# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Efeitos do estresse crônico sobre as respostas cardiovasculares e ventilatórias ativadas pelo quimiorreflexo e barorreflexo em ratos

Egidi Mayara Firmino Silva

RIBEIRÃO PRETO

Egidi Mayara Firmino Silva

Efeitos do estresse crônico sobre as respostas cardiovasculares e ventilatórias ativadas pelo quimiorreflexo e barorreflexo em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Resstel

Barbosa Moraes

RIBEIRÃO PRETO

2015

2

## AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto/USP

## Firmino, Egidi Mayara Silva

Efeito do estresse crônico sobre as respostas cardiovasculares e ventilatórias ativadas pelo quimiorreflexo e barorreflexo em ratos/ Egidi Mayara Firmino Silva; orientador: Leonardo Resstel Barbosa Moraes. – Ribeirão Preto, 2015.

150 f.

Dissertação (Mestrado)--Universidade de São Paulo, 2015.

1. Estresse crônico 2. Barorreflexo 3. Quimiorreflexo. 4. Fluoxetina. 5. Variabilidade da frequência cardíaca.

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

## Firmino, Egidi Mayara Silva

Efeitos do estresse crônico sobre as respostas cardiovasculares e ventilatórias ativadas pelo quimiorreflexo e barorreflexo em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em:	/ / 2015
--------------	----------

## Banca Examinadora

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes	
Instituição: FMRP-USP	Assinatura:
Prof. Dr. Daniel Penteado Martins Dias	
Instituição: FMRP-USP	Assinatura:
Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal	
Instituição: FMRP-USP	Assinatura:

# Aos meus pais

Pelo incentivo, paciência, força, coragem e compreensão nos momentos em que estive ausente e principalmente por todo apoio que recebi ao longo dessa jornada. Muito obrigada!

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que é essencial em minha vida, que iluminou o meu caminho e me deu força e coragem durante toda esta longa caminhada.

A minha família, por todo apoio e carinho recebido todos os dias. Mesmo longe esteve presente compartilhando todos os momentos tristes e alegres.

Ao Prof. Leonardo Resstel, meu agradecimento por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse aprender e evoluir academicamente e como pessoa. Obrigada pela confiança e todos os ensinamentos. Aprendi muito durante esses anos.

Aos professores da banca examinadora: Dr. Daniel Penteado e Dr. Daniel Zoccal por terem aceitado gentilmente fazer parte da apresentação desta dissertação.

Aos Prof. Morgan e Francisco Guimarães por abrirem as portas dos seus laboratórios e pela imensa contribuição na minha formação.

Ao Daniel Penteado pela disponibilidade de ter me ajudado e me ensinado novas técnicas que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos amigos de laboratório, Luciana, Davi, Sara, Anna Bárbara, Teo, Cassiano, Gabi, Ana Terzian, Jéssica, Aline Fassine, Leandro, Daniela, Cassiano e Daniel por todos os ensinamentos. Vocês tornaram meus dias mais felizes, foi muito bom compartilhar conhecimento e carinho com vocês.

A Luciana Kuntze (lú) pela tutoria e ao Davi (Davizinho) por terem me acompanhado durante todo esse tempo. Muito obrigada pelos ensinamentos, contribuição, paciência, incentivo, amizade e conselhos. Tudo isso foi além do laboratório. Aprendi coisas com vocês que levarei por toda a vida. Vocês foram fundamentais para a realização desse trabalho. Muito obrigada.

Agradeço a Daniela, ao Leandro e a Morgana pela convivência diária. Lê, obrigada pelo incentivo lá no início, por ter aberto as portas da sua casa e ter me recebido tão bem. Dani, muito obrigada pelo companheirismo de todos os momentos, seja em casa ou no laboratório, foi muito bom ter você ao meu lado.

Aos amigos do Laboratório do Prof. Guimarães, Nicole (Nika), Alice, Naiely, Carla, Andreza e Manu por todos os momentos agradáveis dentro e fora do laboratório.

Aos amigos do laboratório do Prof. Dr. Fernando Morgan: Cris, América, Eduardo, Aline, Silvana e Taiz, obrigado pelo prazer da amizade de vocês.

Aos amigos de Alagoas, em especial Day, César, Giga, Tamires, Laryssa, Renata, Gorete, Mariana e Kristiana que mesmo de longe partilharam todos os momentos de dificuldade e alegria ao meu lado. Em todos os momentos eles me deram forças pra me manter firme.

Aos técnicos Laura e Orlando por todas as instruções, assistência técnica, paciência, amizade. A ajuda de vocês foi fundamental para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Waldik, Soninha e Fátima pela disposição em atender prontamente nossas questões burocráticas, pelos momentos de risada e pelas broncas quando necessário.

Com certeza conviver e compartilhar o dia a dia com todos vocês deixou o trabalho muito mais fácil e prazeroso. A todos muito obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

## LISTA DE ABREVIATURAS

5HT - Serotonina

cNTS - Núcleo do trato solitário comissural

CVLM - Bulbo ventrolateral caudal

ECR – Estresse crônico repetido

ECV – Estresse crônico variado

FC – Frequência cardíaca

FFT – Transformada rápida de Fourier

f<sub>R</sub> – Frequência respiratória

G - Ganho

GABA – Ácido gama-aminobutírico

HF – High Frequency

HRV - Variabilidade da frequência cardíaca

HVR - Reposta ventilarória hipóxica

Hz - Hertz

IP - Intervalo de pulso

ISRS – Inibidores seletivos da recaptação de serotonina

KCN - Cianeto de potássio

LF - Low Frequency

NPS - Nitroprussiato de sódio

NTS - Núcleo do trato solitário

P1 – Platô mínimo da frequência cardíaca

P2 – Platô máximo da frequência cardíaca

PA – Pressão arterial

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

PAP – Pressão arterial pulsátil

PAS – Pressão arterial sistólica

Pn – Pós natal

PSD – Densidade espectral da potência

Range –  $\Delta$ frequência cardíaca, batimento por minuto, diferença entre P1 e P2

RVLM – Bulbo ventrolateral rostral

SBR - Sensibilidade do barorreflexo

SNA – Sistema nervoso autônomo

SSRIs – Inibidores seletivos da recaptação de serotonina

V<sub>E</sub> – Ventilação minuto

VLF – Very Low Frequency

V<sub>T</sub> − Volume corrente

ΔFC – Delta da frequência cardíaca

Δf<sub>R</sub> – Delta da frequência respiratória

ΔPA – delta da pressão arterial

## **RESUMO**

O organismo está sujeito a diversos estímulos estressantes que afetam processos fisiológicos. Embora as alterações de pressão arterial e frequência cardíaca sejam comuns frente à exposição ao estresse, elas podem variar de acordo com os diferentes estressores, tipo de estresse, duração, frequência e intensidade do estímulo aversivo utilizado. O estresse é capaz de alterar em animais a regulação autonômica e reflexos respiratórios, como a atividade do barorreflexo, quimiorreflexo e variabilidade da frequência cardíaca. Além disso, o estresse também é capaz de alterar o comportamento, que são melhorados com o uso de antidepressivos, como a fluoxetina. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o mesmo tipo de estressor (homotípico) (heterotípico) modulam ou diferentes estressores as respostas cardiovasculares e respiratórias ativadas pelo barorreflexo e quimiorreflexo, respectivamente, além da variabilidade da frequência cardíaca. Além disso, verificar se o tratamento com crônico ou agudo com fluoxetina é capaz de prevenir as alterações ocasionas pelo estresse crônico. Para isto, foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 350 a 500g que foram submetidos ao estresse crônico repetido (ECR, homotípico) ou estresse crônico variado (ECV, heterotípico) durante 14 dias consecutivos. Sete dias antes do início dos protocolos de estresse crônico foi iniciado o tratamento com fluoxetina agudo, onde os animais só receberam fluoxetina no dia do experimento ou crônico, em que os animais receberam fluoxetina todos os dias até o dia do experimento, completando 21 dias de tratamento. Os animais ECR e ECV apresentaram uma menor preferência por sacarose, demonstrando comportamento de anedonia, que foi prevenida com o tratamento crônico com fluoxetina. Adicionalmente, ambos os protocolos de estresse demonstraram uma tendência ao aumento nos níveis de corticosterona basais, no entanto os resultados não foram significativos. Ambos os grupos de estresse crônico também apresentaram uma diminuição no peso corporal, entretanto os animais do grupo controle e ECR tratados cronicamente com fluoxetina apresentaram uma diminuição pronunciada do peso corporal quando comparados com seus controles. O ECR aumentou os componentes taquicárdico e bradicárdico do

barorreflexo, adicionalmente, o tratamento crônico com fluoxetina preveniu o aumento dos componentes simpático e parassimpático do barorreflexo, porém induziu a redução desses componentes no grupo controle. O tratamento agudo com fluoxetina diminuiu apenas o componente bradicárdico de todos os grupos estressados e controle. Ambos os protocolos de estresse crônico promoveram uma diminuição na modulação simpato-vagal e no ganho do barorreflexo espontâneo, indicando uma hiperatividade simpática, que foi reduzida pelo tratamento crônico e agudo com fluoxetina. Entretanto o tratamento agudo aumentou o número de sequências barorreflexas do tipo UP (aumentos sucessivos de pressão arterial). O ECR e ECV também atenuaram a magnitude da resposta pressora frente à ativação do quimiorreflexo, que foi prevenida com ambos os tratamentos com fluoxetina. Os protocolos de estresse diminuíram os parâmetros basais de ventilação minuto (V<sub>E</sub>), volume corrente (V<sub>T</sub>) e aumentou a frequência respiratória (fR), além de aumentar a magnitude da frequência respiratória frente (Δf<sub>R</sub>) a ativação do quimiorreflexo. No mesmo sentido, os tratamentos com fluoxetina aumentaram a magnitude da Δf<sub>R</sub>, porém apenas o tratamento crônico com fluoxetina preveniu as alterações no parâmetros basais respiratórios de V<sub>T</sub> e f<sub>R</sub>. Os achados do presente estudo demonstram que o estresse crônico provoca comportamento do tipo depressivo, além de alterar as respostas autonômicas de barorreflexo e quimiorreflexo e variabilidade cardiocirculatória (PAS e IP), o que pode desencadear patologias no sistema cardiovascular e respiratório. Adicionalmente, nosso trabalho é um dos primeiros a demonstrar que o tratamento crônico com fluoxetina previne a maioria das alterações ocasionadas pelo estresse crônico frente a essas alterações autonômicas.

## **ABSTRACT**

The body is submitted to various stressful stimuli that may affect many physiological processes. Although blood pressure and heart rate oscilations are common during exposure to stress, they can vary according to the different stressors type, duration, frequency and intensity of the aversive stimulus. Several studies suggest that stress can alter the autonomic regulation and respiratory reflexes, such as the baroreflex, chemoreflex activities and heart rate variability. In addition to cardiovascular disorders, chronic stress can also induce behavioral changes that are similar to depression in humans and are reversed by antidepressants, such as fluoxetine. In this way, the present study aimed to assess whether the same type of stressor (homotypic) or different stressors (heterotypic) are able to alter cardiovascular and respiratory responses activated by baroreflex and chemoreflex, respectively. We also aimed to verify the heart rate variability and if the chronic treatment with fluoxetine is able to prevent occasional alterations by chronic stress. For this purpose, male Wistar rats were used, weighing between 350 -500g. They underwent repeated chronic stress (RCS, homotypic) or unpredictable chronic stress (UCS, heterotypic) for 14 consecutive days. Seven days before starting the stress protocols was started the chronic or acute treatment with fluoxetine, until the day of the experiment, completing 21 days of treatment. The RCS and UCS animals have a lower preference for sucrose, demonstrating anhedonia behavior, which was prevented by chronic treatment with fluoxetine. Additionally, both stress protocols showed a tendency to increase basal levels of corticosterone, but the results were not significant. Our results showed that both stress groups have a decrease in body weight, however the control animals and RCS chronically treated with fluoxetine showed a marked decrease in body weight compared to their controls. The RCS increased tachycardia and bradycardia baroreflex components, however chronic treatment with fluoxetine prevented the increase of the sympathetic and parasympathetic components of the baroreflex, but induced a reduction of these components in the control group. Acute treatment with fluoxetine only decreased bradycardic component

of all stressed and control groups. Both chronic stress protocols showed a decrease in sympathovagal modulation and spontaneous baroreflex gain, indicating a sympathetic hyperactivity that was decreased by chronic and acute treatment with fluoxetine. Acute fluoxetine treatment increased baroreflexs sequences up. The RCS and UCS also attenuated the magnitude of pressor response, which was prevented by both treatments with fluoxetine. Stress protocols decreased the baseline parameters of VE, VT and increased fR, and increase the magnitude of the respiratory frequency ( $\Delta f_R$ ) by chemoreflex activation. Both treatment with fluoxetine further increased the magnitude of  $\Delta f_{R}$ , but only chronic treatment with fluoxetine prevented the alterations in respiratory baseline parameters V<sub>T</sub> and f<sub>R</sub>. The findings of this study demonstrate that chronic stress causes the depressive-like behavior, and change the autonomic responses of baroreflex and chemoreflex and cardiocirculatory variability (PAS and IP), which can trigger diseases in the cardiovascular and respiratory system. In addition, our work is one of the first to show that chronic treatment with fluoxetine prevents most of the changes caused by chronic stress face these autonomic changes.

