhum dos protocolos de estresse afetaram os níveis de corticosterona plasmática nos machos. Nossos resultados corroboram com dados da literatura indicando ausência de efeito do ECV e do ERR sobre os níveis basais de corticosterona plasmática (GRIPPO et al, 2005; FLAK et al, 2011; JANKORD et al, 2011; HERMAN, 2013). Com relação à influência dos protocolos de estresse crônico sobre o ganho de peso corporal, apesar de alguns estudos identificarem um impacto maior do ECV versus o ERR (MARIN et al, 2007; GAO et al, 2016), vários estudos demonstraram que o ECV e o ERR reduzem de maneira similar o ganho de peso corporal (MAGARIÑOS; MCEWEN, 1995; VYAS et al., 2002; FLAK et al., 2012; YOON et al.,2014; DUARTE et al.,2015), nos quais suportam os achados reportados no presente estudo.

Quanto a influência dos protocolos de estresse em fêmeas, nossos achados indicando hipertrofia da adrenal e aumento na concentração plasmática de corticosterona causados por ambos os protocolos de estresse crônico contrastam com a ideia de habituação discutida acima. Entretanto, é importante destacar que as evidências de diferenças no impacto de

protocolos de estresse crônico homotípico e heterotípico sobre parâmetros somáticos e a atividade do eixo HPA foram obtidos em machos. Nesse sentido, foi demonstrado que a habituação do eixo HPA durante a exposição repetida ao mesmo estressor é reduzida em fêmeas (GALEA et al, 1998; CHADDA; DEVAUD, 2005; DOREMUS-FITZWATER et al, 2009), o que pode explicar os nossos dados evidenciando elevação dos níveis basais da corticosterona em fêmeas após o ERR. Além disso, uma redução em mecanismos centrais de retroalimentação negativa do eixo HPA (XING et al, 2013) e hiperresponsividade do eixo HPA durante situações aversivas em fêmeas (HANDA et al, 1994; MITSUSHIMA et al 2003; KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2005) também podem contribuir para a elevação nos níveis basais de corticosterona em fêmeas.

Tem sido demonstrado uma elevação da FC basal em animais machos após a exposição a protocolos de ECV, na qual é mediada por aumento tônus simpático cardíaco (GRIPPO et al, 2002 e 2003; DUARTE et al, 2015). Deste modo, a elevação da FC basal decorrente de aumento na atividade simpática cardíaca nos animais machos submetidos ao ECV está de acordo com estudos anteriores. No entanto, nós observamos aumento da FC basal tanto nos machos quanto nas fêmeas após a exposição ao ERR. Uma ampla revisão da literatura não encontrou evidências consistentes de habituação das repostas cardiovasculares ao estresse repetido (CRESTANI, 2016). As evidências de ausência de habituação das repostas cardiovasculares suportam os resultados reportados no presente estudo indicando um impacto do ERR sobre a FC basal e a atividade simpática cardíaca. Os nossos dados também corroboram com estudos prévios que identificaram disfunções cardiovasculares e na atividade autonômica após a exposição ao ERR (DAUBERT et al, 2012; YANG et al, 2014; BRUDER-NASCIMENTO et al, 2014; DUARTE et al, 2015; HABIB et al, 2015; COSTA-FERREIRA et al, 2016).

## 6.2. Influência de dimorfismos sexuais

Além das características do agente estressor, as complicações relacionadas ao estresse também dependem das características do indivíduo. Deste modo, tem sido proposto que os efeitos do estresse podem também depender do gênero, traços de personalidade e estilo de vida (ZELENA et al., 1999; SGOIFO et al, 2014). Com relação a influência do gênero, os hormônios sexuais podem determinar como o organismo processa os estímulos, e provavelmente estão envolvidos nas diferenças entre homens e mulheres na incidência de doenças relacionadas ao estresse (KUDIELKA et al., 2000). Sendo assim, além dos efeitos dos protocolos de estresse crônico sobre a atividade cardiovascular e autonômica, os resultados obtidos nos *Experimentos 1 e 2* comparando animais controle evidenciou importantes dimorfismos sexuais. Além disso, os resultados obtidos nesses experimentos demonstraram uma influência do dimorfismo sexual nos efeitos do estresse sobre parâmetros somáticos, neuroendócrinos e cardiovasculares.

Os resultados obtidos no *Experimento 1* evidenciaram que apesar do ECV e o ERR reduzirem o ganho de peso corporal nos machos, este parâmetro não foi afetado por nenhum dos protocolos de estresse crônico nas fêmeas. Apesar das evidências de um impacto do estresse crônico sobre o peso corporal de fêmeas (XU et al, 2010; DOREMUS-FITZWATER et al, 2009), os nossos dados corroboram com estudos prévios demonstrando que tanto o ECV quanto o ERR reduzem o ganho de peso corporal somente nos machos (DUNCKO et al, 2001; WESTENBROEK et al, 2003; DALLA et al, 2005; XING et al, 2013). As razões para este dimorfismo sexual não está elucidado. No entanto, é importante notar que o ganho de peso corporal é reduzido nas fêmeas, de modo que os valores nas fêmeas controle são similares àqueles observados em machos submetidos aos protocolos de estresse crônico. Deste modo, dimorfismos sexuais no ganho de peso corporal podem explicar, ao menos em parte, a ausência de efeito dos protocolos de estresse crônico sobre o peso corporal nas fêmeas. Além disso, estudos investigando os efeitos de protocolos de estresse crônico em machos e fêmeas

tem reportado hipertrofia da adrenal e atrofia do timo somente em machos (WESTENBROEK et al, 2003; TOTH et al, 2008; XU et al, 2010), assim suportando nossos achados obtidos no Experimento 1 que indicaram uma hipertrofia da adrenal somente nos animais machos.

De maneira oposta ao observado no peso corporal, nós observamos que os protocolos de estresse crônico elevaram os níveis plasmáticos de corticosterona e aumentaram os comportamentos relacionados à ansiedade somente nas fêmeas. Nossos resultados estão de acordo com evidências da literatura indicando uma vulnerabilidade de fêmeas para os efeitos comportamentais e neuroendócrinos decorrentes da exposição ao estresse crônico (DALLA et al, 2005; XING et al, 2013). Com relação aos efeitos sobre os níveis basais de corticosterona plasmática, apesar de alguns resultados indicarem ausência de efeito do estresse crônico sobre os níveis basais deste hormônio em fêmeas (DUNCKO et al, 2001; GRIPPO et al, 2004), estudos comparando os efeitos em animais machos e fêmeas tem demonstrado que o estresse crônico aumenta os níveis basais de corticosterona somente em fêmeas (DALLA et al, 2005; XING et al, 2013). Um estudo reportou ainda redução nos níveis basais de corticosterona em machos após a exposição a um protocolo de ECV, sem identificar alterações significativas em fêmeas, assim reforçando a ideia de uma vulnerabilidade de fêmeas (REICH et al, 2009). Tem sido demonstrado que a habituação do eixo HPA durante a exposição repetida ao mesmo estressor é reduzida em fêmeas (GALEA et al, 1998; CHADDA; DEVAUD, 2005; DOREMUS-FITZWATER et al, 2009), o que pode explicar os nossos dados evidenciando elevação da corticosterona em fêmeas após o ERR. Além disso, uma redução em mecanismos centrais de retroalimentação negativa do eixo HPA (XING et al, 2013) e a hiperresponsividade do eixo HPA durante situações aversivas (HANDA et al, 1994; MITSUSHIMA et al 2003; KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2005) também podem contribuir para a elevação nos níveis basais de corticosterona em fêmeas.

Com relação aos efeitos comportamentais, nossos resultados também indicaram uma possível vulnerabilidade das fêmeas submetidas aos protocolos de estresse. Nossos dados



estão de acordo com evidências anteriores de efeito ansiogênico identificada nos testes do LCE e CA apenas em fêmeas após exposição ao ERR e ECV (HUYNH et al., 2011; LU et al., 2015). No entanto, foram relatados dados contrastantes sobre dimorfismos sexuais no impacto do ECV e do ERR em comportamentos do tipo ansiogênico. Por exemplo, foram relatados efeitos do tipo ansiogênico no LCE nos machos que foram submetidos ao ERR (BOWMAN et al., 2009; NOSCHANG et al., 2009). As diferenças no protocolo de estresse podem explicar a discrepância com os achados do presente estudo, já que a duração das sessões (6h vs 1h) (BOWMAN et al., 2009) ou a duração do protocolo (50 dias vs 10 dias) (NOSCHANG et al., 2009) foram maiores do que no presente estudo. No entanto, também foi relatada uma diminuição semelhante na exploração de braços abertos do LCE em machos e fêmeas após a exposição a um protocolo de ECV (DALLA et al., 2005), bem como ausência de alterações nos comportamentos no CA após a exposição ao ERR (ALBONETTI; FARABOLLINI, 1992; NOSCHANG et al 2009, PERROT-SINAL et al., 2004).

Tem sido demonstrado que a ativação simpática e as alterações cardiovasculares durante situações agudas de estresse são mais pronunciadas em fêmeas do que em animais machos (WEINSTOCK et al, 1998; EIKELIS VAN DEN BUUSE, 2000; ANISHCHENKO et al, 2007). Um estudo recente comparou os efeitos do ECV sobre a reatividade vascular a agentes vasoativos *in vitro* em animais machos e fêmeas (STANLEY et al, 2014). Entretanto, do nosso conhecimento, os resultados apresentados no presente estudo são os primeiros a evidenciar um efeito da exposição a protocolos de estresse crônico sobre parâmetros basais de pressão arterial e FC, bem como sobre a atividade autonômica em fêmeas. Nossos resultados demonstraram que apesar das fêmeas (controle) apresentarem FC basal maior do que os machos (controle), o ERR causou uma elevação adicional da FC nos animais fêmeas, o que pode evidenciar uma vulnerabilidade destes animais aos efeitos cardiovasculares do estresse crônico. Entretanto, apesar do ECV aumentar a FC basal em machos, nós não identificamos um efeito significativo deste protocolo de estresse sobre a função cardiovascular em fêmeas.

Estes dados corroboram com resultados recentes de Stanley e colaboradores (2014), que relataram que as alterações induzidas pelo ECV na reatividade vascular *in vitro* a agentes vasoconstritores e vasodilatadores foi menos pronunciada em fêmeas comparadas com os machos. Apesar de não ter sido investigado diretamente, os autores atribuíram essas diferenças entre machos e fêmeas às influências distintas entre gêneros dos hormônios sexuais sobre a função cardiovascular. Neste sentido, nossos resultados indicam que mecanismos protetores presentes em fêmeas e ativados pelo ECV parecem não serem efetivos durante a exposição repetido ao mesmo estressor, assim levando ao desenvolvimento de alterações cardiovasculares e autonômicas.