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	. 24
2.	OBJETIVOS	. 38
	2.1 Objetivo Geral:	. 38
	2.2 Objetivos Específicos:	. 38
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	. 40
	3.1 Animais	. 40
	3.2 Protocolos de estresse crônico	. 40
	3.2.1 Estresse por restrição repetido	. 41
	3.2.2 Estresse crônico variado	. 41
	3.3 Tratamento com fluoxetina	. 41
	3.4 Teste comportamental	. 44
	3.5 Canulação da artéria e veias femorais	. 45
	3.6 Medida de corticosterona plasmática	. 45
	3.7 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca	. 46
	3.8 Avaliação da atividade barorreflexa	. 46
	3.9 Método de análise barorreflexa	. 47
	3.10 Variabilidade da frequência cardíaca	. 48
	3.11 Sensibilidade do barorreflexo espontâneo	. 49
	3.13 Registro da ventilação e análise dos dados	. 50
	3.14 Análise da frequência respiratória	. 51
	3.15 Análise do volume corrente e da ventilação minuto nos animais	. 51
	3.16 Registros simultâneos da pressão arterial, frequência cardíaca e ventilação .	. 53
	3.17 Soluções e drogas utilizadas	. 54
4.	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	. 54
	4.1 Desenho experimental dos protocolos de estresse crônico e tratamento o fluoxetina sobre os parâmetros cardiovasculares e respiratórios	
	4.2 Efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo, variabilidade frequência cardíaca e quimiorreflexo	
	4.3 Efeito do estresse crônico e tratamento crônico com fluoxetina durante 21 de sobre a atividade do barorreflexo, variabilidade da frequência cardíaca quimiorreflexo.	a e
	4.4 Efeito do estresse crônico e tratamento agudo com fluoxetina sobre a ativida do barorreflexo, variabilidade da frequência cardíaca e quimiorreflexo	
5.	ANÁLISE DOS RESULTADOS	. 58

6. RESULTADOS......61 6.1 Efeito do estresse crônico sobre o comportamento dos animais (teste de preferência por sacarose)......61 6.4 Efeito do tratamento com fluoxetina crônico e agudo frente às alterações ocasionadas pelo estresse crônico sobre o peso corporal dos animais.......64 6.5 Efeitos do estresse crônico sobre os parâmetros cardiovasculares basais....... 67 6.6 Efeito do tratamento com fluoxetina crônico e agudo frente às alterações ocasionadas pelo estresse crônico sobre os parâmetros cardiovasculares basais.. 67 6.7 Experimento da atividade do barorreflexo em ratos submetidos ao estresse 6.7.1 Efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo .......71 6.7.2 Efeito do tratamento crônico com fluoxetina sobre as alterações provocadas 6.8 Efeito do estresse crônico sobre a variabilidade da frequencia cardíaca (PAS e IP) e sensibilidade barorreflexa espôntanea......78 6.9 Efeito do tratamento com fluoxetina sobre a variabilidade da frequencia cardíaca 6.10 Experimento de ativação do quimiorreflexo em ratos submetidos ao estresse crônico. 98 6.10.1 Respostas cardiovasculares e ventilatórias à ativação do quimiorreflexo com KCN (40 µg/0,05 mL) em animais submetidos ao estresse crônico..............98 6.10.2 Efeito do tratamento crônico e agudo com fluoxetina nas respostas cardiovasculares e ventilatórias à ativação do quimiorreflexo com KCN (40 µg/0,05 7. DISCUSSÃO ......112 8. CONCLUSÃO......129 9. REFERÊNCIAS......131 10. APÊNDICES.......143

## 1. INTRODUÇÃO

O termo estresse foi definido inicialmente por Seyle (1976) como sendo uma resposta não específica do organismo a qualquer fator que coloque em risco a homeostase do indivíduo. Constantemente o organismo está sujeito a diversos estímulos estressantes que afetam inúmeros processos fisiológicos (Marin et al., 2007). De acordo com Nakata et al., (1993) o estresse altera o sistema imunológico, sistema endócrino, sistema nervoso central, além de alterar respostas cardiovasculares, tais como pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC).

No entanto, embora as alterações de PA e FC sejam comuns frente à exposição ao estresse, elas podem variar de acordo com diferentes estressores (Crestani et al., 2010c). Devido a isto, vários estudos realizados em humanos e animais têm apontado associação entre estresse, arritmias cardíacas e hipertensão (Grippo et al., 2002, 2008) e sugerem que estressores ambientais podem influenciar a regulação autonômica e patogênese das doenças cardiovasculares (Carpeggiani and Skinner, 1991). Sendo assim, vários estudos em modelos animais propõem que as alterações fisiológicas decorrentes à exposição ao estresse dependem de fatores tais como tipo do estresse, duração, frequência e intensidade do estímulo aversivo ao qual o animal é submetido (Natelson et al., 1988, Aguilera, 1998, Jankord and Herman, 2008).

Neste sentido, os estudos realizados têm utilizado diferentes protocolos de estresse psicológico, dentre os quais se destacam o estresse crônico variado (ECV), onde os animais são submetidos a diferentes estressores, ou

estresse crônico repetido (ECR), onde os animais são submetidos a um mesmo tipo de estressor (Magarinos and McEwen, 1995, Grippo et al., 2002, Ulrich-Lai and Herman, 2009). Entretanto, trabalhos mais recentes têm demonstrado que o ECR e o ECV em ratos afetam de maneiras diferentes o comportamento, peso corporal e secreção de corticosterona plasmática (Marti et al., 1994, Ortiz et al., 1996, Marin et al., 2007).

A exposição ao estresse crônico é conhecida por alterar os mecanismos básicos da resposta ao estresse. Marti et al., (1994) demonstraram que a exposição crônica ao estresse diminui o peso, ingestão de alimentos e involução de alguns órgãos como timo, baço e gânglios linfáticos. No mesmo sentido, Ortiz e colaboradores., (1996) relataram que animais expostos ao ECV, quando comparado com animais submetidos ao ECR apresentaram uma redução mais pronunciada no ganho de peso.

Sabe-se que uma das principais respostas endócrinas ao estresse é dada através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o que resulta em um rápido aumento de glicocorticóides circulantes (Aguilera, 1998, Levine, 2005). O estresse fisiológico, ou psicológico, ativa o eixo HPA, tendo como resultado a liberação do hormônio liberador de corticotrofina através do hipotálamo na circulação hipotálamo-hipofisária, estimulando dessa forma a liberação do hormônio adrenocorticotrópico pela pituitária para a circulação geral, este por sua vez, estimula a liberação sistêmica de glicocorticoides pelo córtex da glândula supra-renal (Kolber et al., 2008, Myers et al., 2014).

Os glicocorticóides têm como função preparar o organismo para desafios fisiológicos ou ambientais e são importantes para a consolidação da resposta ao estresse (Peeters and Broekkamp, 1994). No entanto, o estresse intenso ou

exagerado pode tornar o eixo hiperreativo, com prejuízos potenciais ao organismo (Huether et al., 1999). As mudanças ocasionadas pelo estresse crônico nas respostas fisiológicas e comportamentais podem estar relacionadas a adaptações do eixo HPA. Essas adaptações, em roedores podem ser monitoradas através da dosagem dos níveis de corticosterona em resposta ao estresse (Magarinos and McEwen, 1995).

Segundo Cruz et al., (2012) o ECV e o ECR provocam diferentes efeitos sobre a atividade do eixo HPA. Por exemplo, animais que são submetidos ao ECR apresentam uma habituação na liberação de corticosterona quando são desafiados novamente por uma exposição aguda frente ao estresse de restrição (Cruz et al.,2012). No entanto, animais que passaram pelo ECV apresentam maior aumento dos níveis de corticosterona quando os animais são expostos novamente a uma sessão de estresse agudo de restrição (Magarinos and McEwen, 1995, Gadek-Michalska and Bugajski, 2003).

De acordo com Herman, (2013) o efeito do estresse crônico é capaz de gerar um processo de habituação, o que diminui as respostas do eixo HPA após a exposição repetida ao mesmo tipo de estressor. Por sua vez, a exposição ao estresse imprevisível, como no caso do ECV, provoca uma sensibilização do eixo HPA em respostas aos novos estressores, provocando dessa forma um aumento significativo da secreção de glicocorticóides (Jankord et al., 2011, Flak et al., 2012). Quando ocorre uma ativação crônica do eixo HPA, acontecem modificações fisiológicas, resultando em hipertensão, imunossupressão, e alterações comportamentais (McEwen, 2000, McEwen et al., 2012).

Além das alterações cardiovasculares, o estresse crônico também pode desempenhar um papel importante na alteração do comportamento em animais, conhecido como anedonia (diminuição ou ausência da capacidade de sentir prazer), semelhante à depressão em humanos (Willner et al., 1992). A depressão é evidenciada com um fator de risco significativo para eventos cardíacos recorrentes em doentes com doença arterial coronariana estabelecida, além disso, a maioria dos pacientes que morrem de enfarte do miocárdio, de 20% a 50% têm associações anteriores de depressão (Glassman and Shapiro, 1998). Nesse sentido, a maior parte dos modelos animais de depressão são induzidos pela exposição incontrolável ao estresse. Essa exposição ao estresse gera uma mudança de comportamento que são atenuadas pela utilização de antidepressivos, como a fluoxetina que é um inibidor da recaptação de serotonina (SSRIs) (Willner, 1990). Entretanto, algumas evidências sugerem que os SSRIs estão associados com efeitos cardiovasculares secundários (Pacher and Kecskemeti, 2004).

Alguns estudos demonstram que a fluoxetina, bem como outros SSRIs, podem alterar os potenciais de membrana e canais de íons em células cardíacas e vasculares (Ungvari et al., 2000, Pacher and Kecskemeti, 2004). Embora alguns estudos tenham investigado o efeito do tratamento crônico com fluoxetina nas respostas cardiovasculares ao estresse, os resultados são contraditórios (Grippo et al., 2006, Roche et al., 2007) em virtude dos diferentes estressores e da duração do estresse empregado (McDougall et al., 2005).

Sendo assim, sabe-se que a ligação entre a depressão e a alterações cardiovasculares pode ser mediada em parte por mecanismos autônomos que contribuem para a regularização da função cardiovascular (Grippo et al., 2008).

Sabe-se, ainda, que o estresse pode levar a alterações no sistema circulatório, dependendo do tipo de estressor envolvido (Esch et al., 2002), uma vez que a exposição ao estresse provoca o aumento da PA e da FC (Irvine et al., 1997, Barres et al., 2004, Carrive, 2006, Tavares and Correa, 2006). Adicionalmente, alterações cardiovasculares provocadas por pelo estresse crônico são seguidas por alterações da atividade do barorreflexo (Duarte et al., 2015a)

O barorreflexo é um dos mecanismos neurais responsáveis pelo ajuste em curto prazo da PA através da modulação de atividades simpática e parassimpática para o sistema cardiovascular, influenciando FC e resistência vascular (Huang et al., 2010). Os barorreceptores estão presentes em terminações nervosas encontradas no seio carotídeo e no arco aórtico que respondem a alterações na pressão arterial (Papademetriou et al., 2011). Estes receptores são capazes de responder ao estiramento arterial, pois possuem canais iônicos sensíveis a estímulos mecânicos, conhecidos como "degenerin/epithelial Na+ channels" (DEG/ENaC). Estes canais são permeáveis a íons, devido a isto permitem o influxo de sódio e cálcio, causando a despolarização da membrana (Drummond et al., 2001, Papademetriou et al., 2011).

Com o aumento da pressão arterial, ocorre uma distensão da parede dos vasos do seio carotídeo e arco aórtico, promovendo assim a ativação dos canais DEG/ENaC e a geração de potenciais de ação. Esses impulsos nervosos são conduzidos pelos nervos sinusal e depressor aórtico até o núcleo do trato solitário (NTS), localizado no bulbo (Papademetriou et al., 2011). O NTS é responsável por estimular os núcleos ambíguo e dorsal do vago, que são locais que possuem corpos celulares de neurônios pré-ganglionares parassimpáticos. Além disso, o NTS também é responsável por enviar

projeções excitatórias para bulbo ventrolateral caudal (CVLM) induzindo assim a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibitório, no bulbo ventrolateral rostral (RVLM), o qual envia projeções para neurônios pré-ganglionares simpáticos (Averill and Diz, 2000). Desta forma, ocorre a redução da atividade simpática e aumento do tônus vagal sobre o coração e vasos sanguíneos, reduzindo dessa maneira a frequência cardíaca, o retorno venoso e a resistência periférica total, contribuindo assim para a diminuição da pressão (Michelini and Morris, 1999).

No entanto, quando ocorre à diminuição da PA a frequência de disparo de potenciais de ação para o NTS é diminuída, desta forma, ocorre um menor estímulo dos neurônios parassimpáticos nos núcleos ambíguo e dorsal do vago, bem como uma diminuição da liberação de GABA no RVLM (Albaghdadi, 2007). Com isso, ocorrerá o aumento do tônus simpático, e diminuição da atividade parassimpática. O resultado disso será o aumento da FC e da resistência vascular periférica, elevando a pressão arterial. (Albaghdadi, 2007).

Segundo Sved and Gordon, (1994), quando os barorreceptores detectam alterações na PA, informações são direcionadas ao sistema nervoso central acerca dos níveis sistêmicos de pressão arterial, levando a respostas reflexas de resistência periférica e FC, com o objetivo de manter a pressão arterial com pequenas variações. Assim, o aumento da PA ativa barorreceptores, aumentando a atividade parassimpática cardíaca e diminuindo a atividade simpática (Michelini, 1994).

Crestani e colaboradores, (2010) demonstram que em ratos o estresse agudo por restrição foi capaz de aumentar o ganho da resposta taquicárdica do barorreflexo e diminuir a magnitude da resposta bradicárdica, sugerindo um

aumento da atividade simpática (Crestani et al., 2010c). Além disso, Grippo et al., (2008) demonstraram que ratos adultos expostos ao ECV apresentaram redução na resposta do barorreflexo induzida por diminuição da pressão arterial.

Segundo Engi et al.,(2012) o prejuízo da atividade do barorreflexo pode contribuir para a patogênese de várias doenças cardiovasculares. Nesse contexto, a reversão eficiente de mudanças autonômicas provocadas pelo estresse é importante para reduzir as chances de patologias que em longo prazo podem induzir alterações cardiovasculares (Crestani et al., 2010c).

Existem relatos na literatura que a fluoxetina reduz a pressão arterial em ratos hipertensos (Fuller et al., 1979), entretanto, segundo Crestani et al., (2011), ratos normotensos submetidos ao tratamento crônico com fluoxetina desenvolvem uma hipertensão leve. Adicionalmente, Crestani et al., (2011) relatam que o tratamento crônico com fluoxetina inibe o componente simpático da atividade do barorreflexo e facilita o componente parassimpático da atividade do barorreflexo.