Em conjunto, nossos resultados indicam uma influência do gênero nos efeitos do estresse sobre os parâmetros somáticos, a atividade neuroendócrina e comportamentos relacionados à ansiedade; no qual parece independe do tipo de estresse. Neste sentido, as fêmeas parecem ser mais suscetíveis aos efeitos do estresse crônico sobre a atividade basal do eixo HPA e os comportamentos relacionadas à ansiedade. Entretanto, os dados indicam uma influência de dimorfismos sexuais nas alterações cardiovasculares a estressores crônicos, nos quais parecem estar relacionados com uma influência do tipo de estresse. Nesse sentido, nós não identificamos diferenças nos efeitos cardiovasculares causados pelos dois estressores crônicos nos animais machos; porém as fêmeas parecem sensíveis aos efeitos de estressores homotípicos.

### **6.3. Influência da hipertensão**

Além da influência do gênero, outra características individual que pode afetar as alterações causadas pelo estresse é a presença de doenças cardiovasculares pré-existentes. Nesse sentido, dados clínicos e pré-clínicos sugerem que a hipertensão pode influenciar a

incidência de complicações causadas pelo estresse. Por exemplo, foi reportado previamente que pacientes hipertensos, com ou sem tratamento, parecem reagir mais intensamente ao estresse do que seus pares normotensos (LIMA et al, 2010). Resultados de estudos pré-clínicos comparando ratos normotensos e SHR também consistentemente demonstraram que as respostas cardiovasculares (MCCARTY, 1983; CASTRO; PRINTZ, 1990; KNARDAHL ; HENDLEY, 1990; ZHANG e THOREN, 1998; VAN DEN BUUSE et al, 2001; MCDOUGALL et al, 2000, 2005) e a ativação do eixo HPA (KVETNANSKY et al, 1979; SUDO; MIKI, 1993; GOMES et al, 1998; IMAKI et al, 1998; DURAND et al, 1999; ROMAN et al, 2004; DJORDJEVIC et al, 2007) foram mais pronunciadas nos animais SHR. Apesar desses dados indicarem que a hipertensão pode estar relacionada com uma vulnerabilidade aos efeitos do estresse, evidências sobre as consequências da exposição a protocolos de estresse crônico sobre a função cardiovascular em animais hipertensos são escassas. Além disso, a maior parte dos estudos pré-clínicos foram realizados em animais machos. De fato, os resultados obtidos no presente estudo são os primeiros a fornecer evidências da influência do ECV e do ERR sobre parâmetros somáticos, neuroendócrinos e cardiovasculares em fêmeas SHR.

Os resultados obtidos no *Experimento 3* indicaram que ambos os protocolos de estresse crônico reduziram o ganho de peso corporal tanto nas ratas normotensas quanto nas ratas SHR. Apesar do impacto dos estressores no ganho de peso corporal ter sido similar nas ratas SHR e nas ratas normotensas, o efeito do ECV e do ERR foi identificado anteriormente (no dia 5 do protocolo experimental) nas ratas hipertensas em relação às ratas normotensas (efeito identificado somente no dia 10), o que pode indicar uma vulnerabilidade das ratas SHR para os efeitos do estresse crônico sobre o peso corporal. Estudos anteriores identificaram redução similar no ganho de peso corporal e na ingestão alimentar em animais machos normotensos e SHR expostos por 14 dias ao estresse de imobilização (GOMES et al, 1996), o que suporta os nossos achados, além de indicar que o efeito similar de estressores

homotípicos sobre o peso corporal em animais SHR e normotensos parece independe do gênero. Entretanto, os efeitos do estresse sobre o peso corporal em ratos SHR parece depender do paradigma de estresse, já que a redução do peso corporal causado pelo estresse de derrota social foi menor em ratos SHR relativo a ratos normotensos (BERTON et al, 1997), ao passo que o efeito do estresse de aglomeração (espaço individual por animal na caixa moradia reduzido) foi mais pronunciado nos ratos SHR (SLEZAK et al, 2014). Do nosso conhecimento, os nossos dados são os primeiros a investigar os efeitos de protocolos de ECV em animais SHR.

Os nossos achados de hipertrofia da glândula adrenal seletivamente em ratas normotensas corroboram com evidências de estudos que investigaram os efeitos do estresse de imobilização repetido e do estresse de derrota social (GOMES et al, 1996; BERTON et al, 1997), nos quais identificaram alterações na glândula adrenal após a exposição a esses estressores somente em animais normotensos. O aumento do peso do timo nas ratas SHR foi inesperado, já que o aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona é esperado causar atrofia do timo. Esse efeito pode estar relacionado com os valores reduzidos de peso do timo observados nas ratas SHR em relação aos animais normotensos. Entretanto, as diferenças no peso do timo entre animais SHR e normotensos, bem como os efeitos do estresse sobre esse parâmetro somático, podem ser influenciados pelo gênero. Nesse sentido, Berton et al (1997) reportaram valores maiores de peso do timo em animais machos SHR versus normotensos, e o estresse de derrota social não afetou essa medida em nenhuma das linhagens de ratos (BERTON et al, 1997). De qualquer modo, estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos relacionados com as respostas no peso do timo identificadas no presente estudo.

Ambos os protocolos de estresse aumentaram os níveis plasmáticos de corticosterona tanto nas ratas normotensas quanto nas ratas SHR. Apesar dos valores maiores de corticosterona observado nas ratas SHR, o aumento causado pelos protocolos de estresse nas ratas normotensas e SHR foi similar (aumento de 26ug/dl nas ratas normotensas ECV e ERR;

aumento de 37ug/dl e 32ug/dl nas ratas SHR ECV e ERR, respectivamente). Do nosso conhecimento, os resultados reportados no presente estudo são os primeiros a indicarem uma influência do ECV e do ERR sobre os níveis plasmáticos de corticosterona em animais SHR. Entretanto, foi reportado previamente que o aumento nos níveis plasmáticos basais de corticosterona causado pela exposição diária por 8 semanas a um ambiente novo ou ao exercício em esteira, bem como por 14 dias ao estresse de imobilização, foi maior em ratos SHR relativo a ratos normotensos (GOMES et al, 1996; DUCLOS et al, 2001). Além disso, outros estudos comparando animais normotensos e SHR não identificaram efeito nos níveis basais de corticosterona após 7 sessões de derrota social, 14 dias de estresse de aglomeração ou 21 dias de isolamento social em nenhuma das linhagens (BERTON et al, 1997; DJORDJEVIC et al, 2007; SLEZAK et al, 2014). Em conjunto com os achados reportados no presente estudo, esses resultados sugerem que o efeito do estresse sobre os níveis basais de corticosterona em animais SHR está relacionado com o tipo de estressor crônico. Entretanto, nós não podemos excluir a possibilidade que as diferenças com relação aos resultados do nosso estudo decorram de dimorfismos sexuais, uma vez que com exceção do trabalho de Slezak et al (2014), todos os outros estudos anteriores investigaram os efeitos dos estressores em animais SHR machos (GOMES et al, 1996; BERTON et al, 1997; DUCLOS et al, 2001; DJORDJEVIC et al, 2007).

Estudos prévios consistentemente demonstraram que as respostas cardiovasculares observadas durante a exposição a sessões agudas de estresse são mais pronunciadas em animais SHR relativos a animais normotensos (MCCARTY, 1983; CASTRO; PRINTZ, 1990; KNARDAHL; HENDLEY, 1990; ZHANG; THOREN, 1998; VAN DEN BUUSE et al, 2001; MCDOUGAL et al, 2000, 2005). Entretanto, os efeitos da exposição a protocolos de estresse crônico sobre a função cardiovascular e a atividade autônoma basais em animais SHR ainda são pouco compreendidos. Nós observamos que o ERR aumentou a FC basal e a atividade simpática tanto nas ratas normotensas quanto nas ratas SHR, ao passo que o ECV não afetou

esses parâmetros em nenhuma das linhagens de ratas. Esses resultados contrastam com estudos prévios que compararam ratos SHR e normotensos, nos quais não identificaram alteração na pressão arterial e FC basal após a exposição a 10 sessões diárias de estresse de restrição (MCDOUGALL, 2000, 2005). Uma possibilidade seria uma possível influência do gênero nos efeitos do ERR sobre a função cardiovascular e a atividade autônoma, já que os estudos anteriores foram conduzidos em animais machos (MCDOUGALL, 2000, 2005). De fato, os nossos dados são os primeiros a investigar o efeito do ERR e do ECV em fêmeas SHR. De qualquer modo, estudos futuros comparando animais SHR machos e fêmeas são necessários para elucidar possíveis dimorfismos sexuais nos efeitos cardiovasculares de estressores crônicos nessa linhagem.

#### **6.4. Mecanismo das alterações cardiovasculares provocadas pelo estresse:**

##### **barorreflexo e resposta vascular a agentes vasoativos**

###### 6.4.1 Alterações na atividade do barorreflexo

No presente estudo nós avaliamos um possível envolvimento de alterações na atividade barorreflexa nas alterações cardiovasculares induzidas pelo ERR e o ECV. Tem sido demonstrado redução na atividade barorreflexa em indivíduos com hipertensão essencial, bem como em modelos experimentais de hipertensão (BRISTOW et al, 1969; IRIGOYEN & KRIEGER, 1998). Além disso, alterações neste mecanismo reflexo parece ser um fator de risco para o desenvolvimento de arritmias e morte súbita em diversas patologias cardiovasculares (FARRELL et al, 1991; TAKASE et al, 1992). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que tanto o ERR quanto o ECV reduziram a bradicardia reflexa durante aumentos da pressão arterial induzidos pela infusão intravenosa de fenilefrina nos animais machos. Além disso, nós observamos que a resposta taquicárdica reflexa desencadeada por reduções na pressão arterial induzida pela infusão intravenosa de NPS foi aumentada pelo ECV nos machos normotensos e pelo ERR nas fêmeas SHR. Os resultados do

ECV nos animais machos corroboram com estudos anteriores do nosso grupo (ALMEIDA et al, 2015; DUARTE et al, 2015). Entretanto, nossos achados contrastam com resultados de Grippo e colaboradores (2008), que reportaram ausência de alteração nas respostas de FC do barorreflexo após exposição a um protocolo de ECV em ratos. Entretanto, a discrepância pode estar relacionada com diferenças no protocolo experimental, uma vez que o protocolo de ECV usado por Grippo e colaboradores (2008) foi mais longo (4 semanas) do que aquele empregado no presente estudo (10 dias). A redução na resposta bradicárdica do barorreflexo nos animais submetidos ao ERR corrobora com dados anteriores (PORTER et al, 2004). Um outro estudo reportou facilitação da resposta de bradicardia reflexa após a exposição a protocolos de ERR (CONTI et al, 2001), porém as sessões (20 minutos vs 60 minutos) e o protocolo (5 dias vs 10 dias) de estresse foram mais curtos do que aqueles empregados no presente estudo.