Diante disso, observa-se que sistema nervoso autônomo (SNA) é muito importante na regulação dos processos fisiológicos, além de ser responsável em grande parte pelo controle do sistema cardiovascular (Aubert et al., 2003), desempenhando dessa forma um papel essencial no controle da PA e FC (Julius, 1991). Sendo assim, uma das formas que vem sendo bastante utilizadas para se avaliar o SNA é o estudo da variabilidade da frequência cardíaca (HRV). A FC varia batimento a batimento como resultado das adaptações promovidas pelo SNA para a manutenção do sistema cardiovascular (Malik and Camm, 1995). Estudos sugerem que alta HRV é sinal

de boa adaptação, entretanto baixa HRV é frequentemente um indicador de adaptação anormal e insuficiente do SNA (Pumprla et al., 2002).

Uma das formas de análise da HRV se dá através do domínio da frequência, como por exemplo, na análise espectral (Prado, 2005). A análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca é um método simples não invasivo para a quantificação da atividade do sistema nervoso autônomo através da identificação de valores sucessivos de FC, intervalo de pulso (IP) e PA, de oscilações rítmicas em diversas frequências, que podem refletir a modulação parassimpática ou simpática sobre o sistema cardiovascular (Akselrod et al., 1981, Task Force, 1996). Dessa forma, os componentes no domínio da frequência são: componente de alta frequência (High Frequency-HF), com variação de 0,75 a 3,00 Hz, que corresponde à modulação respiratória e é um indicador da atuação do nervo vago sobre o coração e componente de baixa frequência (Low Frequency-LF), com variação entre 0,20 e 0,75 Hz, através da modulação vagal e simpática sobre o coração, com predominância do simpático.

Recentemente, vários estudos em ratos têm investigado a os efeitos da exposição ao estresse repetido sobre a regulação autonômica cardíaca (Carnevali and Sgoifo, 2014). Segundo Duarte et al., (2015a) a exposição ao ECV e não ao ECR de ratos, aumentou o componente oscilatório de LF do IP. No entanto, em outro estudo, ratos que foram estressados sub-cronicamente (5 dias de choques nas patas) apresentaram um aumento no tônus vagal de descanso (Carnevali et al., 2011).

Essas alterações na HRV cardíaca também são observadas em modelos animais de depressão, como por exemplo, no modelo de derrota social, que é

um modelo onde um animal intruso é introduzido diariamente na *home cage* de animais socializados previamente Wood et al.,(2012). Em seus estudos, os ratos foram expostos a sete dias consecutivos de derrota social apresentando sintomas de um estado de tipo depressivo. Quarenta e oito horas após a última sessão de estresse, os ratos apresentaram redução da HRV e sinais de predomínio da modulação simpática. Segundo Grippo et al.,(2006) essa modulação anormal da FC no repouso pode ser parcialmente abolida pelo tratamento crônico com fluoxetina.

Sugere-se então que o estresse crônico é um fator de risco estabelecido para o coração e que indivíduos cronicamente estressados são frequentemente caracterizados por anomalias na regulação autonômica do coração, tais como tônus vagal reduzido e simpático elevado, que, por sua vez, podem induzir taquicardia, redução da HRV e alteração da função do reflexo barorreceptor (Rozanski et al., 1999, Barton et al., 2007)

Outra técnica que vem sendo bastante estudada relacionada à atividade autonômica é a sensibilidade dos barorreceptores (SBR) por meio do método de sequência. Em seus estudos, Duarte et al., (2015b) observou que animais adolescentes que são submetidos ao ECR apresentaram um aumento no número de sequências barorreflexas UP através da SBR. E esse aumento da atividade do barorreflexo tem sido relacionado à hiperatividade do tônus simpático e redução da modulação parassimpática para o coração (Grassi et al., 2004).

Além do barorreflexo, outro importante reflexo autonômico é o quimiorreflexo (Fitzgerald, 2000), um importante mecanismo neural que está envolvido no controle cardiovascular e respiratório. Este mecanismo age

integralmente junto com outros mecanismos de controle neural, como o barorreflexo arterial, com o objetivo de garantir a homeostase (Freet et al., 2013a).

Importantes agentes do quimiorreflexo são os quimiorreceptores periféricos e centrais que monitoram as concentrações de oxigênio e gás carbônico presentes no sangue (Freet et al., 2013a). Os quimiorreceptores periféricos respondem primariamente а hipóxia, entretanto, quimiorreceptores centrais respondem a hipercapnia (Freet et al., 2013a). Os quimiorreceptores periféricos localizam-se nos corpos carotídeos e aórtico e enviam aferências para o centro respiratório no bulbo, mais especificamente o NTS (Lugliani et al., 1971). Estes são formados por células quimiossensíveis que são responsáveis por detectar variações da pressão parcial de oxigênio (PO<sub>2</sub>) através de um mecanismo que envolve a elevação da concentração de cálcio intracelular perante mudanças na atividade mitocondrial (Duffin, 2010)

Durante situações de hipóxia aguda, ocorre à ativação quimiorreceptores periféricos, o que leva a ajustes respiratórios, que têm a função de restaurar os níveis de oxigênio aos níveis normais. Estas situações de hipóxia podem ser mimetizadas experimentalmente através da injeção intravenosa de baixas doses de cianeto de potássio (KCN) (Barros et al., 2002). O KCN é uma droga capaz de estimular o quimiorreflexo devido a sua interferência na utilização do oxigênio pelos tecidos, pois inibe a ação da enzima citocromo-oxidase da cadeia respiratória. Desta forma, produz-se um déficit energético celular associado à indisponibilidade de oxigênio, promovendo hipóxia citotóxica, levando, portanto, à ativação quimiorreceptores periféricos (Biscoe et al., 1969). As respostas fisiológicas à ativação dos quimiorreceptores periféricos com administração sistêmica KCN são caracterizadas por um aumento da frequência respiratória (f<sub>R</sub>) da PA e diminuição da FC (Franchini and Krieger, 1992).

A ativação dos quimiorreceptores periféricos gera impulsos que são conduzidos pelos nervos vago e glossofaríngeo para o bulbo, onde os terminais aferentes realizam a primeira sinapse na região comissural do núcleo do trato solitário (cNTS) (Paton et al., 2001). Alguns estudos sugerem que existe uma importante via que compõe a resposta simpatoexitatória do quimiorreflexo, devido à existência de projeções diretas do NTS para a área bulbar ventrolateral rostral (RVLM) (Sequeira et al., 2000, Freet et al., 2013b). Além disso, outros estudos demonstram que diferentes sub-regiões do NTS contêm terminais serotoninérgicos (Steinbusch, 1981, Maley and Elde, 1982). Dessa forma, existem muitos trabalhos na literatura que estabelecem uma relação entre o papel fisiológico dos quimiorreceptores periféricos com a os ajustes ventilatórios (Heymans and Bouckaert, 1930, Dalymde et al., 1965) e cardiovasculares (Franchini and Krieger, 1993, Marshall, 1994, Haibara et al., 1995), com o objetivo de garantir uma perfusão sanguínea adequada para os tecidos dentro dos níveis normais.

Alguns estudos demonstram que o estresse interfere na atividade respiratória e que a exposição ao estresse no início da vida altera a trajetória de desenvolvimento do sistema de controle respiratório (Bavis and Mitchell, 2008, Cayetanot et al., 2009). De acordo com Genest et al., (2004) animais previamente separados de suas mães no início da vida apresentam alterações ventilatórias como alteração do volume por minuto (VE) e alterações cardiovasculares como, por exemplo, aumento da PA. Estudos também relatam

que animais submetidos ao estresse neonatal apresentam alterações respiratórias e cardiovasculares semelhantes a pacientes que possuem síndrome obstrutiva do sono, além de se tornarem mais sensíveis à ativação do quimiorreflexo (Genest et al., 2004, Gulemetova et al., 2013).

Sendo assim, observa-se que existe uma ligação entre o estresse, alterações cardiovasculares e respiratória e, como citado anteriormente, animais que são submetidos ao estresse crônico apresentam comportamento do tipo depressivo, que são revertidos com o uso de inibidores da recaptação de serotonina (Willner et al., 1992). Baseado nisso, sabe-se que a serotonina (5-HT) desempenha um papel fundamental no controle da respiração (Bianchi et al., 1995) e que regiões do cérebro e bulbo estão envolvidas com o controle respiratório por receber entradas serotoninérgicas principalmente a partir dos núcleos da rafe (Li et al., 1993). A maioria dos neurônios presentes nesses núcleos são heterogêneos, no entanto o principal tipo celular é serotoninérgico (Mason et al., 2007). Alguns estudos indicaram que uma grande parte das projeções de neurônios serotoninérgicos que saem dos núcleos da rafe medulares para o NTS se origina no núcleo obscuros da rafe (ROB) (Thor and Helke, 1987, 1989). Existem também evidências de que NTS contém a maioria dos subtipos de receptores 5-HT (Pazos et al., 1985, Manaker and Verderame, 1990).

Adicionalmente, os receptores 5-HT3, os quais são predominantemente localizados pré-sinápticamente em aferentes sensoriais vagais não-cardiovasculares (Pratt and Bowery, 1989, Merahi et al., 1992), desempenham um papel importante no controle neural função cardíaca. Segundo Kinkead et al., (2001), os neurônios do rafe caudal são ativados durante situações de

hipóxia, e liberam 5HT na vizinhança das fibras respiratórias. Alguns estudos demonstram que alterações respiratórias também podem ser induzidas pela administração de SSRIs, como no caso da fluoxetina. Segundo Annerbrink et al., (2010), a administração subcrônica de fluoxetina aumenta a f<sub>R</sub>. Em seus estudos Taylor et al., (2004) demonstraram um aumento da resposta ventilatória à hipercapnia após tratamentos de microdiálise com a fluoxetina.

Sendo assim, vários estudos em animais demonstram o efeito do estresse neonatal sobre a atividade do quimiorreflexo, porém, ainda não há relatos na literatura quanto ao efeito do estresse crônico sobre a modulação deste reflexo. Além disso, alguns estudos demonstram alterações respiratórias à hipercapnia relacionadas com o tratamento de fluoxetina, porém pouco se sabe sobre seu efeito sob os parâmetros ventilátorias à hipóxia em condições de estresse crônico.

Diante disso, há carência na literatura quanto aos efeitos ECR e ECV sobre as respostas cardiovasculares e respiratórias ativadas pelo barorreflexo e quimiorreflexo, bem como o efeito do tratamento crônico e agudo com fluoxetina sobre essas respostas.

Sendo assim, a hipótese desse estudo é que o ECR e ECV apresentem efeito sobre as respostas cardiovasculares ativadas pelo barorreflexo, sobre a variabilidade da frequência cardíaca, e sobre as respostas cardiovasculares e ventilatórias ativadas pelo quimiorreflexo; além disso, é possível que o tratamento com fluoxetina seja capaz de prevenir às alterações cardiovasculares е ventilatórias provocadas pelo estresse crônico.

## 2. OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos do estresse crônico repetido e variado na modulação das respostas cardiovasculares e ventilatórias ativadas pelo barorreflexo e quimiorreflexo.

## 2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar se o ECR ECV é capaz promover alterações nos parâmetros basais de PAM e FC e corticosterona plasmática.
- Investigar os efeitos do ECV e do ECR sobre a magnitude das respostas simpáticas e parassimpáticas do barorreflexo.
- Avaliar a variabilidade do intervalo cardíaco e da PAS, avaliada no domínio da frequência pela análise espectral, por meio da Transformada Rápida de Fourier
- Analisar a SBR, avaliada no domínio do tempo por meio do Método da Sequência
- Avaliar os efeitos do ECV e ECR sobre as respostas evocadas perante a ativação do quimiorreflexo
- Avaliar o efeito da administração crônica e aguda de fluoxetina sobre
   o barorreflexo, a variabilidade da frequência cardíaca e o
   quimiorreflexo de ratos submetidos aos protocolos de ECR e ECV.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso variando de 320g a 550g. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto (USP). Os animais foram mantidos em caixas coletivas, com livre acesso a água e alimento, em condições controladas de temperatura (23 ± 2°C) e luz (ciclo 12/12 horas).

Os procedimentos experimentais desenvolvido nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob número de protocolo 175/2014.

#### 3.2 Protocolos de estresse crônico

Nesse estudo, grupos de animais independentes foram submetidos a dois tipos de estresse crônico: ECV e ECR. Os protocolos tiveram início com sete dias de diferença, de forma que os experimentos realizados com os respectivos grupos também respeitaram este intervalo. Os animais controle foram mantidos no biotério do laboratório do departamento de farmacologia FMRP-USP pelo mesmo período que os animais submetidos ao estresse crônico, porém não foram perturbados, exceto no período de limpeza das caixas que foi realizado todos os dias pela manhã. Os animais foram divididos em três grupos: Controle, ECR e ECV.

## 3.2.1 Estresse por restrição repetido

Os animais foram contidos em tubos cilíndricos plásticos com 17 cm de comprimento e 7,5 cm de largura durante 14 dias consecutivos. Todas as sessões diárias tiveram início às 10 horas da manhã e cada sessão de estresse teve um período de duração de 1 hora.

#### 3.2.2 Estresse crônico variado

O estresse crônico variado, modificado de Ortiz et al., (1996), foi realizado mediante a exposição diária a diferentes estressores, alternando os estressores, durante 14 dias consecutivos (Marin et al., 2007, Cruz et al., 2012). Tabela 1 apresenta o protocolo completo do estresse crônico variado empregado.

### 3.3 Tratamento com fluoxetina

Os animais foram divididos em nove grupos: (1) controle + veículo; (2) ECV + veículo; (3) ECR + veículo, onde os animais receberam todos os dias por via intraperitoneal (ip), administração de veículo (solução fisiológica 0,9% + Tween-80, 1 mL / kg) durante 21 dias; (4) controle + fluoxetina; (5) ECV + fluoxetina; (6) ECR + fluoxetina, que receberam i.p. diariamente administração de fluoxetina (10 mg / kg) durante 21 dias; a (7) controle + fluoxetina; (8) ECR + fluoxetina; (9) ECV + fluoxetina, que receberam todos os dias por via intraperitoneal (ip), administração de veículo solução fisiológica 0,9% + Tween-

80, 1 ml / kg) durante 20 dias e no ultimo dia foi realizado a administração de fluoxetina (10 mg/kg). Todos os tratamentos tiveram início 7 dias antes dos protocolos de estresses.

**Tabela 1:** Protocolo de estresse crônico no qual os animais foram submetidos durante um período de 14 dias.

Dia	Tipo de estresse e cronograma
1	10:00h restrição, 60 min; 19:00h serragem úmida durante a noite
2	15:00h, frio (4°C) e isolamento por 60 min; 19:00 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
11	15:00h, frio (4°C) e isolamento por 60 min; 19:00 h, privação de água/alimento durante a noite
12	10:00h restrição, 60 min; 19h, serragem úmida durante a noite
13	07:30h, serragem úmida durante todo o dia; 19:00h, privação de alimento/água durante a noite
14	10:00h restrição, 60 min

#### 3.4 Teste comportamental

## 3.4.1 Preferência por sacarose (PPS)

Ao fim do protocolo de estresse crônico, foi avaliado a ingestão de sacarose (solução de 2%) como medida de anedonia (diminuição ou ausência da capacidade de sentir prazer) por meio de um teste de preferência por sacarose. Para tanto, o protocolo foi realizado em três dias, em todos os dias os animais foram separados individualmente. No primeiro dia houve um período de habituação dos animais com a sacarose por um período de 5 horas. No dia posterior, dia do teste, inicialmente as garrafas de água pura e solução de sacarose (peso inicial) foram pesadas de acordo com protocolo de Willner, (1997). Em seguida as duas garrafas de água foram oferecidas para os ratos por um período de 10 horas e depois disto pesou-se novamente as garrafas (peso final). No terceiro dia, foi realizado o mesmo protocolo do dia anterior com intuito de verificar se os resultados obtidos eram mantidos. O consumo, tanto de água como de solução de sacarose foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final. A preferência por sacarose (vista na fórmula abaixo) foi calculada em valores percentuais, pela razão entre o consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose) e o consumo total (consumo de água (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de água) + consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose) e multiplicando-o por 100.

3.5 Canulação da artéria e veias femorais

Todos os animais foram anestesiados com tribromoetanol (Aldrich Chemical Co. Inc.) na dose de 250 mg/kg (i.p). Vinte e quatro horas antes do início dos experimentos foi realizado o implante cirúrgico de cânulas de polietileno (PE-50) a partir do dessecamento da artéria e veia femoral. Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruída na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Após o implante as cânulas foram exteriorizadas na região dorsal do animal e fixadas à pele por sutura cirúrgica, posteriormente como medida profilática foi administrado anti-inflamatório não-esteroidal flunixine meglumine (2,5 mg/kg, s.c- Banamine, Schering Plough, Brazil).

Os experimentos foram realizados 24 horas após a cirurgia, quando as cânulas implantadas na artéria e veia femoral foram utilizadas para realizar o registro dos parâmetros cardiovasculares e para infusão de fármacos respectivamente. Todos os animais foram mantidos em caixas individuais durante o período pós-operatório até a realização dos experimentos.

## 3.6 Medida de corticosterona plasmática

A dosagem hormonal foi realizada de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante através do kit Corticosterone Enzyme Immnuoassay, (Enzo Life Sciences, EUA) por ensaio competitivo imunoenzimático (ELISA). As amostras de sangue foram coletadas através da artéria femoral e colocadas em tubos contendo EDTA (1mg/mL de sangue). As amostras foram centrifugadas a

2,000xg durante 15 minutes a 4°C, e posteriormente o plasma foi distribuído em alíquotas que permaneceram congeladas a -80°C até o momento da realização do ensaio. Para o ensaio de corticosterona plasmática as amostras foram diluídas de 1:40.

## 3.7 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão PowerLab, (ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) conectado a um amplificador (ML870, LabChart, Austrália) e uma placa de aquisição de dados (ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) conectado a um computador, o mesmo foi utilizado para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP). Os valores de pressão arterial média (PAM), bem como a frequência cardíaca (FC), foram obtidos a partir dos sinais da PAP em uma frequência de amostragem de 2000Hz.

### 3.8 Avaliação da atividade barorreflexa

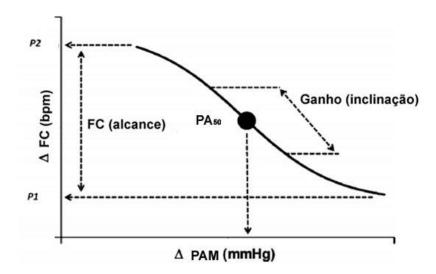
A estimulação do barorreflexo foi realizada pela infusão intravenosa de fenilefrina (50μg/mL/kg), agonista seletivo dos adrenoceptores α1, ou de nitroprussiato de sódio (NPS), doador de óxido nítrico, utilizando uma bomba de infusão (K.D. Scientific, EUA) (Resstel et al., 2004, Crestani et al., 2009).

O cateter da veia femoral foi conectado através de um tubo de polietileno (PE-50) a uma seringa de 1 mL preenchida com a solução vasoativa. A seringa foi colocada na bomba de infusão que foi programada para uma

velocidade de infusão de 0,80 μL/min/kg para a fenilefrina e de 150 μL/min/kg para o nitroprussiato de sódio. A partir disso, foi possível obter variações na PAM de aproximadamente 50 mmHg em um período de 40 a 50 segundos de infusão. A fenilefrina e o nitroprussiato de sódio foram dissolvidos em salina estéril a 0,9%.

#### 3.9 Método de análise barorreflexa

A atividade do barorreflexo foi analisada através dos dados registrados (PAM e FC) após a infusão dos agentes vasoativos fenilefrina e nitroprussiato de sódio. A análise foi feita através de uma relação entre os pontos da variação de PAM com a variação da FC reflexa correspondente. A partir disso foram traçadas curvas sigmóides utilizando os pontos obtidos da correlação na variação de PA e FC durante as infusões de fenilefrina ou de NPS.



**Figura 1:** Parâmetros da curva sigmóide do barorreflexo relacionando frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). P1 (bpm), platô mínimo da frequência cardíaca; P2 (bpm), platô máximo da frequência cardíaca; ΔP (bpm), diferença entre P1 e P2; G, ganho (inclinação da curva); PA<sub>50</sub>(mmHg), média da pressão arterial quando a frequência cardíaca variar 50%. Modificado de (Almeida et al., 2015)

Para análise separada das respostas taquicárdicas e bradicárdicas, foi feita a correlação entre as alterações de PAM para 10, 20, 30 e 40 mmHg e os respectivos valores de FC. Esses valores foram plotados para criar curvas de regressão linear. Posteriormente, as inclinações obtidas foram comparadas.

### 3.10 Variabilidade da frequência cardíaca

A análise da variabilidade do IP (intervalo de pulso) e PAS (pressão arterial sistólica) foi realizada por um programa computacional específico (CardioSeries v2.4 – http://www.danielpenteado.com), desenvolvido por Daniel P.M Dias, da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Brasil. O programa foi projetado para realizar a análise da variabilidade cardiovascular nos domínios do tempo e da frequência, permitindo um ajuste preciso dos parâmetros relacionados com a análise no domínio da frequência. Foram utilizados trechos com 5 minutos de duração com valores de IP e PAS que mantiverem uma relativa estacionaridade, para serem utilizados na análise da variabilidade do IP e PAS. Posteriormente, para regularização do intervalo de tempo entre batimentos, os valores de IP e PAS foram reamostrados em 10Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo *spline*, e as séries com valores interpolados foram divididos em segmentos de 512 pontos , com sobreposição de 50 % (Protocolo de Welch).

Em seguida, cada segmento foi visualmente examinado em busca de transientes que pudessem afetar o cálculo de densidade espectral de potência (PSD). Foi utilizado um janelamento do tipo *Hanning* e posteriormente cada

segmento estacionário de IP e PAS foi submetido à análise espectral pela Transformada Rápida de *Fourier* (FFT). Os espectros de IP foram integrados em bandas de baixa (LF: 0,20 - 0,75 Hz) e alta (HF: 0,75 - 3,00 Hz) frequência, enquanto que os espectros de PAS foram integrados somente na

A média das potências dos espectros do IP, nas bandas de frequência (LF e HF), foram utilizadas para expressar a potência do IP para cada rato. Já a média dos valores das potências dos espectros da PAS na banda de LF, foi utilizada para expressar a potência da PAS para cada rato.

## 3.11 Sensibilidade do barorreflexo espontâneo

banda de baixa frequência (LF: 0,20 – 0,75 Hz).

A sensibilidade barorreflexa foi calculada, no domínio do tempo, por meio do método da sequência. Séries temporais de PAS e IP foram processadas por um programa computacional específico (CardioSeries v2.4 – http://www.danielpenteado.com), desenvolvido por Daniel P. M. Dias, da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Brasil. O programa buscou por sequências de 4 ou mais batimentos que apresentassem aumentos progressivos na PAS acompanhados por aumentos, também progressivos, no IP (sequências UP), ou sequências de 4 ou mais batimentos que apresentassem reduções progressivas na PAS acompanhadas por reduções, também progressivas, no IP (sequências DOWN). Diferenças foram consideradas somente quando mudanças maiores ou iguais a 1 mmHg (PAS) e 1 ms (IP) foram observadas. A SBR foi determinada a partir da média do coeficiente angular da reta da regressão linear entre os valores de PAS e IP de

cada sequência encontrada. O índice de efetividade do barorreflexo (BEI) foi definido pela razão entre o número de sequências barorreflexas e o número total de rampas de PAS (aumentos ou reduções progressivas, por 4 ou mais batimentos, na PAS independente de alterações concomitantes do IP).

## 3.12 Estímulo dos quimiorreceptores periféricos

A estimulação dos quimiorreceptores nesse estudo foi realizada baseadando-se pelo método descrito por Franchini and Krieger, (1992) e já empregado por (Granjeiro et al., 2012; Granjeiro et al., 2011). Para isto, foi administrado em cada rato uma solução de cianeto de potássio (KCN), em concentração única de 40 μg/0,05 mL/rato através da cânula implantada na veia femoral. O KCN é considerado uma potente droga de estímulo dos quimiorreceptores periféricos, pois atua inibindo a enzima citocromo-oxidase, promovendo desta forma uma condição de hipóxia citotóxica (Franchini and Krieger, 1992). Ao detectarem essa condição, as células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo ativam o quimiorreflexo. Estudos realizados por nosso grupo já empregaram esta metodologia (Granjeiro et al., 2012; Granjeiro et al., 2011).

## 3.13 Registro da ventilação e análise dos dados

Os parâmetros ventilatórios foram avaliados pelo método pletismografia de corpo inteiro para pequenos animais descrito por Bartlett and Tenney, (1970). O método consiste em colocar o animal em uma câmara rígida vedada

à entrada de gases, e em decorrência da diferença de temperatura entre o gás inspirado (~25°C) e o gás expirado (~37°C) são geradas oscilações de pressão no interior da câmara, que serão utilizadas para o cálculo dos parâmetros ventilatórios. As oscilações de pressão geradas foram captadas através de um transdutor de pressão diferencial acoplado à câmara (ML141 Spirometer, PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia), o sinal foi gravado pelo software de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália). Dessa forma, com cada registro gerado foi permitido calcular o volume corrente (VT) e a ventilação minuto (VE), que são os parâmetros que indicam o volume de ar inspirado ou expirado em cada movimento respiratório e o volume de ar trocado por minuto respectivamente.

## 3.14 Análise da frequência respiratória

A frequência respiratória (f<sub>R</sub>) foi calculada pelo software de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). Ao longo da realização do protocolo experimental as oscilações de pressão produzidas pela respiração do animal dentro da câmara plestimográfica foram registradas durante 20 segundos antes e 20 segundos após a injeção intravenosa de KCN. A quantificação da f<sub>R</sub> foi realizada a cada intervalo de 2 segundos.

#### 3.15 Análise do volume corrente e da ventilação minuto nos animais

Os valores basais de  $V_T$  e  $V_E$  dos animais foram calculados considerando os registros correspondentes ao intervalo de 20 segundos antes da administração de KCN no período controle.

Tendo em vista que para uma análise confiável dos parâmetros respiratórios o animal deve permanecer quieto (Mortola and Frappell, 1998), a pletismografia de corpo inteiro tem como fator limitante a movimentação do animal, que pode interferir na captação e análise dos ciclos respiratórios. Devido a isto, o V<sub>T</sub> e o V<sub>E</sub> dos animais submetidos ao protocolo de ativação do quimiorreflexo não foram calculados após administração de KCN, uma vez que o KCN promove uma exuberante resposta comportamental.

A quantificação dos parâmetros ventilatórios V<sub>T</sub> e V<sub>E</sub> dos animais foram feitas a partir das equações mostradas abaixo (Drorbaugh and Fenn, 1955). A calibração de volume foi realizada injetando-se um volume conhecido de ar (1mL) dentro da câmara do animal com o uso de uma seringa graduada.

$$V_T = Vk \times PT \times Tc(PB-PA)$$
 $Tc(PB-PA) - TA(PB-PC)$ 

$$V_E(mL.Kg^{-1}.min^{-1}) = V_T(mL.Kg^{-1}) \times f_R(cpm)$$

Os dados citados acima correspondem a: VK: volume de ar injetado na câmara do animal para calibração; PT: deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente; PK: Deflexão de pressão associada com cada volume de ar injetado para calibração; TC: temperatura corporal; TA:

Temperatura do ar dentro da câmara do animal; PB: pressão barométrica; PC: Pressão de vapor d'água à temperatura corporal; PA: pressão de vapor d'água à temperatura da câmara.