Prejuízo da atividade barorreflexa tem sido associada com um aumento na atividade nervosa simpática (GRASSI et al, 2006). Desse modo, a redução na resposta bradicárdica reflexa identificada nos machos expostos ao ERR e ao ECV indica que comprometimento na atividade barorreflexa pode mediar a facilitação da atividade simpática cardíaca, que levou a elevação da FC basal, observada nesses animais após a exposição ao ECV e ao ERR. Com relação à facilitação das respostas durante estímulos hipotensores, tem sido sugerido que respostas taquicárdicas exacerbadas é um fator de risco para o desenvolvimento de isquemia do miocárdio e morte súbita (DYER et al, 1980; PALATINI et al, 1997). Deste modo, o aumento na resposta taquicárdica do barorreflexo nos machos submetidos ao ECV e nas fêmeas SHR submetidas ao ERR pode constituir um fator de risco para o desenvolvimento de patologias cardiovasculares.

O presente estudo é o primeiro a avaliar o efeito de protocolos de estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo em animais fêmeas. Entretanto, de maneira interessante, nenhum dos protocolos de estresse crônico alteraram as respostas do barorreflexo nas fêmeas

normotensas. Esses resultados indicam a presença de mecanismos protetores que impedem o desencadeamento de alterações nesse mecanismo reflexo cardiovascular em fêmeas expostas a protocolos de estresse crônico. Nesse sentido, foi reportado uma ação facilitatória dos hormônios ovarianos sobre a atividade do barorreflexo (ABDEL-RAHMAN, 1998; MOHAMED et al, 1999). Desse modo, os hormônios sexuais femininos podem se opor aos efeitos negativos do estresse, assim impedindo o surgimento de alterações na atividade do barorreflexo. Entretanto, esse mecanismo parece estar prejudicado nas fêmeas SHR, já que o ERR facilitou a resposta de taquicardia do barorreflexo nesses animais.

A ausência de efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo em fêmeas fornecem evidências de importantes dimorfismos sexuais nos possíveis mecanismos relacionados com as alterações cardiovasculares e autônomas induzidas pelo estresse. Por exemplo, apesar das alterações na atividade barorreflexa correlacionar com a facilitação da atividade simpática cardíaca e o aumento da FC basal nos machos, o aumento na atividade simpática e a taquicardia de repouso causada pelo ERR nas fêmeas parece ser independente de alterações na atividade barorreflexa.

Apesar da ausência de efeito dos protocolos de estresse sobre a atividade barorreflexa nas fêmeas, a comparação dos animais controle evidenciou importantes dimorfismos sexuais na atividade desse mecanismo reflexo cardiovascular. Por exemplo, as ratas, quando comparadas com seus pares machos, apresentaram respostas aumentadas de bradicardia reflexa durante aumentos da pressão arterial. A resposta de taquicardia reflexa causada pela hipotensão também foi maior em ratas comparadas com os animais machos. Esses achados estão de acordo com dados clínicos e pré-clínicos prévios indicando uma atividade barorreflexa aumentada em fêmeas (KIM et al, 2011). Entretanto, alguns estudos reportarem respostas barorreflexa reduzidas em fêmeas (ABDEL-RAHMAN et al, 1994; CONVERTINO, 1998; ABDEL-RAHMAN, 1999; BESKE et al, 2001) ou ausência de dimorfismos sexuais nas respostas de frequência cardíaca do barorreflexo (CROFTON et al,



1988; SEVRE et al, 2001; CUSTAUD et al, 2002; FOLEY et al, 2005). Um estudo recente reportou dimorfismos sexuais na morfologia da inervação aferente do barorreflexo (CHAVEZ et al, 2014), nas quais foram associadas com uma facilitação na transmissão da informação dos barorreceptores em fêmeas comparadas com machos (CHAVEZ et al, 2014), o que suporta os achados reportados no presente estudo. O aumento na função barorreflexa em fêmeas pode também estar relacionada com uma ação facilitatória dos hormônios ovarianos sobre a atividade desse mecanismo reflexo cardiovascular (EL-MAS; ABDEL-RAHMAN, 1998; MOHAMED et al, 1999).

Em suma, nossos resultados indicam importantes dimorfismos sexuais no impacto dos protocolos de estresse crônico sobre a atividade barorreflexa, no qual é independente do tipo de estresse (i.e., homotípico vs heterotípico) e parece estar relacionado com a presença de mecanismos protetores nas fêmeas. As alterações na atividade barorreflexa nos animais machos parecem constituir mecanismos envolvidos nas alterações da atividade autônoma e de FC causadas tanto pelo ECV quanto pelo ERR, ao passo que essas alterações em fêmeas parecem ser mediadas por outros mecanismos. Além disso, nossos dados evidenciaram aumento na resposta de taquicardia reflexa em machos submetidos ao ECV e fêmeas SHR sujeitas ao ERR, efeito esse que pode aumentar o risco de desenvolvimento de complicações cardiovasculares.

#### 6.4.2 Reatividade vascular a agentes vasoativos

Outro mecanismo investigado no presente estudo foi a resposta de pressão arterial frente a agentes vasoativos em animais machos e fêmeas submetidos ao ERR e o ECV. Estudos tem sugerido que homens e mulheres possuem diferentes mecanismos para o controle da pressão arterial (WIINBERG et al, 1995, BURT et al, 1991). Nesse sentido, dimorfismos sexuais na função vascular tem sido reportado. Por exemplo, dados clínicos e pré-clínicos têm

demonstrado que fêmeas apresentam respostas vasoconstritoras atenuadas para a estimulação  $\alpha$ -adrenérgica (STALLONE et al, 1991; CREWS; KHALIL, 1999; KNEALE BJ et al., 2000). Essas diferenças parecem decorrer de uma influência de hormônios ovarianos sobre a função vascular. De fato, receptores dos hormônios sexuais femininos foram identificados em células da parede vascular, incluindo células endoteliais e da musculatura lisa vascular (ORSHAL; KHALIL, 2004). A ativação desses receptores causa vasodilatação (FERRER M et al., 1996, SUDHIR K et al., 1997). Estudos *in vitro* mostraram que o estrógeno exerce importante proteção vascular pelo seu efeito na estimulação de produção de óxido nítrico (NO) em artérias e arteríolas (NEKOOEIAN, 1998). Assim, diferenças na biossíntese de NO endotelial vascular pode ser a base das diferenças de gênero no tônus vascular (FORTE et al., 1998). De fato, a produção de NO a partir do endotélio é maior em artérias de fêmeas em comparação com machos (KAUSER et al., 1994; KNOT et al., 1999; WELLMAN et al., 1996), possivelmente devido a uma estimulação na expressão da enzima sintase de NO (NOS) pelo estrogênio (GEARY, et al., 2000; KNOT, et al., 1999). Nesse sentido, foi reportado que o efeito inibitório decorrente do bloqueio da NOS no relaxamento induzido por acetilcolina é mais pronunciado na artéria mesentérica das fêmeas do que em machos (KAHONEN, et al., 1998). O relaxamento em anéis arteriais mesentéricos promovidos por NPS exógeno também foi maior em fêmeas do que em machos (KAHONEN et al, 1998). Também foi reportado que a contração vascular não é diferente entre machos castrados e intactos, mas significativamente aumentado nas ratas ovariectomizadas em comparação com as fêmeas intactas, sugerindo que as diferenças de gênero no tônus vascular são menos relacionadas com andrógenos e mais relacionado com o estrogênio (CREWS et al., 1999; KANASHIRO et al., 2001).

Os dados mencionados acima fornecem evidências de uma resposta vascular reduzida a agentes vasoconstritores em fêmeas, na qual está relacionada com uma ação facilitatória dos hormônios ovarianos sobre mecanismos vasculares vasodilatores (ORSHAL; KHALIL, 2004). Entretanto, nós não identificamos diferenças entre os animais controles machos e

fêmeas nas respostas de pressão arterial ao agente vasoconstrictor fenilefrina, nem aos agentes vasodilatadores acetilcolina e NPS. É importante mencionar que a maior parte das evidências de dimorfismos sexuais na resposta vascular a agentes vasoativos em animais foi obtido em estudos *in vitro*, de modo que diferenças nos procedimentos experimentais podem explicar a discrepância dos nossos achados. De fato, nossos dados corroboram com estudos prévios *in vivo*, nos quais não identificaram diferenças nas alterações da pressão arterial desencadeadas pela administração de agentes vasoconstritores e vasodilatadores (CROFTON et al, 1988; ABDEL-RAHMAN, 1999).

Apesar da ausência de dimorfismos sexuais na resposta vascular aos agentes vasoativos, nós identificamos importantes alterações nas respostas de pressão arterial aos agentes vasodilatadores em machos e fêmeas expostos aos protocolos de estresse crônico. Foi observado no presente estudo um aumento na resposta vasodilatadora causada pela infusão intravenosa de acetilcolina em animais fêmeas submetidas a ambos os protocolos de estresse, ao passo que o ECV reduziu a hipotensão induzida pela acetilcolina nos animais machos. Esses resultados corroboram com as evidências de que o endotélio desempenha um papel importante nos dimorfismos sexuais sobre a função vascular (KAUSER, et al., 1995). Somente um número limitado de estudos investigaram o efeito da exposição a protocolos de estresse crônico sobre a reatividade vascular a agentes vasoativos em fêmeas. Além disso, é importante mencionar que os nossos resultados são os primeiros a investigar em fêmeas alterações na reatividade vascular a agentes vasoativos após a exposição crônica a estímulos aversivos utilizando uma abordagem *in vivo*. Um estudo recente *in vitro* relatou que a resposta de relaxamento vascular a um agonista colinérgico foi reduzida em camundongos expostos a um protocolo de 8 semanas de ECV (STANLEY et al, 2014). No entanto, a facilitação da resposta depressora à acetilcolina observada no presente estudo corrobora com a evidência de que o estresse por restrição aumenta a produção endotelial de NO (WEBB et al., 1981; CORDELLINI; VASSILIEFF, 1998; JUNIOR; CORDELLINI, 2007). Os nossos resultados

obtidos nos animais machos também estão de acordo com dados *in vitro* e *in vivo* demonstrando uma redução na reatividade vascular a agonistas colinérgicos após a exposição ao ECV (D'AUDIFFRET et al, 2010; ISINGRINI et al, 2011; ISINGRINI et al, 2012; BAYRAMGURLER et al, 2013; DERMITAS et al, 2014; STANLEY et al, 2014; ALMEIDA et al, 2015).

A disfunção endotelial é definida como o desequilíbrio entre a produção e biodisponibilidade de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs) (SILVA et al., 2012). A resposta depressora da acetilcolina tem sido demonstrada ser mediada pelo NO e outros EDRFs ( et al, 2008). Desse modo, o aumento na resposta depressora da acetilcolina nas ratas submetidas ao ERR e ao ECV indica uma melhora na função endotelial. Entretanto, de maneira oposta à facilitação da resposta depressora da acetilcolina, nós observamos que o ERR e o ECV reduziram a resposta de redução da pressão arterial induzida pelo NPS nas fêmeas. Em conjunto, os dados obtidos com acetilcolina e NPS indicam que uma melhora na função endotelial é acompanhada de comprometimento na resposta vascular ao NO em fêmeas. Entretanto, a facilitação da resposta da acetilcolina indica que a melhora na função endotelial parece se sobrepor ao prejuízo nos efeitos dilatadores do NO, assim resultando em uma facilitação da resposta de relaxamento vascular dependente da ativação endotelial. Como mencionado acima, a resposta depressora da acetilcolina é também mediada por outros EDRFs além do NO (DABISCH et al, 2008), nos quais podem estar relacionados com o aumento na resposta da acetilcolina.

Nós encontramos somente um estudo que investigou o efeito de protocolos de estresse crônico sobre a reatividade vascular ao NPS em fêmeas, no qual observou que a exposição a um protocolo de ECV não afetou a reatividade vascular a esse agente *in vitro* (STANLEY et al, 2014). Desse modo, nossos resultados são os primeiros a fornecerem evidência de um prejuízo na via de sinalização do NO em fêmeas submetidas a protocolos de estresse crônico. Os mecanismos relacionados com esse efeito ainda não estão claros e merecem futura

investigação. A ausência de efeito do ECV sobre a resposta do NPS nos animais machos está de acordo com evidências prévias obtidas em estudos *in vitro* e *in vivo* (D'AUDIFFRET et al, 2010; BAYRAMGURLER et al, 2013; DERMITAS et al, 2014; DUARTE et al, 2015). Entretanto, o presente estudo fornece a primeira evidência de uma facilitação na resposta vascular a um doador de NO após a exposição ao ERR, uma vez que estudos prévios reportaram ausência de efeito (CORDELLINI; VASSILIEFF, 1998) ou observaram prejuízo na resposta vascular a esses agentes (DUARTE et al, 2015).

Foi observado no presente trabalho que tanto os machos quanto as fêmeas tiveram uma resposta pressora à infusão de fenilefrina, porém não houve diferença significativa entre os animais controle e os animais que foram submetidos aos protocolos de estresse crônico. Nossos resultados estão de acordo com dados anteriores *in vitro* e *in vivo* em machos, nos quais não identificaram efeito do ECV sobre a reatividade vascular a agentes vasoconstrictores (D'AUDIFFRET et al, 2010; ISINGRINI et al, 2011; BOUZINOVA et al, 2012; Stanley et al, 2014; ALMEIDA et al, 2015; DUARTE et al, 2015). Um estudo recente também não identificou efeito do ECV sobre a reatividade vascular à noradrenalina em vasos de condutância e resistência de fêmeas (STANLEY et al, 2014). Os efeitos de protocolos de estresse homotípicos sobre a reatividade vascular a agentes vasoconstrictores são menos compreendidos. Um estudo recente reportou um aumento na resposta de contração da aorta à noradrenalina em machos expostos a um protocolo de ERR de 6 semanas (BAPTISTA et al, 2014). Entretanto, nossos resultados corroboram com estudos *in vivo* do nosso grupo que não identificaram efeito do ERR sobre a resposta pressora à fenilefrina (DUARTE et al, 2015; COSTA-FERREIRA et al, 2016).

A hipertensão é associada com disfunções vasculares, nas quais são principalmente caracterizadas por comprometimento na função endotelial e na resposta de relaxamento vascular (TANG et al, 2010). Assim, o aumento na resposta vascular à acetilcolina nas ratas expostas ao ERR e ao ECV e na hipotensão ao NPS nos machos submetidos ao ERR podem

constituir importantes respostas adaptativas que inibem a elevação da pressão arterial. A redução na resposta da acetilcolina observada nos machos submetidos ao ECV constitui uma resposta que contribui para um aumento na pressão arterial. Entretanto, a ausência de alteração na pressão arterial nesses animais indica que esse efeito é tamponado por outras respostas compensatórias.

Em conjunto, nossos dados indicam que os efeitos dos protocolos de estresse crônico sobre a reatividade vascular aos agentes vasoativos também diferiram em machos e fêmeas, porém, com exceção do comprometimento na resposta da acetilcolina nos animais machos expostos ao ECV, todos os efeitos parecem constituir importantes respostas compensatórias que contribuem para inibir a elevação da pressão arterial.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados sugerem uma influência do dimorfismo sexual nas respostas frente aos protocolos de estresse. Os resultados indicam que os protocolos de estresse afetam de maneira diferente os machos (efeitos somáticos) e fêmeas (eixo HPA). Os resultados também sugerem influência da exposição ao estresse crônico sobre o sistema nervoso autônomo, a atividade do barorreflexo e função vascular, nas quais são dependentes do gênero e do tipo do estresse. Alterações nessas funções parecem constituir mecanismos importantes na etiologia das alterações de pressão arterial e FC induzidos pelo estresse crônico.

Em relação à influência da hipertensão, os dados reportados indicam que ambos os protocolos afetam de maneira similar os parâmetros somáticos e os níveis plasmáticos de corticosterona nas fêmeas SHR e normotensas. Entretanto, as ratas SHR e normotensas parecem mais suscetíveis aos efeitos cardiovasculares e autonômicos induzidos pelo estresse homotípico, porém resilientes aos efeitos cardiovasculares de estressores heterotípicos. Os resultados não evidenciaram uma vulnerabilidade das ratas SHR aos protocolos de estresse quando comparadas com as normotensas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN AA. Gender difference in baroreflex-mediated bradycardia in young rats: role of cardiac sympathetic and parasympathetic components. **Can J Physiol Pharmacol.** May; 77(5):358-66, 1999.

ABDEL-RAHMAN AR; MERRILL RH; WOOLLES WR. Gender-related differences in the baroreceptor reflex control of heart rate in normotensive humans. **J Appl Physiol.** Aug; 77(2):606-13, 1994.

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

ALBONETTI, M.E; FARABOLLINI, F. Behavioural responses to single and repeated restraint in male and female rats. **Behav Processes** 28(1-2), 97-109, 1992.

ALMEIDA, J; DUARTE, J.O; OLIVEIRA, L.A; CRESTANI, C.C. Effects of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment on depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. **Stress** 18(4), 462-474, 2015.

ANISHCHENKO, T.G; GLUSHKOVSKAYA, O.V; BERDNIKOVA, V.A., SINDYAKOVA, T.A. Sex-related differences in cardiovascular stress reactivity in healthy and hypertensive rats. **Bull Exp Biol Med** 143(2), 178-181, 2007.

ARAUJO AP; DELUCIA R; SCAVONE C; PLANETA CS. Repeated predictable or unpredictable stress: effects on cocaine-induced locomotion and cyclic AMP-dependent protein kinase activity. **Behav Brain Res.** Feb 17;139(1-2):75-81, 2003.

AUGUST P, OPARIL S. Hypertension in women. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.84, n.6, p.1862-6, 1999.

AZAR, T; SHARP, J; LAWSON, D. Stress-like cardiovascular responses to common procedures in male versus female spontaneously hypertensive rats. **Contemp Top Lab Anim Sci** 44(3), 25-30, 2005.



BALI, A; JAGGI, A. S. Clinical experimental stress studies: methods and assessment. **Rev. Neurosci.** 26, 555–579. doi: 10.1515/revneuro-2015-0004, 2015.

BARRON, B.A.; VAN LOON, G.R. Role of sympathoadrenomedullary system in cardiovascular response to stress in rats. **J Auton Nerv Syst**, v.28, n.2, Nov, p.179-87. 1989.

BAPTISTA RDE F, TAIPEIRO EDE F, QUEIROZ RH, CHIES AB, CORDELLINI S. Stress alone or associated with ethanol induces prostanoid release in rat aorta via alpha2-Adrenoceptor. **Arq Bras Cardiol**, 2014.

BAYRAMGURLER, D; KARSON, A; YAZIR, Y; CELIKYURT, I.K. The effect of etanercept on aortic nitric oxide-dependent vasorelaxation in an unpredictable chronic, mild stress model of depression in rats. **Eur J Pharmacol** 710(1-3), 67-72, 2013.

BECHTOLD AG; PATEL G, HOCHHAUS G; SCHEUER D. Chronic blockade of hindbrain glucocorticoid receptors reduces blood pressure responses to novel stress and attenuates adaptation to repeated stress. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**296(5):R1445-R1454. doi:10.1152/ajpregu.00095.2008.

BEKKER, M.H; MENS-VERHULST, J. Anxiety disorders: sex differences in prevalence, degree, and background, but gender-neutral treatment. **Gen Med** 4 Suppl B, S178-193, 2007.

BERNATOVA, I; PUZSEROVA, A; DUBOVICKY, M.. Sex differences in social stress-induced pressor and behavioral responses in normotensive and prehypertensive rats. **Gen Physiol Biophys** 29(4), 346-354, 2010.

BERTON O; AGUERRE S; SARRIEAU A; MORMEDE P; CHAOULOFF F. Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in lewis and spontaneously hypertensive rats. 82(1):147-159, 1998.

BESKE SD; ALVAREZ GE; BALLARD TP; DAVY KP. Gender difference in cardiovascular baroreflex gain in humans. **J Appl.** Nov; 91(5):2088-92, 2001.

BHATNAGAR, S; LEE, T.M; VINING, C. Prenatal stress differentially affects habituation of corticosterone responses to repeated stress in adult male and female rats. **Horm Behav** 47(4), 430-438, 2005.

BLANCO JH, GASTALDI AC1, GARDIM CB, ARAUJO JE, SIMÕES MV, OLIVEIRA LF, CARVALHO EE, SOUZA HC. Chronic cholinergic stimulation promotes changes in cardiovascular autonomic control in spontaneously hypertensive rats. **Auton Neurosci.** 193:97-103, 2015.

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

BOWMAN RE, BECK KD, LUINE VN. Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. **Horm Behav.**, v.43, n.1, p.48-59, 2003.

BOWMAN, R.E; BECK, K.D; LUINE, V.N. Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. **Horm Behav** 43(1), 48-59, 2009.

BOWMAN, R.E; MICIK, R; GAUTREAUX, C; FERNANDEZ, L; LUINE, V.N. Sex-dependent changes in anxiety, memory, and monoamines following one week of stress. **Physiol Behav** 97(1), 21-29, 2003.

BROOKS, V.L; CASSAGLIA, P.A; ZHAO, D; GOLDMAN, R.K. Baroreflex function in females: changes with the reproductive cycle and pregnancy. **Gend Med** 9(2), 61-67, 2012.

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

BRUDER-NASCIMENTO T; CAMPOS DHS; CICOGNA AC; CORDELLINI S. Chronic stress improves NO- and Ca<sup>2+</sup> flux-dependent vascular function: a pharmacological study. **Arq Bras Cardiol.**;104(3):226-233, 2015.