# 3.16 Registros simultâneos da pressão arterial, frequência cardíaca e ventilação

O registro simultâneo dos parâmetros cardiovasculares e respiratórios, tanto em condições basais quanto em resposta a ativação do quimiorreflexo, foram obtidos através da técnica de pletismografia de corpo inteiro. No dia do experimento os animais foram mantidos dentro da câmara de pletismografia por 30 minutos para a ambientação, período em que a câmera permaneceu aberta permitindo o fluxo de ar entre o interior e o exterior da câmara. As cânulas previamente implantadas foram exteriorizadas por um orifício na tampa da câmara, permitindo que a cânula arterial fosse conectada ao transdutor de pressão para registrar a PAP e a cânula venosa fosse conectada à seringa de infusão do KCN. Para a ativação do quimiorreflexo foram realizadas injeções intravenosas de KCN (40 µg/0,05 mL/rato) por meio da cânula venosa conectada a uma extensão de polietileno (PE-50). Através de um orifício na lateral da câmara foi conectado o transdutor das variações de pressão pletismográficas para quantificar os parâmetros ventilatórios. Ambos os transdutores foram acoplados a um mesmo sistema de aquisição para o registro simultâneo das alterações cardiovasculares e ventilatórias.

Ao longo da realização dos protocolos experimentais a câmara pletismográfica permaneceu fechada por no máximo 2 minutos e nos intervalos

entre as ativações do quimiorreflexo a câmara foi aberta permitindo a troca do ar. A ativação do quimiorreflexo com KCN foi realizada com os animais dentro da câmara pletismográfica fechada, permitindo assim o registro simultâneo dos parâmetros cardiovasculares e ventilatórios. Cada animal foi estimulado três vezes com a infusão intravenosa de KCN.

## 3.17 Soluções e drogas utilizadas

Fenilefrina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), nitroprussiato de sódio (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), tribromoetanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), uretana (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), cianeto de Potássio - KCN (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), e fluoxetina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

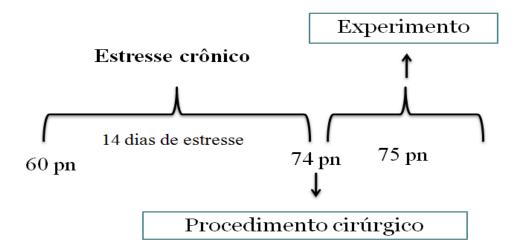
#### 4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1 Desenho experimental dos protocolos de estresse crônico e tratamento com fluoxetina sobre os parâmetros cardiovasculares e respiratórios.

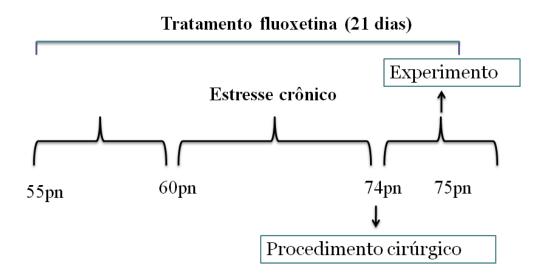
Os protocolos de estresse foram iniciados no sexagésimo dia pós-natal como demonstram as figura 2, 3 e 4. Todos os animais deste estudo foram submetidos ao procedimento cirúrgico para o implante de cateter na artéria e veia femoral no dia 14 dos protocolos de estresse crônico, imediatamente após

\_\_\_\_

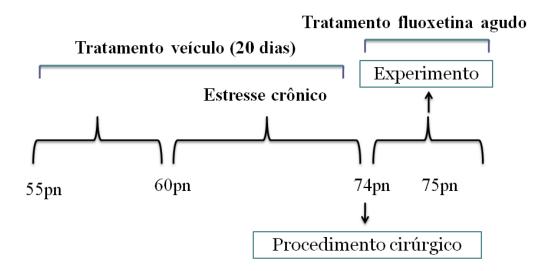
a última sessão de estresse. Os experimentos foram iniciados 24 horas após o procedimento cirúrgico.



**Figura 2.** Protocolo experimental para estudo do efeito do estresse crônico variado (ECV) e estresse por exposição repetida a restrição (ECR) sobre a função cardiovascular e respiratória.



**Figura 3.** Protocolo experimental para estudo do tratamento crônico com fluoxetina sobre os efeitos ocasionados pelo estresse crônico variado (ECV) e estresse por exposição repetida (ECR) a restrição sobre a função cardiovascular e respiratória.



**Figura 4.** Protocolo experimental para estudo do tratamento com fluoxetina agudo sobre os efeitos ocasionados pelo estresse crônico variado (ECV) e estresse por exposição repetida a restrição (ECR) sobre a função cardiovascular e respiratória.

4.2 Efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo, variabilidade da frequência cardíaca e quimiorreflexo.

Os animais foram submetidos a 14 dias de ECR ou ECV. No dia do experimento, os animais foram levados para a sala de experimentação para habituação ao ambiente. Antes da conexão dos animais ao sistema de registro cardiovascular foram coletadas amostras de sangue (0,5 mL) para análise da corticosterona plasmática. Em seguida foi avaliada a atividade do barorreflexo, variabilidade da frequência cardíaca e quimiorreflexo seguindo as metodologias citadas acima.

4.3 Efeito do estresse crônico e tratamento crônico com fluoxetina durante 21 dias sobre a atividade do barorreflexo, variabilidade da frequência cardíaca e quimiorreflexo.

Os animais foram submetidos a 14 dias de ECR ou ECV, no entanto foi iniciado o tratamento crônico com fluoxetina (10mg/kg/dia) ou veículo 7 dias antes de iniciar o estresse, terminando o 21º dia de tratamento no dia do experimento. Antes da conexão dos animais ao sistema de registro cardiovascular foram coletadas amostras de sangue (0,5 mL) para análise da corticosterona plasmática. Em seguida foi avaliada a atividade do barorreflexo, variabilidade da frequência cardíaca e quimiorreflexo seguindo as metodologias citadas acima.

4.4 Efeito do estresse crônico e tratamento agudo com fluoxetina sobre a atividade do barorreflexo, variabilidade da frequência cardíaca e quimiorreflexo.

Os animais foram submetidos a 14 dias de ECR ou ECV, no entanto o tratamento foi iniciado com administração de veículo 7 dias antes de iniciar o estresse, terminando o 21º dia de tratamento no dia do experimento. Neste dia foi realizada a administração aguda de fluoxetina (10mg/kg). Antes da conexão dos animais ao sistema de registro cardiovascular, foram coletadas amostras de sangue (0,5 mL) para análise da corticosterona plasmática. Em seguida foi avaliada a atividade do barorreflexo, variabilidade da frequência cardíaca e quimiorreflexo seguindo as metodologias citadas acima.

## 5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (EPM). O efeito do protocolo de estresse crônico sobre a função cardiovascular em animais adultos expostos aos protocolos de estresse foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA one-way). Os parâmetros barorreflexos foi analisado por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de pós-teste de Newman-Keuls. Todos os testes foram realizados assumindo-se o nível de significância de P< 0,05.

Para análise da atividade do quimiorreflexo os resultados obtidos nesse estudo foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos valores basais de PAM e FC dos grupos experimentais foram

comparados aos valores obtidos pelos grupos controle em cada protocolo experimental, ao passo que para a análise estatística dos parâmetros ventilatórios (f<sub>R</sub>, V<sub>T</sub> e V<sub>E</sub>) basais foi considerada a média dos 10 pontos obtidos (a cada 2 segundos) antes das administrações de KCN. Como teste estatístico foi utilizado a análise de variância (ANOVA, one-way) e o pós-teste de Newman-Keuls através do software GraphPad Prism 5, e foram considerados estatisticamente significantes os valores com P<0,05.

Para a análise dos resultados da variabilidade da frequência cardíaca, também foi utilizado inicialmente análise de variância (ANOVA-one way) e o pós-teste de Newman-Keuls para comparar os diferentes parâmetros entre os animais que sofreram estresse crônico e o grupo controle.

Para verificar o efeito do tratamento crônico e agudo com fluoxetina frente ao estresse crônico foi utilizado análise de variância (ANOVA-two way) seguido do pós-teste de Bonferroni em todos os experimentos realizados anteriormente, utilizando-se o software GraphPad Prism 5, e foram considerados estatisticamente significantes os valores com P<0,05.

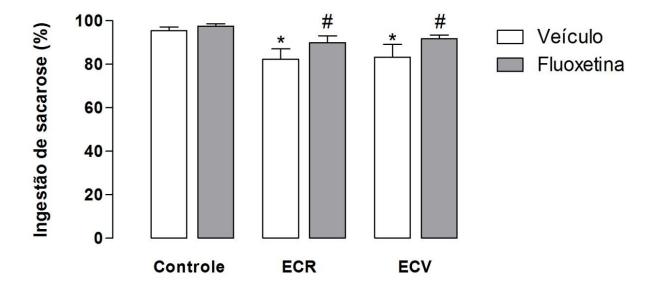
### 6. RESULTADOS

# 6.1 Efeito do estresse crônico sobre o comportamento dos animais (teste de preferência por sacarose)

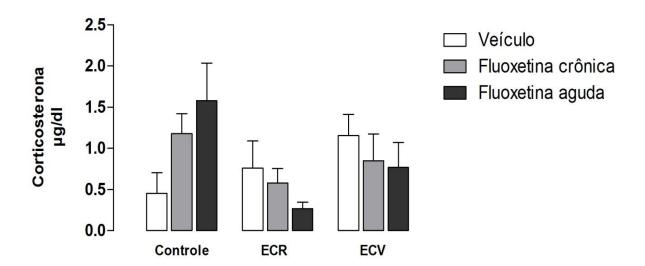
Como pode ser observado na figura 5, nos animais estressados cronicamente a preferência por solução de sacarose foi menor no dia do teste quando comparado ao grupo controle (ECR=  $82,27 \pm 4,812\%$ ; ECV=  $80,30 \pm 4,811\%$ ; controle=  $95,40 \pm 1,664\%$ ;  $F_{(2,24)}=5,11$ ; P<0,05; ANOVA-two way). No entanto, é possível observar que o tratamento crônico com fluoxetina (10 mg/kg) durante 21 dias foi capaz de prevenir as alterações provocadas pelo estresse crônico em ambos os grupo (ECR=  $89,93 \pm 3,195\%$ ; ECV= $91,69 \pm 1.774\%$ ; controle =  $97,54 \pm 1.053\%$ ;  $F_{(2,24)}=4,45$ ; P<0,05 ANOVA-two way).

#### 6.2 Efeito do estresse crônico sobre a dosagem de corticosterona

A análise dos níveis de corticosterona plasmática não apresentou efeito significativo, no entanto, apresentou uma tendência de efeito do estresse  $(F_{(2,38)}=2,48; P>0,09; ANOVA-two way)$ , mas sem influência do tratamento  $(F_{(2,38)}=0,07; P>0,05; ANOVA-two way)$  e da interação tratamento x estresse  $(F_{(4,39)}=2,21; P>0,05; ANOVA-two way)$ .



**Figura 5.** Efeito do estresse crônico no teste de preferência por sacarose e efeito do tratamento crônico com fluoxetina nas alterações ocasionadas pelo estresse. Os dados representam os valores médios ± EPM. dos grupos controle (sem estresse; n=5); estresse crônico repetido (ECR; n=5); estresse crônico variado (ECV; n=5); controle + Fluoxetina (n=5); ECR + Fluoxetina (n=5) ECV + Fluoxetina (n=5). Foram considerados significativos valores de P < 0,05. (\*) comparado ao grupo controle; (#) comparado aos seus respectivos veículos. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.



**Figura 6.** Dosagem de corticosterona plasmática de animais tratados durante 21 dias com fluoxetina crônica (colunas cinza claro); fluoxetina aguda (colunas cinza escuro) ou veículo (colunas brancas) e submetidos a 14 dias de estresse crônico. As colunas representam média ± SEM entre os grupos controle (sem estresse; n=5), estresse crônico repetido (ECR; n=6); estresse crônico variado (ECV; n=5); controle + fluoxetina crônica (n=6); ECR + fluoxetina crônica (n=6); ECV + fluoxetina crônica (n=6); controle + fluoxetina aguda; (n=6); ECR + fluoxetina aguda (n=4); ECV + fluoxetina aguda (n=4). ANOVA two-way, seguido do post hoc Bonferroni.

### 6.3 Efeitos do estresse crônico sobre o peso corporal dos animais.

A figura 7 mostra que tanto os animais que passaram pelo ECR quanto o ECV apresentaram uma diminuição no ganho de peso quando comparados aos ratos controle ( $F_{(2,420)} = 78,29$ ; P >0,05; ANOVA-two way) no decorrer do tempo, principalmente a partir do oitavo dia ( $F_{(2,420)} = 37,12$ ; P >0,05; ANOVA-two way). Os dados médios dos pesos de cada grupo encontram-se na tabela 3.

6.4 Efeito do tratamento com fluoxetina crônico e agudo frente às alterações ocasionadas pelo estresse crônico sobre o peso corporal dos animais.

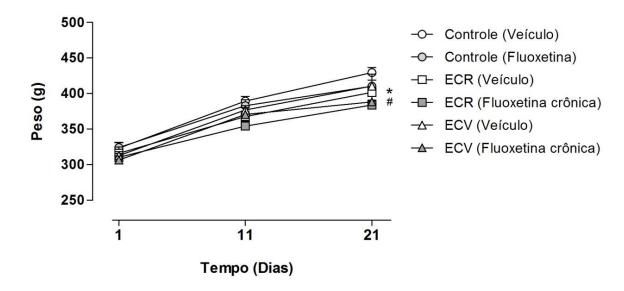
É possível observar nas figuras 8 e 9 que o tratamento crônico e agudo com fluoxetina apresentou diferença tanto na condição, onde os grupos veículos ECR e ECV ganharam menor peso que o grupo controle (F<sub>(20,1554)</sub> = 99,40; P>0,05; ANOVA-two way), quanto no tratamento (F<sub>(20,1554)</sub> = 107,96; P>0,05; ANOVA-two way), onde é possível observar que os grupos ECR e controle que foram tratados cronicamente, apresentaram uma redução do peso corporal quando comparado com seus respectivos veículos. Os grupos ECR e ECV tratado agudamente demonstraram um aumento no peso corporal, quando comparado com seus respectivos veículos. Os dados médios dos pesos de cada grupo encontram-se na tabela 4.

500 → Controle → ECR → ECV

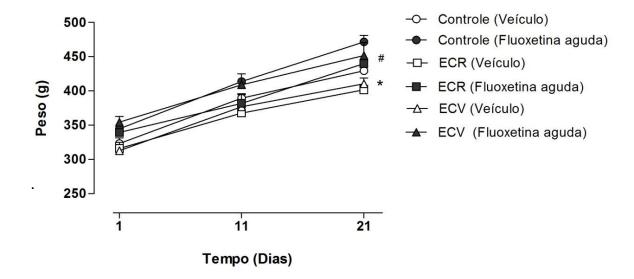
350 → 15

Tempo (Dias)

**Figura 7.** Evolução de peso dos grupos controle (não estressados; n=11), ECR (estresse crônico repetido; n=10) e ECV (estresse crônico variado; n=10) no decorrer dos 15 dias de estresse. Os grupos estressados ganham menos peso em relação ao grupo controle ao final do experimento. Os dados representam os valores médios ± EPM. \*P<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.



**Figura 8.** Evolução de peso dos grupos controle (sem estresse; n=8), estresse crônico repetido (ECR; n=9); estresse crônico variado (ECV;n=11); Controle + fluoxetina; n=11); ECR + fluoxetina (n=11); ECV + fluoxetina (n=10) de animais tratados cronicamente durante os 21 com fluoxetina (símbolos cinzas) ou veículo (símbolos brancos).Os dados representam os valores médios ± EPM. \*P<0,05 comparado ao grupo controle. \*P<0,05 comparado aos seus respectivos veículos; ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.



**Figura 9.** Evolução de peso dos grupos controle (sem estresse; n=9), estresse crônico repetido (ECR; n=9); estresse crônico variado (ECV; n=11); controle+fluoxetina aguda; (n=6);ECR + fluoxetina aguda (n=8); ECV +fluoxetina aguda (n=6) de animais tratados cronicamente durante os 21 com fluoxetina (símbolos cinza escuro) ou veículo (símbolos brancos). Os dados representam os valores médios ± EPM. \*P<0,05 comparado ao grupo controle.#P<0,05 comparado aos seus respectivos veículos; ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.

6.5 Efeitos do estresse crônico sobre os parâmetros cardiovasculares basais.

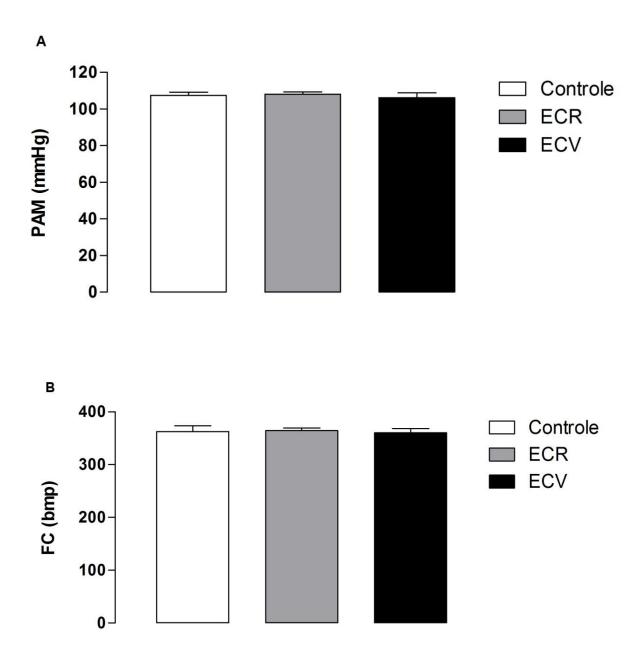
Foi realizado a avaliação dos parâmetros cardiovasculares basais de PAM e FC de animais não anestesiados que foram submetidos aos protocolos de estresse crônico. Os níveis de PAM e FC foram avaliados por um período de 10 minutos, antes do início dos experimentos, em animais do grupo controle (n=11), ECR (n=10) e ECV (n=10). No entanto, o teste ANOVA-one way, seguido pelo pós hoc Newman-Keuls demonstrou que não houve alterações significativas nos parâmetros de PAM ( $F_{(2,30)} = 0,2671$ ; P >0,05; ANOVA-one way) e FC (F=(2,30) = 0,05448 P >0,05; ANOVA-one way) entre os diferentes grupos. Esses resultados estão representados na figura 10.

6.6 Efeito do tratamento com fluoxetina crônico e agudo frente às alterações ocasionadas pelo estresse crônico sobre os parâmetros cardiovasculares basais.

Na figura 11 observa-se o efeito do tratamento com fluoxetina sobre os parâmetros basais cardiovasculares de PAM e FC entre os grupos: controle x veículo (n=8); ECR x veículo (n=9); ECV x veículo (n=11); controle x fluoxetina crônica (n=11); ECR x fluoxetina crônica (n=11); ECV x fluoxetina crônica (n=10); controle x fluoxetina aguda (n=6); ECR x fluoxetina aguda (n=8) e ECV x fluoxetina aguda (n=6). Não houve diferença entre os animais que passaram pelo estresse crônico quando comparados ao grupo controle (PAM; F<sub>(2,71)</sub>=

0,42, p>0,05; FC;  $F_{(2,71)}=0.88$ , P>0,05; ANOVA-two way). Além disso, também não houve diferença no efeito do tratamento (PAM;  $F_{(2,71)}=0.76$ , p>0,05; FC;  $F_{(2,71)}=1.22$ , P>0.05 ANOVA-two way) e na interação entre tratamento x condição (PAM;  $F_{(4,71)}=0.82$ , p>0,05; FC;  $F_{(4,71)}=2.08$ , P>0,05, ANOVA-two way).

Desta forma, foi possível observar que o estresse crônico, tanto o ECR, quanto o ECV não alterou os parâmetros cardiovasculares e que o tratamento com fluoxetina (10 mg/kg) tanto o agudo quanto o crônico não interferiu nos resultados observados.



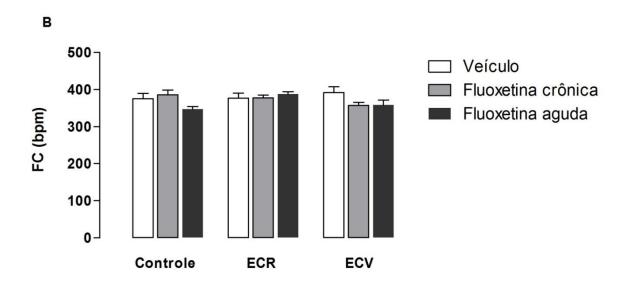
**Figura 10.** Parâmetros basais de **(A)** PAM (pressão arterial média) e **(B)** FC (frequência cardíaca) de animais submetidos a 14 dias de estresse crônico. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle (n=11), barras brancas); ECR (estresse crônico repetido; n=10, barra cinza claro); ECV (estresse crônico variado; n=10, barras pretas). (\*) Foram considerados significativos p<0,05; ANOVAone way, seguido do post hoc Newman-Keuls.

0-

Controle

**ECV** 

**ECR** 



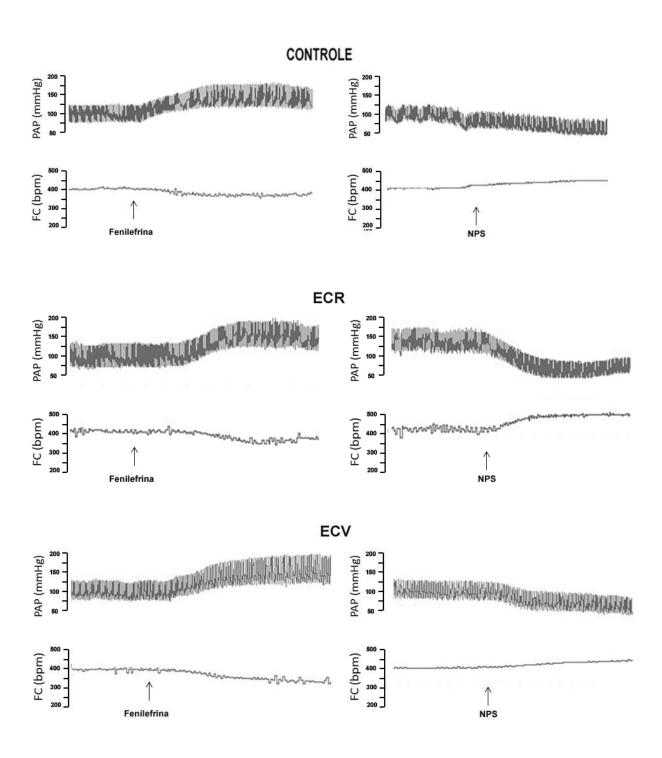
**Figura 11.** Parâmetros basais de **(A)** PAM (pressão arterial média) e **(B)** FC (frequência cardíaca) de animais tratados durante 21 dias com fluoxetina crônica (colunas cinza claro); fluoxetina aguda (colunas cinza escuro) ou veículo (colunas brancas) e submetidos a 14 dias de estresse crônico. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle (sem estresse; n=8), estresse crônico repetido (ECR; n=9); estresse crônico variado (ECV; n=11); Controle + fluoxetina crônica (n=11); ECR + fluoxetina crônica (n=11); ECV + fluoxetina crônica (n=10); controle + fluoxetina aguda; (n=6); ECR + fluoxetina aguda (n=8); ECV + fluoxetina aguda (n=6). \*P<0,05 comparado ao grupo controle. \*P<0,05 comparado aos seus respectivos veículos; ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.

# 6.7 Experimento da atividade do barorreflexo em ratos submetidos ao estresse crônico.

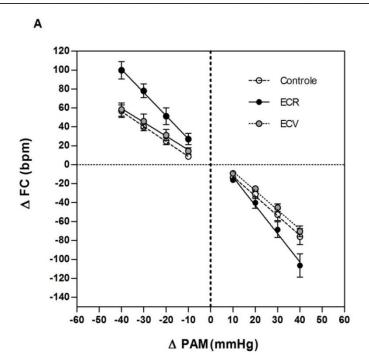
A figura 12 representa o traçado de um animal, mostrando as alterações na pressão PA, e FC após a infusão de agentes vasoativos como fenilefrina (0,80 μL/min/kg) e o nitroprussiato de sódio (150 μL/min/kg) de animais submetidos ao estresse crônico.

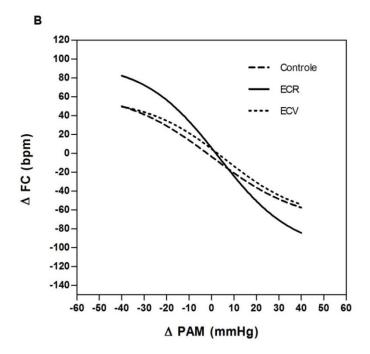
#### 6.7.1 Efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo

Na figura 13 demonstra o efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo. É possível observar que o ECR foi capaz de aumentar a inclinação da regressão linear relacionado com as respostas bradicárdica (controle= -2,07  $\pm$  0,25 e ECR = -2,99  $\pm$  0,35;  $F_{(2,27)}$ = 4,090; P<0,05; ANOVAone way) e taquicárdica (controle = -1,59  $\pm$  0,18 e ECR = -2,.45  $\pm$  0,34; $F_{(2,27)}$ = 3,407; P<0,05; ANOVAone way). No entanto, não houve diferença significativa entre o grupo ECV e o grupo controle. A maior parte dos parâmetros da curva sigmóide (P1, P2, G,  $\Delta$ P), sofreram alterações, exceto o PA<sub>50</sub> (Tabela 5).



**Figura 12.** Traçados representativos de uma rato de cada grupo, da variação da PAM e FC após a administração de drogas vasoativas fenilefrina e nitroprussiato de sódio para ativação do barorreflexo cardíaco.





**Figura 13. (A)** Curvas de regressão linear correlacionando as respostas de ΔPAM e  $\Delta$ FC de animais do grupo controle (não estressado, n=11), e animais que foram submetidos ao estresse crônico repetido (ECR, n=10) e estresse crônico variado (ECV, n=10). Valores de correlação  $r^2$  para as curvas de regressão bradicárdica foram 0,66; 0,73 e 0,74 respectivamente. Valores de correlação  $r^2$  para as curvas de regressão taquicárdica foram 0,67; 0,66; 0,38 respectivamente. **(B)** Curvas sigmóides correlacionando pressão arterial média ( $\Delta$ MAP) e freqüência cardíaca ( $\Delta$ FC) do grupo controle ( $r^2$ =0,80), ECR ( $r^2$ =0,81) e ECV ( $r^2$ =0,71).

## 6.7.2 Efeito do tratamento crônico com fluoxetina sobre as alterações provocadas pelo estresse crônico frente a ativação do barorreflexo.

Após observar que o ECR altera os componentes do barorreflexo, foi realizado o tratamento crônico e agudo com fluoxetina com o objetivo de verificar as possíveis alterações ocasionadas pela fluoxetina. Como anteriormente, foi observado que o ECR aumentou a inclinação da regressão linear relacionado com as respostas bradicárdica (controle= -2,33  $\pm$  0,23; ECR = -3,39  $\pm$  0,32; ECV = -2,56  $\pm$  0,14;  $F_{(2,55)}$ = 10,33; P <0.05; ANOVA-two way) e taquicárdica (controle = -1,98  $\pm$  0,30; ECR = -2.57  $\pm$  0.24 e ECV = -2.15  $\pm$  0.37; $F_{(2,55)}$ = 8,07; P <0.05; ANOVA-two way) no entanto, não houve diferença significativa entre o grupo ECV e o grupo controle.

É possível notar na figura 14 que o tratamento crônico com fluoxetina apresentou efeito por si só, uma vez que diminuiu o a inclinação da curva bradicárdica do grupo controle, além de prevenir as alterações ocasionadas pelo ECR (controle x veículo =  $-2,33 \pm 0,23$  e controle x fluoxetina crônica =  $1,29 \pm 0,18$ ; ECR x veículo =  $3.39 \pm 0.35$ ; ECR x fluoxetina crônica =  $2,35 \pm 0,28$ ; ECV x veículo =  $2,56 \pm 0,14$ ; ECV x fluoxetina crônica =  $2,42 \pm 0,29$ ; F(2,55) = 2,10; p<2,55; ANOVA-two way).