BURT VL, WHELTON P, ROCCELLA EJ, BROWN C, CUTLER JA, HIGGINS M, HORAN MJ, LABARTHE D. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. **Hypertension.**, v.25, n.3, p.305-13, 1995.

BUYNITSKY T; MOSTOFSKY D. I. Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews.**33(7):1089–1098.doi: 10.1016/j.neubiorev.2009

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

CARNEY RM; FREEDLAND KE. RICH MW; SMITH LJ; JAFFE AS. Ventricular tachycardia and psychiatric depression in patients with coronary artery disease. **Am J Med.**:95:23-8, 1993.

CARVALHO-NETTO, E.F; MYERS, B; JONES, K; SOLOMON, M.B; HERMAN, J.P. Sex differences in synaptic plasticity in stress-responsive brain regions following chronic variable stress. **Physiol Behav** 104(2), 242-247, 2011.

CASEY BJ, GETZ S, GALVAN A. The adolescent brain. **Dev Rev.**, v.28, n.1, p.62-77, 2008.

CHEN X, HERBERT J. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. **Neuroscience.**, v.64, n.3, p.675-85, 1994.

CASTRO R; PRINTZ MP. Exaggerated response to alerting stimuli in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension.** 16(3):290-300, 1990.

CHADDA, R; DEVAUD, L.L. Differential effects of mild repeated restraint stress on behaviors and GABA(A) receptors in male and female rats. **Pharmacol Biochem Behav** 81(4), 854-863, 2005.

CHAAR LJ, ALVES TP, BATISTA JUNIOR AM, MICHELINI LC. Early Training-Induced Reduction of Angiotensinogen in Autonomic Areas-The Main Effect of Exercise on Brain Renin-Angiotensin System in Hypertensive Rats. **PLoS One**, 2015.

CHAVEZ GC, LI BY, GLAZEBROOK PA, KUNZE DL, SCHILD JH. An afferent explanation for sexual dimorphism in the aortic baroreflex of rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2014.

CONWAY, J. Vascular reactivity in experimental hypertension measured after hexamethonium. *Circulation*, v.17, n.4, Part 2, Apr, p.807-10. 1958.

CLARK JT, CHAKRABORTY-CHATTERJEE M, HAMBLIN M, WYSS JM, FENTIE IH. Estrogen depletion differentially affects blood pressure depending on age in Long-Evans rats. **Endocrine.**, v.25, n.2, p.173-86, 2004.

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

CONVERTINO VA. Gender differences in autonomic functions associated with blood pressure regulation. **Am J Physiol**. Dec;275(6 Pt 2):R1909-20, 1998.

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

COSTA-FERREIRA, W; VIEIRA, J.O; ALMEIDA, J; GOMES-DE-SOUZA, L; CRESTANI, C.C. Involvement of Type 1 Angiotensin II Receptor (AT1) in Cardiovascular Changes Induced by Chronic Emotional Stress: Comparison between Homotypic and Heterotypic Stressors. **Front Pharmacol** 7, 262, 2016.

CRESTANI, C.C.; ALVES, F.H.; BUSNARDO, C.; RESSEL, L.B. e CORREA, F.M. N-Methyl-d-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate

cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. **Neurosci Res**, v.67, n.4, Aug, p.317-26. 2010b.

CRESTANI CC. Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. **Front Physiol**. 2016.

CRESTANI, C.C.; ALVES, F.H.; RESSTEL, L.B. e CORREA, F.M. The bed nucleus of the stria terminalis modulates baroreflex in rats. **Neuroreport**, v.17, n.14, Oct 2, p.1531-5. 2006.

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

CRESTANI CC, TAVARES RF, GUIMARÃES FS, CORREA FM, JOCA SR, RESSTEL LB. Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. **Eur J Pharmacol.**, v.670, n.2- 3, p.527-33, 2011.

CRESTANI, C.C. Emotional stress and cardiovascular complications in animal models: a review of the influence of stress type. **Front Physiol**, 2016.

CREWS JK, KHALIL RA. Gender-specific inhibition of Ca entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 1999.

CROFTON JT, SHARE L, BROOKS DP. Pressor responsiveness to and secretion of vasopressin during the estrous cycle. **Am J Physiol**, 1988.

CRUZ, F.C; DUARTE, J.O; LEAO, R.M; HUMMEL, L.F; PLANETA, C.S; CRESTANI, C.C. Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic social stress: Immediate and long-term effects of social isolation during adolescence. **Dev Neurobiol** 76(1), 34-46, 2016.

CRUZ FC, ENGI SA, LEÃO RM, PLANETA CS, CRESTANI CC. Effect of the single or combined administration of cocaine and testosterone in autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **J Psychopharmacol.**, v.26, n.10, p.1366-74, 2012b.

DABISCH PA, LILES JT, BABER SR, GOLWALA NH, MURTHY SN, KADOWITZ PJ. Analysis of L-NAME-dependent and -resistant responses to acetylcholine in the rat. , 2008.

DALLA C; ANTONIOU K; DROSSOPOULOU G; XAGORARIS M; KOKRAS N; SFIKAKIS A; PAPADOPOULOU-DAIFOTI Z. Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? **Neuroscience**. 135(3):703-14, 2005.

DAMPNEY, R.A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, v.74, n.2, p.323-64. 1994.

DANTAS AP, SCIVOLETTO R, FORTES ZB, NIGRO D, CARVALHO MH. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 34, p. 914-919, 1999.

DAUBERT, D.L; MCCOWAN, M; ERDOS, B; SCHEUER, D.A. Nucleus of the solitary tract catecholaminergic neurons modulate the cardiovascular response to psychological stress in rats. **J Physiol** 590(Pt 19), 4881-4895, 2012.

D'AUDIFFRET AC, FRISBEE SJ, STAPLETON PA, GOODWILL AG, ISINGRINI E, FRISBEE JC. Depressive behavior and vascular dysfunction: a link between clinical depression and vascular disease? **J Appl Physiol.**, v.108, n.5, p.1041-51, 2010.

DEVITO J; SUTTERER R. The pituitary-adrenal response to ether stress in the spontaneously hypertensive and normotensive rat. *Life Sciences*, 28(c):1489-1495, 1981.

DIAS DP; OLIVEIRA M; SALGADO HC; FAZAN R Jr. Ovariectomy does not affect the cardiac sympathovagal balance of female SHR but estradiol does. **Braz J Med Biol Res.**, v.43, n.10, p.969-75, 2010.

DIAS DA SILVA VJ, MIRANDA R, OLIVEIRA L, RODRIGUES ALVES CH, VAN GILS GH, PORTA A, MONTANO N. Heart rate and arterial pressure variability and baroreflex

sensitivity in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.**, v.84, n.21-22, p.719-24, 2009.

DJORDJEVIC J; VUCKOVIC T; JASNIC N; CVIJIC G. Effect of various stressors on the blood ACTH and corticosterone concentration in normotensive Wistar and spontaneously hypertensive Wistar-Kyoto rats. 153:217-220. doi:10.1016/j.ygcn.2007.02.004, 2007.

DOREMUS-FITZWATER TL; VARLINSKAYA EI; SPEAR LP. Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. **Physiol Behav.** Jun 22;97(3-4):484-94, 2009.

DYER AR; PERSKY V; STAMLER J; PAUL O; SHEKELLE RB; BERKSON DM; LEPPER M; SCHOENBERGER JA; LINDBERG HA. Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies. **Am J Epidemiol.**;112:736-49, 1980.

DUARTE, J.O; CRUZ, F.C; LEAO, R.M; PLANETA, C.S; CRESTANI, C.C. Stress vulnerability during adolescence: comparison of chronic stressors in adolescent and adult rats. **Psychosom Med** 77(2), 186-199, 2015.

DUBEY RK, OPARIL S, IMTHURN B, JACKSON EK. Sex hormones and hypertension. **Cardiovasc Res.**, v.53, n.3, p.688-708, 2002.

DUCLOS M; MARTIN C; MALGAT M; CHAOULOFF JMF; MARTIN C. Relationships between muscle mitochondrial metabolism and stress-induced corticosterone variations in rats.218-226. doi:10.1007/s004240100675, 2001.

DUNCKO R; KISS A; SKULTÉTYOVÁ I; RUSNÁK M; JEZOVÁ D. Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in response to chronic mild stress rise in male but not in female rats while tyrosine hydroxylase mRNA levels decrease in both sexes. **Psychoneuroendocrinology.** Jan;26(1):77-89, 2001.

DYER AR; PERSKY V; STAMLER J; PAULO O; SHEKELLE RB; BERKSON DM; LEPPER M; SCHOENBERGER JA; LINDBERG HA. Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies. **Am J Epidemiol**, v.112, p.736–49, 1980.

EIKELIS, N; VAN DEN BUUSE, M. Cardiovascular responses to open-field stress in rats: sex differences and effects of gonadal hormones. **Stress** 3(4), 319-334, 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** 11(1), e0146974, 2016.

FARRELL, T.G.; PAUL, V.; CRIPPS, T.R.; MALIK, M.; BENNETT, E.D.; WARD, D. e CAMM, A.J. Baroreflex sensitivity and electrophysiological correlates in patients after acute myocardial infarction. **Circulation**, v.83, n.3, Mar, p.945-52. 1991.

FERRER M, ALONSO MJ, SALAICES M, MARÍN J, BALFAGÓN G. Increase in neurogenic nitric oxide metabolism by endothelin-1 in mesenteric arteries from hypertensive rats. **J Cardiovasc Pharmacol**, 2000.

FORTE P, KNEALE BJ, MILNE E, CHOWIENCZYK PJ, JOHNSTON A, BENJAMIN N, RITTER JM. Evidence for a difference in nitric oxide biosynthesis between healthy women and men. **Hypertension**, 1998.

FORD DE, MEAD LA, CHANG PP, Cooper-Patrick L, Wang NY, Klag MJ. Depression is a risk factor for coronary artery disease in men: the precursors study. **Arch Intern Med.**, v.158, n.13, p.1422-6, 1998.

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



FLAK JN; SOLOMON MB; JANKORD R; KRAUSE EG; HERMAN JP. Identification of chronic stress-activated regions reveals a potential recruited circuit in rat brain. **Eur J Neurosci.**36(4):2547-2555, 20.12

FLUES K; PAULINI J; BRITO S; SANCHES IC; CONSOLIM-COLOMBO F, IRIGOYEN MC, DE ANGELIS K. Exercise training associated with estrogen therapy induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. **Maturitas.**, v.65, n.3, p.267-71, 2010.

FUREDI N; MIKO A; AUBRECHT B; GASZNER B; FELLER D; ROSTAS I; TENK J; SOOS S; BALASKO M; BALOGH A; PAP M. Regulatory Alterations of Energy Homeostasis in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). **J Mol Neurosci.** 59(4):521-30, 2016.

GALEA LA; MCEWEN BS; TANAPAT P; DEAK T; SPENCER RL; DHABHAR FS. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. **Neuroscience.** Dec;81(3):689-97, 1997.

GALEA, L.A; MCEWEN, B.S; TANAPAT, P; DEAK, T; SPENCER, R.L; DHABHAR, F.S. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. **Neuroscience** 81(3), 689-697, 1997.

GÁLVEZ B; CASTRO J; HEROLD D; DUBROVSKA G; ARRIBAS S; GONZÁLEZ MC; ARANGUEZ I; LUFT FC; RAMOS MP; GOLLASCH M; ALFONSO MSF. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 26: 1297-1302, 2006.

GAO Y; ZHOU JJ; ZHU Y; KOSTEN T; LI DP. Chronic Unpredictable Mild Stress Induces Loss of GABA Inhibition in Corticotrophin-Releasing Hormone-Expressing Neurons Through NKCC1 Upregulation. **Neuroendocrinology.** 2016.

GHIADONI L; TADDEI S; VIRDIS A. Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach. **Curr Vasc Pharmacol.**, v.10, n.1, p.42-60, 2012.

GIMÉNEZ J; GARCÍA MP; SERNA M; BONACASA B; CARBONELL LF; QUESADA T; HERNÁNDEZ I. 17Betaoestradiol enhances the acute hypotensive effect of captopril in female ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Exp Physiol.**, v.91, n.4, p.715-22, 2006.

GOMES, F; DEKLOET, E.R; ARMARIO, A. Glucocorticoid negative feedback on the HPA axis in five inbred strains. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 274, 420–427, 1998.

GOUVEIA, M.K; MIGUEL, T.T; BUSNARDO, C; SCOPINHO, A.A; CORREA, F.M; NUNES-DE-SOUZA, R.L; CRESTANI, C.C. Dissociation in control of physiological and behavioral responses to emotional stress by cholinergic neurotransmission in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. **Neuropharmacology** 101, 379-388, 2016.

GRASSI, G; TREVANO, F.Q; SERAVALLE, G; SCOPELLITI, F; MANCIA, G. Baroreflex function in hypertension: consequences for antihypertensive therapy. **Prog Cardiovasc Dis** 48(6), 407-415, 2006.

GRIPPO, A.J; IHM, E; WARDWELL, J; MCNEAL, N; SCOTTI, M.A; MOENK, D.A; CHANDLER, D.L; LAROCCA, M.A; PREIHS. The effects of environmental enrichment on depressive and anxiety-relevant behaviors in socially isolated prairie voles. **Psychosom Med** 76(4), 277-284, 2014.

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

GRIPPO AJ; SULLIVAN NR; DAMJANOSKA KJ; CRANE JW; CARRASCO GA; SHI J; CHEN Z; GARCIA F; MUMA NA; VAN DE KAR LD. Chronic mild stress induces behavioral and physiological changes, and may alter serotonin 1A receptor function, in male and cycling female rats. **Psychopharmacology (Berl)**. Jun;179(4):769-80, 2005.

GRIPPO AJ. Mechanisms underlying altered mood and cardiovascular dysfunction: the value of neurobiological and behavioral research with animal models. **Neurosci Biobehav Rev.** 33(2):171-80, 2009.

GRIPPO AJ; JOHNSON AK. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: a review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. **Stress.** 12(1):1-21, 2009.

GRISSOM, N; BHATNAGAR, S. Habituation to repeated stress: get used to it. **Neurobiol Learn Mem** 92(2), 215-224, 2009.

HABIB, M; SHAKER, S; EL-GAYAR, N; ABOUL-FOTOUH, S. The effects of antidepressants "fluoxetine and imipramine" on vascular abnormalities and Toll like receptor-4 expression in diabetic and non-diabetic rats exposed to chronic stress. **PLoS One** 10(3), e0120559, 2015.

HAILE, C.N; GRANDPRE, T; KOSTEN, T.A. Chronic unpredictable stress, but not chronic predictable stress, enhances the sensitivity to the behavioral effects of cocaine in rats. **Psychopharmacology (Berl)** 154(2), 213-220, 2001.

HAINES AP; IMESON JD; MEADE TW. Phobic anxiety and ischaemic heart disease. **Br Med J (Clin Res Ed).** Aug 1;295(6593):297-9, 1987.

HANDA, R.J; BURGESS, L.H; KERR, J.E; O'KEEFE, J.A. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Horm Behav** 28(4), 464-476, 1994.

HARRISON, D.G; FREIMAN, P.C; ARMSTRONG, M.L; MARCUS, M.L; HEISTAD, D.D. Alterations of vascular reactivity in atherosclerosis. **Circ Res**, v.61, n.5 Pt 2, Nov, p.II74-80. 1987.

HATTORI, T; HASHIMOTO, K; OTA, Z. Adrenocorticotropin responses to corticotropin releasing factor and vasopressin in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension** 8, 386-390, 1986.

HAUSLER, A; GIRARD, J B; BAUMAN, W; OTTEN, U H. Children Hospital, Departamento f research. Kentonsspital and departamento of Pharmacology, **Biozentrum Base, Swirtzerland**. 0730-0077/83/0501-0011, 1983.

HASHIMOTO K; MAKINO S; HIRASAWA R; TAKAO T; OTA Z. Abnormalities in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis in Spontaneously Hypertensive Rats during Development of Hypertension. 125(3), 2015.

HAY, M. Sex, the brain and hypertension: brain oestrogen receptors and high blood pressure risk factors. **Clin Sci (Lond)** 130(1), 9-18, 2016.

HEAD GA; MCCARTY R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptorheart rate reflex in conscious rats. **J Auton Nerv Syst.**, v.21, n.2-3, p.203-13, 1987.

HELMREICH, D.L; MORANO, M.I; AKIL, H; WATSON, S.J. Correlation between Changes in Stress-Induced Corticosterone Secretion and GR mRNA Levels. **Stress** 2(2), 101-112, 1997.

HERMAN, J.P. Neural control of chronic stress adaptation. **Front Behav Neurosci** 7, 61, 1997.

HERNÁNDEZ I; DELGADO JL; DÍAZ J; QUESADA T; TERUEL MJ; LLANOS MC; CARBONELL LF. 17betaestradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v.279, n.5, p.R1599-605, 2000.

HUYNH, T.N; KRIGBAUM, A.M; HANNA, J.J; CONRAD, C.D; Sex differences and phase of light cycle modify chronic stress effects on anxiety and depressive-like behavior. **Behav Brain Res** 222(1), 212-222, 2011.

IMAKI T, NARUSE M, HARADA S, CHIKADA N, NAKAJIMA K. Stress-Induced Changes of Gene Expression in the Paraventricular Nucleus are Enhanced in Spontaneously Hypertensive Rats.10(9):635-643, 1998.

IRIGOYEN, M.C; KRIEGER, E.M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Braz J Med Biol Res**, v.31, n.9, p.1213-20. 1998.

ISGOR, C; KABBAJ, M; AKIL, H; WATSON, S.J. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. **Hippocampus** 14(5), 636-648, 2004.

ISINGRINI E; SURGET A; BELZUNG C; FRESLON JL; FRISBEE J; O'DONNELL J; CAMU V; D'AUDIFFRET A. Altered aortic vascular reactivity in the unpredictable chronic mild stress model of depression in mice: UCMS causes relaxation impairment to ACh. **Physiol Behav.**, v.103, n.5, p.540-6, 2011.

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

IWASAKI-SEKINO, A; MANO-OTAGIRI, A; OHATA, H; YAMAUCHI, N; SHIBASAKI, T. Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological stress in rats. **Psychoneuroendocrinology** 34(2), 226-237, 2009.

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

JANKORD R; SOLOMON MB; ALBERTZ J; FLAK JN; ZHANG R; HERMAN JP. Stress vulnerability during adolescent development in rats. **Endocrinology**. 152:629-38, 2011.

JOHNSON MS; DEMARCO VG; HEESCH CM; WHALEY-CONNELL AT; SCHNEIDER RI; REMER NT; TILMON RD; FERRARIO CM; SOWERS JR. Sex differences in baroreflex sensitivity, heart rate variability, and end organ damage in the TGR(mRen2)27 rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. Oct;301(4):H1540-50, 2011.

JONES BC; SARRIEAU A; REED CL; AZAR MR; MORMÈDE P. Contribution of sex and genetics to neuroendocrine adaptation to stress in mice. **Psychoneuroendocrinology**. Jul;23(5):505-17, 1998.

JUNIOR, U.L., CORDELLINI, S. Differential vascular adaptive response to stress exposure in male and female rats: role of gonadal hormones and endothelial cells. **Stress** 10(1), 27-36, 2007.

KANASHIRO CA, KHALIL RA. Gender-related distinctions in protein kinase C activity in rat vascular smooth muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**, 2001.

KAUSER K, RUBANYI GM. Gender difference in bioassayable endothelium- derived nitric oxide from isolated rat aortae. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 1994.

KAWACHI I, SPARROW D, VOKONAS PS, WEISS ST. Symptoms of anxiety and risk of coronary heart disease. The Normative Aging Study. **Circulation**., v.90, n.5, p.2225-9, 1994.

KEARNEY, P.M; WHELTON, M; REYNOLDS, K; MUNTNER, P; WHELTON, P.K; HE. J.Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet** 365(9455), 217-223, 2005.

KESSLER, R.C; MCGONAGLE, K.A; ZHAO, S; NELSON, C.B; HUGHES, M; ESHLEMAN, S; WITTCHEN, H.U; KENDLER, K.S. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. **Arch Gen Psychiatry** 51(1), 8-19, 1994.

KLOET ERDE; ARMARIO A; CELLULAR DB; FISILOGIA D; ANIMAL UDF; KLOET ER DE. Glucocorticoid negative feedback on the HPA axis in five inbred rat strains. v (3):420-427, 1998.

KNARDAHL S; HENDLEY ED. Association between cardiovascular reactivity to stress and hypertension or behavior. **Am J Physiol**. 259(1 Pt 2):H248-57, 1990.

KOPP BL; WICK D; HERMAN JP. Differential effects of homotypic vs. heterotypic chronic stress regimens on microglial activation in the prefrontal cortex. **Physiol Behav.** V.122:246-52, 2013.

KNEALE BJ, CHOWIENCZYK PJ, BRETT SE, COLTART DJ, AND RITTER JM. Gender differences in sensitivity to adrenergic agonists of forearm resistance vasculature. **J Am Coll Cardiol**, 2000.

KNOT HJ, LOUNSBURY KM, BRAYDEN JE, AND NELSON MT. Gender differences in coronary artery diameter reflect changes in both endothelial Ca<sup>2</sup> and eNOS activity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 1999.

KNOX SS; UVNÄS-MOBERG K. Social isolation and cardiovascular disease: an atherosclerotic pathway? **Psychoneuroendocrinology.** Nov;23(8):877-90, 1998.