Relacionado ao componente taquicárdico, o tratamento crônico com fluoxetina também apresentou efeito por si só, um vez que diminuiu o componente taquicárdico do grupo controle, no entanto preveniu as alterações ocasionadas pelo ECR, diminuindo o componente taquicárdico quando comparado com seu respectivo veículo (controle x veículo = -1,98  $\pm$  0,30; controle x fluoxetina crônica = 1,15  $\pm$  0,23; ECR x veículo = -2,57  $\pm$  0,24; ECR

x fluoxetina crônica = -1,910  $\pm$  0,22; ECV = -2,15  $\pm$  0.37 e ECV x fluoxetina crônica = 1,96  $\pm$  0,30;  $F_{(2,55)}$  = 3,21; p>0.05; ANOVA-two way).

Já ao analisar o tratamento agudo com fluoxetina, observou-se na figura 15 que houve uma diminuição do componente bradicárdico tanto do grupo controle, ECR e ECV quando comparado com seus respectivos veículos (controle x veículo = -2,33  $\pm$  0,23; controle x fluoxetina aguda = -1,61  $\pm$  0,32; ECR x veículo = -3,39  $\pm$  0,35; ECR x fluoxetina aguda = -2,27  $\pm$  0,12; ECV x veículo = -2,56  $\pm$  0,14 e ECV x fluoxetina aguda = -2,22  $\pm$  0,29; F<sub>(2,55)</sub> = 9,10; p<0.05; ANOVA-two way). Porém o tratamento agudo com fluoxetina não alterou o componente taquicárdico de nenhum dos grupos (controle x veículo = -1,98  $\pm$  0,30; controle x fluoxetina aguda = -2,05  $\pm$  0.25; ECR x veículo = -2,57  $\pm$  0,24; ECR x fluoxetina aguda = -2,75  $\pm$  0,41; ECV x veículo = -2,15  $\pm$  0,37 e ECV x fluoxetina aguda = -1,84  $\pm$  0,20; F<sub>(2,55)</sub> = 3,21; P>0.05; ANOVA-two way).

Todos os parâmetros da curva sigmóide (P1, P2, G, ΔP), sofreram alterações, exceto a PA<sub>50</sub> que não sofreu alteração (Tabela 6).

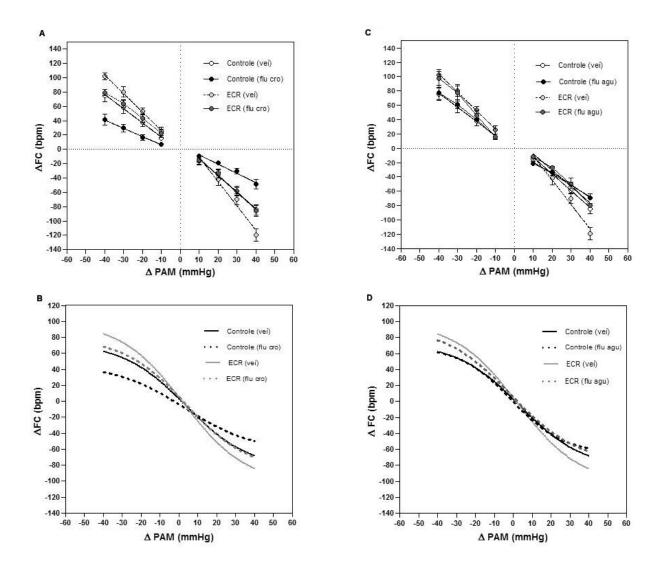


Figura 14. (A) Curvas de regressão linear correlacionando as respostas de ΔPAM e ΔFC de animais do grupo: controle (não estressado, n=7), e animais que foram submetidos ao estresse crônico repetido (ECR, n=7) e efeito do tratamento crônico com fluoxetina durante 21 dias nos grupos: controle + fluoxetina (n=7) e ECR + fluoxetina (n=8). (B) Curvas de regressão linear correlacionando as respostas de ΔPAM e ΔFC dos grupos controle (não estressados, n=7), e animais que foram submetidos ao estresse crônico repetido (ECR, n=7) e de animais que receberam tratamento agudo com fluoxetina nos grupos: controle + fluoxetina aguda (n=5) e ECR + fluoxetina aguda (n=7); Valores de correlação r<sup>2</sup> para as curvas de regressão bradicárdica do grupos foram 0,79; 0,77; 0,65 e 0,69 respectivamente para o tratamento crônico e 0,79; 0,77; 0,57 e 0,92 respectivamente para o tratamento agudo . Valores de correlação r<sup>2</sup> para as curvas de regressão taquicárdica foram 0,62; 0,81; 0,49 e 0,71 respectivamente para o tratamento crônico e 0,62; 0,81; 0,77 e 0,63 para o tratamento agudo. (C,D) Curvas sigmóides correlacionando pressão arterial média (Δ MAP) e frequência cardíaca ( $\Delta$  FC) do grupo controle ( $r^2$ =0,85), ECR ( $r^2$ =0,82); ECV  $(r^2=0.71)$ ; controle + fluoxetina crônica  $(r^2=0.67)$ ; ECR + fluoxetina crônica  $(r^2=0.77)$ ; controle + fluoxetina aguda (r<sup>2</sup>=0,81); ECR + fluoxetina aguda (r<sup>2</sup>=0,81).

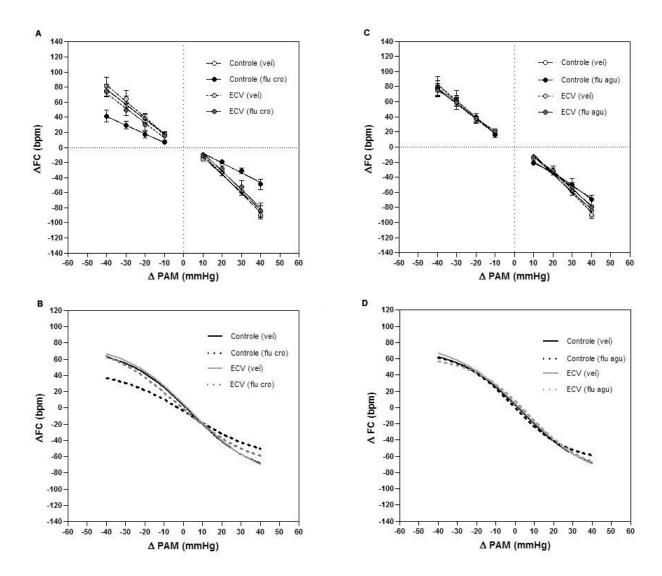


Figura 15. (A) Curvas de regressão linear correlacionando as respostas de ΔPAM e ΔFC de animais do grupo: controle (não estressados, n=7), e animais que foram submetidos ao estresse crônico variado (ECV, n=9) e efeito do tratamento crônico com fluoxetina durante 21 dias nos grupos: controle + fluoxetina (n=7) e ECV + fluoxetina (n=8). (B) Curvas de regressão linear correlacionando às respostas de ΔPAM e ΔFC dos grupos controle (não estressado, n=7), e animais que foram submetidos ao estresse crônico variado (ECV, n=7) e de animais que receberam tratamento agudo com fluoxetina nos grupos: controle + fluoxetina aguda (n=5) e ECV + fluoxetina aguda (n=6); Valores de correlação r<sup>2</sup> para as curvas de regressão bradicárdica do grupos foram 0,79; 0,90; 0,65 e 0,69 respectivamente para o tratamento crônico e 0,79; 0,90; 0,57 e 0,71 respectivamente para o tratamento agudo. Valores de correlação r<sup>2</sup> para as curvas de regressão taquicárdica foram 0,62; 0,47; 0,49 e 0,58 respectivamente para o tratamento crônico e 0,62; 0,81; 0,77 e 0,77 para o tratamento agudo. (C,D) Curvas sigmóides correlacionando pressão arterial média (A MAP) e frequência cardíaca (Δ FC) do grupo controle (r²=0,85), ECV (r²=0,82); controle + fluoxetina crônica; ECV + fluoxetina crônica (r<sup>2</sup>=0.71); controle + fluoxetina aguda (r<sup>2</sup>=0.81); ECV + fluoxetina aguda (r<sup>2</sup>=0,93).

## 6.8 Efeito do estresse crônico sobre a variabilidade da frequencia cardíaca (PAS e IP) e sensibilidade barorreflexa espôntanea.

As figuras 16, 17 e 18 mostram respectivamente a PAS, variabilidade total e potência da banda de LF da PAS em condições controle e após os animais serem submetidos aos diferentes protocolos de ECR e ECV. Após o estresse crônico, foi possível observar que não houve diferença na PAS (F<sub>(2,30)</sub>= 1,267; P>0,05; ANOVA-one way), e nem na variabilidade total da PAS (F<sub>(2,30)</sub>= 1,131; P<0,05; ANOVA-one way). O grupo ECR apresentou um pequeno aumento da potência da banda de LF (F<sub>(2,30)</sub>= 3,488; P<0,05; ANOVA-one way) quando comparado ao grupo controle.

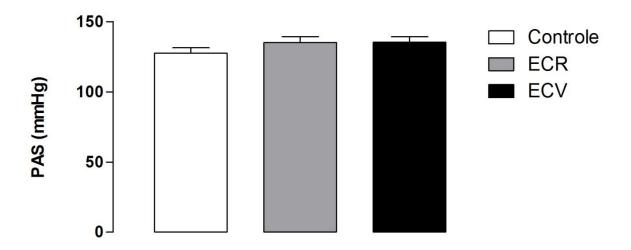
Em relação ao IP, é possível observar na figura 19 e 20 respectivamente o IP, variabilidade total e a potência da banda de LF e HF do IP de ratos em condições controle e após serem submetidos aos diferentes protocolos de ECR e ECV. Após o estresse crônico, não houve alteração no IP ( $F_{(2,30)} = 0,3351$ ; P>0,05; ANOVA-one way) e na variabilidade total ( $F_{(2,30)} = 0,8925$ ; P>0,05; ANOVA-one way) quando comparado ao grupo controle, entretanto, o ECR e o ECV foram capazes de atenuar tanto a potência da banda de LF ( $F_{(2,30)} = 8,184$ ; P<0,05; ANOVA-one way), quanto a potência da banda de HF ( $F_{(2,30)} = 7,299$ ; P<0,05; ANOVA-one way) do IP.

A figura 21 mostra as potência das bandas de LF e HF do espectro do IP em unidades normalizadas, assim como a razão entre estas potências (LF/HF). Verificou-se que o estresse crônico foi capaz de provocar uma diminuição na potência das bandas de LF (u.n) ( $F_{(2,30)} = 5,280$ ; P<0,05; ANOVA-one way), HF (u.n) ( $F_{(2,30)} = 4,602$ ; P<0,05; ANOVA-one way), e na razão das potências

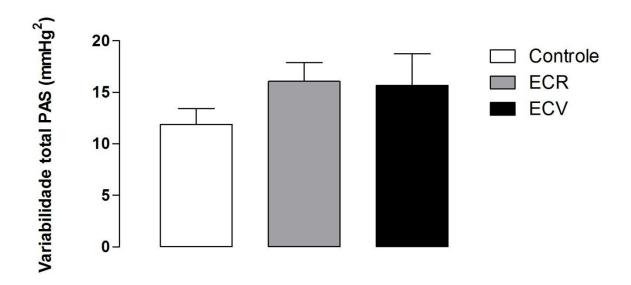
quando comparado com o grupo controle ( $F_{(2,30)} = 4,307$ ; p<0,05; ANOVA oneway).

Na figura 22 é possível observar que os animais que foram submetidos ao ECR e ECV apresentaram uma redução no ganho total ( $F_{(2,30)} = 12,77$ , P<0,05; ANOVA-one way). Além disso, o estresse crônico também foi capaz de alterar o número de sequências UP ( $F_{(2,30)} = 12,74$ , P<0,05; ANOVA-one way) e o número de sequências DOWN ( $F_{(2,30)} = 6,024$ , P<0,05; ANOVA-one way).

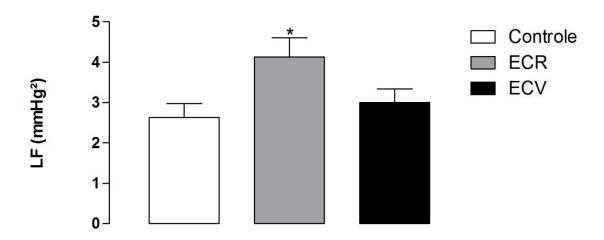
Com relação ao índice de efetividade do barorreflexo é possível notar na figura 23 que os animais que foram submetidos ao ECR e ECV apresentaram um menor número de sequências barorreflexas quando comparado ao grupo controle ( $F_{(2,30)} = 4,607$ , p<0,05; ANOVA-one way). Além disso, o BEI calculado a partir das sequências UP ( $F_{(2,30)} = 7,635$ , P<0,05; ANOVA-one way), e sequências DOWN ( $F_{(2,30)} = 13,72$ , P<0,05; ANOVA-one way) apresentou-se reduzido em relação ao grupo controle.



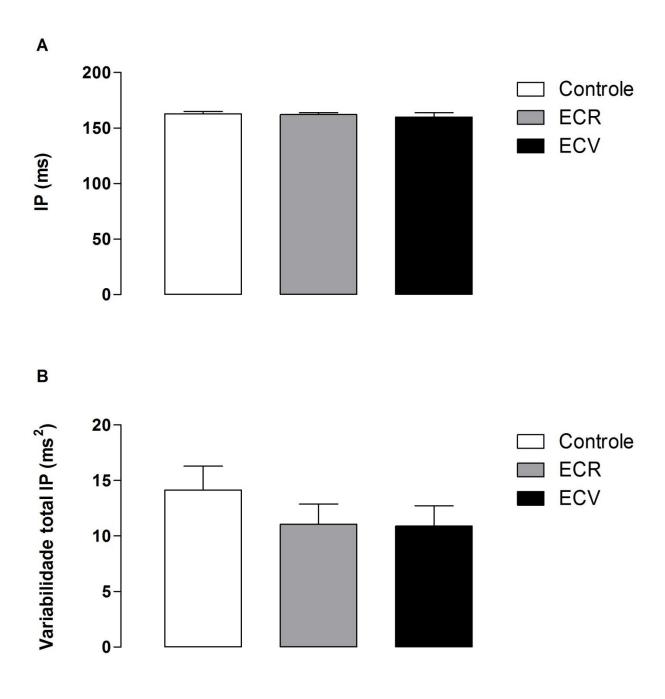
**Figura 16**. Pressão arterial sistólica (PAS) de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle (n=11), estresse crônico repetido (ECR, n=10) e estresse crônico variado (ECV, n=10). \*P<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVA-one way, post hoc Newman-Keuls.