KNOWLTON AA; LEE AR. Estrogen and the cardiovascular system. **Pharmacol Ther.**, v.135, n.1, p.54-70, 2012.

KORNER PI; SHAW J; WEST MJ; OLIVER JR. Central nervous system control of baroreceptor reflexes in the rabbit. **Circ Res.**, v.31, n.5, p.637-52, 1972.

KRUGEL U; FISCHER J; RADICKE S; SACK U; HIMMERICH H. Antidepressant effects of TNF-alpha blockade in an animal model of depression. **J Psychiatr Res.**v ;47:611-6, 2013.

KVETNANSKY, R; MCCARTY, R; THOA, N.B; LAKE, C.R; KOPIN, I.J. Sympatho-adrenal responses of spontaneously hypertensive rats to immobilization stress. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 236, 457-462, 1979.

KUDIELKA, B. M; HELLHAMMER, D. H; KIRSCHBAUM, C. Sex differences in human stress response. In: FINK, G., ed. *Encyclopedia of stress*. New York: Academic Press, v. 3, p.424-429, 2000.

LA FLEUR, S.E. The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats. **Physiol Behav** 89(1), 110-114, 2006.

LANFRANCHI PA; SOMERS VK. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 283: R815–R826, 2002.

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

LEDVENYIOVA-FARKASOVA, V; BERNATOVA, I; BALIS, P; PUZSEROVA, A; BARTEKOVA, M; GABLOVSKY, I; RAVINGEROVA, T. Effect of crowding stress on tolerance to ischemia-reperfusion injury in young male and female hypertensive rats: molecular mechanisms. **Can J Physiol Pharmacol** 93(9), 793-802, 2015.

LENGLOS, C; MITRA, A; GUEVREMONT, G; TIMOFEEVA, E.. Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and relaxin-3 in rats. v12(4), 370-387, 2013.

LIMA JR E, LIMA N E. Hipertensão arterial: aspectos comportamentais – **Estresse e migração. Revista Brasileira de Hipertensão.**, vol.17(4): p. 215, 2010.

LOPEZ, M; TENA-SEMPERE, M; Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. **Trends Endocrinol Metab** 26(8), 411-421, 2015.

LU, J; WU, X.Y; ZHU, Q.B; LI, J; SHI, L.G; WU, J.L; ZHANG, Q.J; HUANG, M.L; BAO, A.M. 2015. Sex differences in the stress response in SD rats. **Behav Brain Res** 284, 231-237.

LUNDIN S; RICKSTEN SE; THORÉN P. Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods. **Acta Physiol Scand** 120: 265- 72, 1984.

MAGARINOS AM; MCEWEN BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. **Neuroscience**.v69:83-8, 1995.



MARIN MT; CRUZ FC; PLANETA CS. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiol Behav.** v90:29-35, 2007.

MARIS ME; MELCHERT RB; JOSEPH J; KENNEDY RH. Gender differences in blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** Jan-Feb;32(1-2):35-9, 2005.

MARTI O; MARTI J; ARMARIO A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav.* v55:747-53, 1994.

MASSON GS; COSTA TS; YSHII L; FERNANDES DC; SOARES PP; LAURINDO FR; SCAVONE C; MICHELINI LC. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. **PLoS One.** 9(5):e94927, 2014.

MASSON GS<sup>1</sup>; NAIR AR; SILVA SOARES PP; MICHELINI LC; FRANCIS J. Aerobic training normalizes autonomic dysfunction, HMGB1 content, microglia activation and inflammation in hypothalamic paraventricular nucleus of SHR. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 309(7):H1115-22, 2015.

MATURANA MA; IRIGOYEN MC; SPRITZER PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. **Clinics (Sao Paulo).**, v.62, n.1, p.77-86, 2007.

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

MASLOVA LN; BULYGINA VV; AMSTISLAVSKAYA TG. Prolonged social isolation and social instability in adolescence in rats: immediate and long-term physiological and behavioral effects. **Neurosci Behav Physiol.**, v.40, n.9, p.955-63, 2010.

MCCARTY R. Stress, behavior and experimental hypertension. **Neurosci Biobehav Rev.** 7(4):493-502, 1983.

MCCARTY, R. Learning about stress: neural, endocrine and behavioral adaptations. *Stress*, 1-30, 2016.

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

MCEWAN, B.S. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. **Dialouges Clin. Neurosci.**, v. 8, p.367-381, 2003.

MCDOUGALL SJ; PAULL JRA; WIDDOP RE; LAWRENCE AJ; Restraint Stress: Differential Cardiovascular Responses in Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension.** V.35(1):126-129, 2000.

MCDOUGALL SJ; WIDDOP RE; LAWRENCE AJ. Central autonomic integration of psychological stressors: Focus on cardiovascular modulation. **Auton Neurosci Basic Clin.** 123(1-2):1-11, 2005.

MITSUSHIMA, D; MASUDA, J; KIMURA, F. Sex differences in the stress-induced release of acetylcholine in the hippocampus and corticosterone from the adrenal cortex in rats. **Neuroendocrinology** 78(4), 234-240, 2003.

MORIMOTO K; KURAHASHI Y; SHINTANI-ISHIDA K; KAWAMURA N; MIYASHITA M; UJI M; TAN N; YOSHIDA K. Estrogen replacement suppresses stress-induced cardiovascular responses in ovariectomized rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.287, n.5, p.H1950-6, 2004

NATELSON BH; OTTENWELLER JE; COOK JA; PITMAN D; MCCARTY R; TAPP WN. Effect of Stressor Intensity on Habituation of the Adrenocortical Stress Response. **Physiology & Behavior**, v.43, p.41-46, 1988.

NEGRAO CE; MOREIRA ED; SANTOS MC; FARAH VM; KRIEGER EM. Vagal function impairment after exercise training. **J Appl Physiol.**, v.72, n.5, p.1749-53, 1992.

NEKOOEIAN AA, LIM SL, MAN RY, PANG CC. Chronic 17beta-estradiol augments relaxant role of basal nitric oxide in blood vessels from rats with heart failure. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 1998.

NOSCHANG, C.G; PETTENUZZO, L.F; VON POZZER TOIGO, E; ANDREAZZA, A.C; KROLOW, R; FACHIN, A; AVILA, M.C; ARCEGO, D; CREMA, L.M; DIEHL, L.A; GONCALVEZ, C.A; VENDITE, D; DALMAZ, C. Sex-specific differences on caffeine consumption and chronic stress-induced anxiety-like behavior and DNA breaks in the hippocampus. **Pharmacol Biochem Behav** 94(1), 63-69, 2009.

OLIVEIRA SA JR; OKOSHI K; LIMA-LEOPOLDO AP ET. Nutritional and cardiovascular profiles of normotensive and hypertensive rats kept on a high fat diet. *Arq Bras Cardiol* 93:526–533, 2009.

ORTIZ J; FITZGERALD LW; LANE S; TERWILLIGER R; NESTLER EJ. Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. **Neuropsychopharmacology.**, v.14, n.6, p.443- 52, 1996.

OWENS JF; STONEY CM; MATTHEWS KA. Menopausal status influences ambulatory blood pressure levels and blood pressure changes during mental stress. **Circulation.**, v.88, n.6, p.2794-802, 2004.

PADOVAN, C.M; GUIMARAES, F.S. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res* 33(1), 79-83, 2000.

PALATINI P; JULIUS S. Association of tachycardia with morbidity and mortality: pathophysiological considerations. **J Hum Hypertens.**, v.11, Suppl 1, p.S19-27, 1997.

PALATINI P, CASIGLIA E, PAULETTO P, STAESSEN J, KACIROTI N, JULIUS S. Relationship of tachycardia with high blood pressure and metabolic abnormalities: a study with mixture analysis in three populations. *Hypertension.*, v.30, n.5, p.1267-73, 1997.

PASTOR-CIURANA, J; RABASA, C; ORTEGA-SANCHEZ, J.A; SANCHIS-OLLE, M; GABRIEL-SALAZAR, M; GINESTA, M; BELDA, X; DAVIU, N; NADAL, R; ARMARIO, A. Prior exposure to repeated immobilization or chronic unpredictable stress protects from some negative sequels of an acute immobilization. **Behav Brain Res** 265, 155-162, 2014.

PELLOW, S; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol Biochem Behav** 24(3), 525-529, 1986.

PERROT-SINAL, T.S; GREGUS, A; BOUDREAU, D; KALYNCHUK, L.E. Sex and repeated restraint stress interact to affect cat odor-induced defensive behavior in adult rats. **Brain Res** 1027(1-2), 161-172, 2004.

PETTENUZZO LF; NOSCHANG C; VON POZZER TOIGO E; FACHIN A; VENDITE D; DALMAZ C. Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats. **Physiol Behav**. Oct 20;95(3):295-301, 2008.

PICKERING TG. Does psychological stress contribute to the development of hypertension and coronary heart disease? **Eur J Clin Pharmacol.**, v.39, n. Suppl 1, p.S1 7, 1990.

PONTIERI V, VENEZUELA MK, SCAVONE C, MICHELINI LC. Role of endogenous nitric oxide in the nucleus tractus solitarius on baroreflex control of heart rate in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, 1998.

PORTER, J.P; PHILLIPS, A; RICH, J; WRIGHT, D. Effect of chronic stress on the cardiac baroreflex in the post-weanling rat. **Life Sci** 75(13), 1595-1607, 2004.

PRUT, L; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol** 463(1-3), 3-33, 2003.

RADLEY, J.J; SAWCHENKO, P.E. Evidence for involvement of a limbic paraventricular hypothalamic inhibitory network in hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptations to repeated stress. **J Comp Neurol** 523(18), 2769-2787, 2015.

RECKELHOFF JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. **Hypertension.**, v.37, n.5, p.1199-208, 2001.

RESSTEL, L.B.; TIRAPELLI, C.R.; LANCHOTE, V.L.; UYEMURA, S.A.; DE OLIVEIRA, A.M. e CORREA, F.M. Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. **Life Sci**, v.78, n.19, Apr 4, p.2179-87. 2006.

RIVIER, C. Gender, sex steroids, corticotropin-releasing factor, nitric oxide, and the HPA response to stress. **Pharmacol Biochem Behav** 64(4), 739-751, 1999.

ROMAN O; SERES J; POMETLOVA M; JURCOVICOVA J. Neuroendocrine or behavioral effects of acute or chronic emotional stress in Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats. **Endocr Regul.** 38(4):151-5, 2004.

ROMEO RD. Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. **Front Neuroendocrinol.**, v.31, n.2, p.232-40, 2010.

ROZANSKI A; BLUMENTHAL JA; KAPLAN J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. **Circulation.** Apr 27;99(16):2192-217, 1999.

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

SARNYAI, Z; BIRO, E; PENKE, B; TELEGDY, G. The cocaine-induced elevation of plasma corticosterone is mediated by endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in rats. **Brain Res** 589(1), 154-156, 1992.

SATO T; NARA Y; KATO Y; YAMORI Y. Effects of high-calorie diet on blood pressure and sodium retention in spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar-Kyoto rats. **J Diabetes Complications** 9:220–223, 1995.

SCHWARTZ PJ; LA ROVERE MT; VANOLI E. Autonomic nervous system and sudden cardiac death. Experimental basis and clinical observations for post-myocardial infarction risk stratification. **Circulation**. 85 (Suppl 1): 177–91, 1992.

SCHEUER D A; MIFFLIN SW. Repeated intermittent stress exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol**. 274(2 Pt 2):R470-R475, 1998.

SGOIFO A; CARNEVALI L; GRIPPO AJ; The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. **Neurosci Biobehav Rev**. 39:51-60, 2014.

SHEN S; INGENITO AJ. Depressor effect of kappa opioid agonist on hypertension induced by isolation in the rat. **Clin Exp Hypertens.**, v.21, n.3, p.275-97, 1999.

SHIMIZU I; MINAMINO T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. **J Mol Cell Cardiol**. 97:245-62, 2016.

SHIMOJO GL; PALMA RK; BRITO JO; SANCHES IC I;RIGOYEN MC; DE ANGELIS K. Dynamic resistance training decreases sympathetic tone in hypertensive ovariectomized rats. **Braz J Med Biol Res**. 48(6):523-7, 2015.

SLEZAK P; PUZSEROVA A; BALIS P, et al. Genotype-Related Effect of Crowding Stress on Blood Pressure and Vascular Function in Young Female Rats. 2014.

SMETANA P. Sex differences in cardiac autonomic regulation and in repolarisation electrocardiography. 2013.

SOLOMON, M.B; HERMAN, J.P; Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. **Physiol Behav** 97(2), 250-258, 2009.

SOUZA, HC; BALLEJO G; SALGADO MC; Da SILVA VJ; SALGADO HC. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 280, p. H844– H850, 2001.

SOWERS, J; TUCK, M; ASP, N.D; SOLLARS, E. Plasma aldosterone and corticosterone responses to adrenocorticotropin, angiotenzin, potassium and stress in spontaneously hypertensive rats. **Endocrinology**. 108, 1216–1221, 1981

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

SPEAR LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.24, n.4, p.417- 63, 2000.

STAESSEN J; BULPITT CJ; FAGARD R; LIJNEN P; AMERY A. The influence of menopause on blood pressure. **J Hum Hypertens.**, v.3, n.6, p.427-33, 1989.

STAESSEN JA; GINOCCHIO G; THIJS L; FAGARD R. Conventional and ambulatory blood pressure and menopause in a prospective population study. **J Hum Hypertens.**, v.11, n.8, p.507-14, 1997.

STALLONE JN, CROFTON JT, SHARE L. Sexual dimorphism in vasopressin-induced contraction of rat aorta. **Am J Physiol**, 1991.

STANLEY, S.C; BROOKS, S.D; BUTCHER, J.T; D'AUDIFFRET, A.C; FRISBEE, S.J; FRISBEE, J.C. Protective effect of sex on chronic stress- and depressive behavior-induced vascular dysfunction in BALB/cJ mice. **J Appl Physiol** (1985) 117(9), 959-970, 2014.

STONE EA; QUARTERMAIN D. Greater behavioral effects of stress in immature as compared to mature male mice. **Physiol Behav.**, v.63, n.1, p.143-5, 1997.

SVED, A. F; GORDON, F. J. Amino acids as central neurotransmitter in the baroreceptor reflex pathway. **News in Physiological Science**, v. 9, p. 243-246, 1994.

STEPTOE, A; KIVIMAKI, M. Stress and cardiovascular disease. **Nat Rev Cardiol** 9(6), 360-370, 2012.

STEIN PK; KLEIGER RE; ROTTMAN JN. Differing effects of age on heart rate variability in men and women. **Am J Cardiol**. Aug 1;80(3):302, 1997.

STERRENBURG L; GASZNER B; BOERRIGTER J; SANTBERGEN L, et al. Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. **PLoS One**. 6(11):e28128, 2011.

STERLEY T; HOWELLS FM, RUSSELL VA. Effects of early life trauma are dependent on genetic predisposition : a rat study. v.1-14, 2011.

SPINEDI, E; AGUADO, L; BASILOTTA, G; CARRIZO, D. Angiotenzin II and glucocorticoid release: direct effect al the adrenal level and modulation of the adrenocorticotropin-induced glucocorticoids release. **J. Endocrinol. Invest.** 12, 321–327, 1989.

SUDHIR K, ELSER MD, JENNINGS GL, KOMESAROFF PA. Estrogen supplementation decreases norepinephrine-induced vasoconstriction and total body norepinephrine spillover in perimenopausal women. **Hypertension**, 1997.

SUDO A; HEALTH I; MAY R. Corticosterone of Stress in Rats. v.101-111, 1993.

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

TAMARGO J, PÉREZ O, DELPÓN E, GARCÍA-RAFANELL J, GÓMEZ L, CAVALCANTI F. Cardiovascular effects of the novel potassium channel opener UR-8225. **J Cardiovasc Pharmacol**, 1995.

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



TER HORST, G.J; WICHMANN, R; GERRITS, M; WESTENBROEK, C; LIN, Y. Sex differences in stress responses: focus on ovarian hormones. *Physiol Behav* 97(2), 239-249, 2009.

THORIN E; PHAM-DANG M; CLEMENT R; MERCIER I; CALDERONE A. Hyper-reactivity of cerebral arteries from ovariectomized rats: therapeutic benefit of tamoxifen. **Br J Pharmacol.**, v.140, n.7, p.1187-92, 2003.

TOTH, Z.E; ZELENA, D; MERGL, Z; KIRILLY, E; VARNAI, P; MEZEY, E; MAKARA, G.B;PALKOVITS, M. Chronic repeated restraint stress increases prolactin-releasing peptide/tyrosine-hydroxylase ratio with gender-related differences in the rat brain. **J Neurochem** 104(3), 653-666, 2008.

TRICHOPOULUS NC; FROHLICH ED. Similarities of Genetic (Spontaneous) Hypertension. **Circ Res** 48: 309-19, 1981.

TRIPPODO NC, FROHLICH ED. Similarities of Genetic (Spontaneous) Hypertension. **Circ Res** 48: 309-19, 1981.

ULRICH-LAI, Y.M; HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci**, 10, n. 6, p. 397-409, 2009.

VAN DEN BUUSE M; LAMBERT G; FLUTTERT M; EIKELIS N. Cardiovascular and behavioural responses to psychological stress in spontaneously hypertensive rats: effect of treatment with DSP-4. **Behav Brain Res.**, 119(2):131-42, 2001.

VENDRUSCOLO LF; VENDRUSCOLO JCM; TERENCE-RIGALDIE E, et al. Genetic influences on behavioral and neuroendocrine responses to predator-odor stress in rats. **Neurosci Lett.**;409(2):89-94, 2006.

VYAS, A; MITRA, R; SHANKARANARAYANA RAO, B.S; CHATTARJI, S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. **J Neurosci** 22(15), 6810-6818, 2002.

WALF, A.A; FRYE, C.A. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regimen may be modulated by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. **Neuropsychopharmacology** 30(7), 1288-1301, 2005.

WEBB RC, BOHR DF. Regulation of vascular tone, molecular mechanisms. **Prog Cardiovasc Dis.** 1981.

WESTENBROEK C; TER HORST GJ; ROOS MH; KUIPERS SD; et al. Gender-specific effects of social housing in rats after chronic mild stress exposure. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** Feb;27(1):21-30, 2003.

WEINSTOCK, M; RAZIN, M; SCHORER-APELBAUM, D; MEN, D; MCCARTY, R. Gender differences in sympathoadrenal activity in rats at rest and in response to footshock stress. **Int J Dev Neurosci** 16(3-4), 289-295, 1998.

WEISSMAN, M.M; BLAND, R.C; CANINO, G.J; FARAVELLI, C; GREENWALD, S; HWU, H.G; et al. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. **JAMA** 276(4), 293-299, 1996.

WEXLER BC; MCMURTRY JP. Differences in adrenal, ascorbic acid, circulating corticosterona and aldosterone in SHR and WKy.573-579, 1982.

WILLNER P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology (Berl).** v.134:319-29, 1997.

WOO ND; MUKHERJEE K; GANGULY PK. Norepinephrine levels in paraventricular nucleus of spontaneously hypertensive rats: role of neuropeptide Y. **Am J Physiol** 265:H893–H898, 1993.

XU L; BLOEM B; GASZNER B; ROUBOS EW; KOZICZ T. Stress-related changes in the activity of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and nesfatin neurons in the midbrain non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat. **Neuroscience.** Oct 13;170(2):478-88, 2010.

XING Y; HE J; HOU J; LIN F; TIAN J; KURIHARA H. Gender differences in CMS and the effects of antidepressant venlafaxine in rats. *Neurochem Int.* Nov;63(6):570-5, 2013.

YANG, H.J; KIM, K.Y; KANG, P; LEE, H.S; SEOL, G.H. Effects of *Salvia sclarea* on chronic immobilization stress induced endothelial dysfunction in rats. **BMC Complement Altern Med** 14, 396, 2014.

YANG H; DUROCHER JJ; LARSON RA; CARTER JR. Role of the ovarian cycle on neural cardiovascular control in sleep-deprived women. **J Appl Physiol.** 2015;118(4):419-426. doi:10.1152/jappphysiol.00626.2014.

YAMORI Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed.). *Experimental and Genetic Models of Hypertension. Handbook of Hypertension.* Elsevier, 224-39, 1984.

YOON,S.H; KIM,B.H; YE,S.K; ANDKIM, M.H. Chronic non - social stress affects depressive behaviors but not anxiety in mice. **KoreanJ.Physiol. Pharmacol.** 18,263–268.doi:10.4196/kjpp.2014.18.3.263, 2014.

ZAVALA JK; FERNANDEZ AA; GOSSELINK KL. Female responses to acute and repeated restraint stress differ from those in males. **Physiol Behav.** Aug 3;104(2):215-21, 2011.

ZELENA, D; HALLER, J; HALASZ, J; MAKARA, G. B. Social stress of variable intensity: Physiological and behavioral consequences. **Brain Res. Bul., New York,** v. 48, n. 3, p. 297-302, 1999.

ZHANG W; THORÉN P. Hyper-responsiveness of adrenal sympathetic nerve activity in spontaneously hypertensive rats to ganglionic blockade, mental stress and neuroglucopenia. **Pflugers Arch.** 437(1):56-60, 1998.

ZUCCHI,F.C;KIRKLAND,S.W;JADAVJI,N.M;VANWAES,L.T;KLEIN,A;SUPINA,R.D. Predictable stress versus unpredictable stress: a comparison in a rodent model of stroke. **Behav. BrainRes.** 205,67–75, 2009.