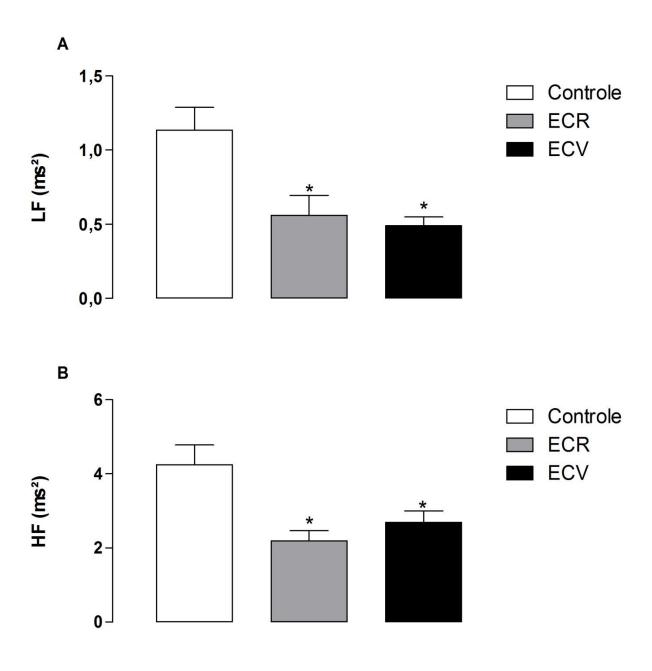
**Figura 17.** Variabilidade total da pressão arterial sistólica (PAS) de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle (n=11), estresse crônico repetido (ECR, n=10) e estresse crônico variado (ECV, n=10). \*P<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVA-one way, post hoc Newman-Keuls.



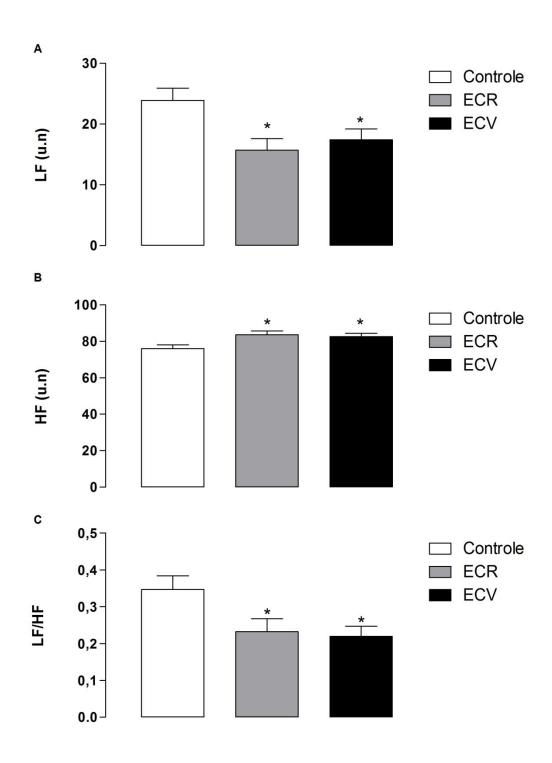
**Figura 18.** Potência da banda de baixa frequência (LF) do espectro da pressão arterial sistólica (PAS) de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle (n=11), estresse crônico repetido (ECR, n=10) e estresse crônico variado (ECV, n=10). \*P<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVA-one way, post hoc Newman-Keuls.



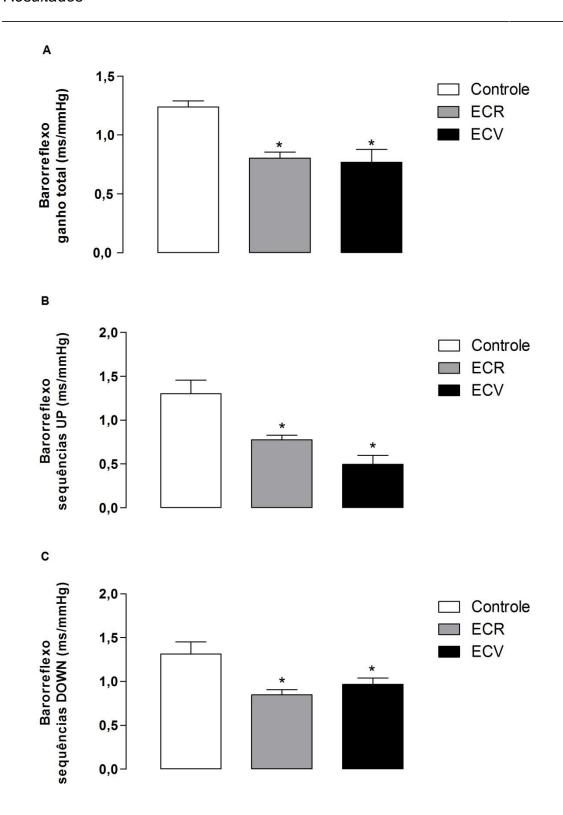
**Figura 19. (A)** Intervalo de pulso (IP) e **(B)** Variabilidade total do intervalo de pulso de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle (n=11), estresse crônico repetido (ECR, n=10) e estresse crônico variado (ECV, n=10). \*P<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVA-one way, post hoc Newman-Keuls.



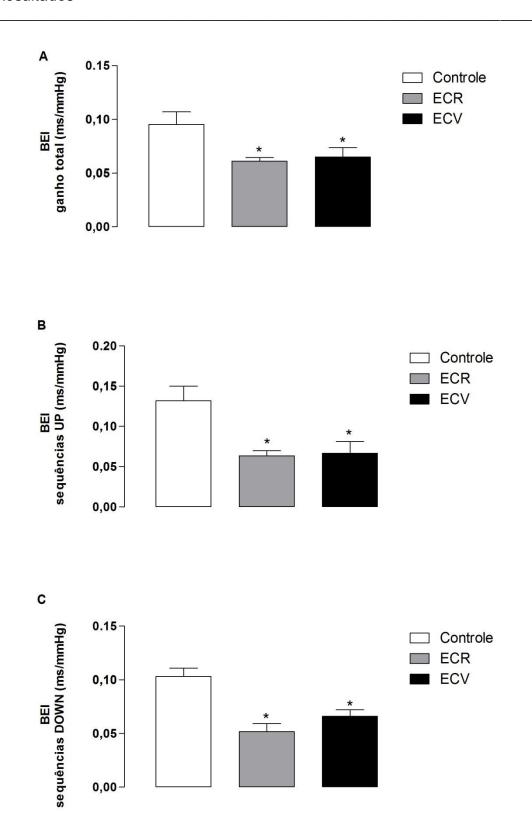
**Figura 20. (A)** Potência da banda de baixa frequência (LF); **(B)** e alta frequência (HF) do espectro do intervalo de pulso de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle (n=11), estresse crônico repetido (ECR, n=10) e estresse crônico variável (ECV, n=10). \*P<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVA-one way, post hoc Newman-Keuls.



**Figura 21. (A)** Potência da banda de baixa frequência (LF) e **(B)** e alta frequência (HF) em unidades normalizadas do espectro do intervalo de pulso **(C)** razão entre as potências das bandas de LF/HF de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle (n=11), estresse crônico repetido (ECR, n=10) e estresse crônico variado (ECV, n=10). \*P<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVA-one way, post hoc Newman-Keuls.



**Figura 22. (A)** Ganho de todas as sequências barorreflexas, **(B)** ganho das sequências UP, **(C)** Ganho das sequências DOWN de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle (n=11), estresse crônico repetido (ECR, n=10) e estresse crônico variado (ECV, n=10). \*P<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVA-one way, post hoc Newman-Keuls.



**Figura 22**. **(A)** Índice de efetividade do barorreflexo total (BEI), **(B)** BEI das sequências barorreflexas UP e **(C)** BEI de sequências barorreflexa DOWN de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle (n=11), estresse crônico repetido (ECR, n=10) e estresse crônico variado (ECV, n=10). \*P<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVAone way, post hoc Newman-Keuls.

6.9 Efeito do tratamento com fluoxetina sobre a variabilidade da frequencia cardíaca e sensibilidade barorreflexa de animais submetidos ao estresse crônico.

As figuras 24, 25 e 26 mostram respectivamente a PAS, a variabilidade total e a potência da banda de LF da PAS em condições controle e após os animais serem submetidos aos diferentes protocolos de ECR e ECV e seus respectivos tratamentos. Após o tratamento crônico e agudo com fluoxetina, foi possível observar que não houve efeito da condição (F(2,71)= 0,09; P>0,05; ANOVA-two way) e do tratamento (F(2,71)= 1,07; P>0,05; ANOVA- two way) nos parâmetros basais de PAS. Embora o fator condição não tenha alterado nenhum dos parâmetros avaliados, o tratamento crônico com fluoxetina diminuiu a potência da banda de LF da PAS do grupo ECR e ECV e o tratamento agudo diminuiu a potência da banda da PAS do grupo ECV (condição; F(2,71)= 0,52; P>0,05; ANOVA-two way; tratamento;F(2,71)= 6,92; P<0,05; ANOVA-two way). Além disso, o tratamento crônico diminuiu variabilidade total da PAS do grupo ECV (F(2,72)= 6,78; p<0,05; ANOVA-two way).

Em relação ao IP, é possível observar nas figuras 27 e 28 o IP, a variabilidade total e a potência da banda de LF e HF do IP de ratos em condições controle e após serem submetidos aos diferentes protocolos de ECR e ECV e seus respectivos tratamentos. O tratamento com fluoxetina crônico ou agudo, não levou a alterações significativas entre os grupos estressados ( $F_{(2,71)}$  = 0,27; P>0,05; ANOVA-two way), porém ambos os tratamentos aumentaram o IP do grupo ECV ( $F_{(2,71)}$  = 3,68; P<0,05; ANOVA-two way). Ao analisar a

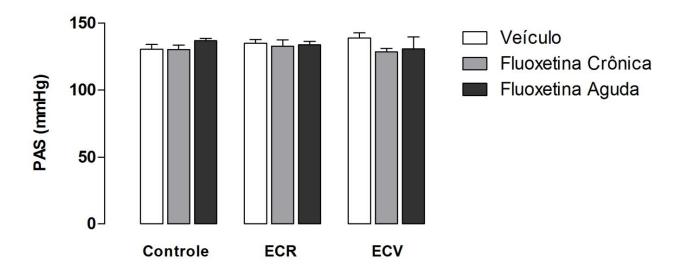
variabilidade total do IP, não houve efeito da condição ( $F_{(2,71)} = 0.04$ ; p>0,05; ANOVA-two way). Porém apenas o tratamento crônico diminuiu a variabilidade total do IP do grupo controle ( $F_{(2,71)} = 3.91$ ; P<0,05; ANOVA-two way). Em relação a potência da banda LF, houve efeito do tratamento, mas não houve efeito da condição, uma vez que tratamento crônico e agudo diminuiu o a potência da banda LF do IP do ECR sem alterar os demais grupos (condição  $F_{(2,71)} = 1.25$ ; P>0,05; ANOVA-two way; tratamento  $F_{(2,71)} = 6.82$ ; P<0,05; ANOVA-two way ). Já o ao analisar a banda HF, não foram observadas alterações nos fatores condição e tratamento (condição  $F_{(2,71)} = 1.97$ ; P>0,05; ANOVA two-way; tratamento ( $F_{(2,71)} = 3.12$ ; P>0,05; ANOVA two-way).

A figuras 29 mostra as potência das bandas de LF e HF do espectro do IP em unidades normalizadas (u.n), assim como a razão entre estas potências (LF/HF). É possível observar que não houve efeito da condição, porém o tratamento crônico com fluoxetina diminuiu a banda de LF (u.n) (condição  $F_{(2,71)} = 1,24$ ; P>0,05; ANOVA-two way; tratamento  $F_{(2,71)} = 6,82$ ; P<0,05; ANOVA-two way) do grupo ECR. O tratamento agudo aumentou a potência da banda HF (u.n) do IP (condição  $F_{(2,71)} = 1,93$ ; P>0,05; ANOVA-two way; tratamento  $F_{(2,71)} = 4,53$ ; P<0,05; ANOVA-two way). Já ao avaliar a razão das potências (LF/HF), observa-se que ambos os tratamentos diminuíram LF/HF (condição  $F_{(2,71)} = 0,82$ ; P>0,05; ANOVA-two way; tratamento  $F_{(2,71)} = 6,61$ ; P<0,05; ANOVA-two way)

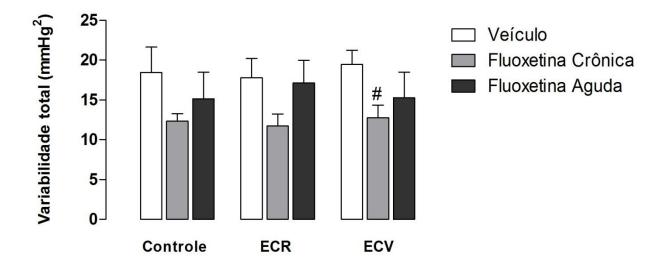
Ao analisar a sensibilidade do barorreflexo espontâneo (SBR), observese na figura 30 o ganho das sequências barorreflexas de animais que foram submetidos ao tratamento crônico e agudo com fluoxetina. Observa-se que não

houve efeito nem do tratamento e nem da condição (condição  $F_{(2,71)} = 2,81$ , P>0,05; ANOVA-two way; tratamento  $F_{(2,71)} = 0,41$ , P>0,05; ANOVA-two way) no ganho total da SBR. Além disso, a condição e o tratamento não apresentaram efeitos no ganho das sequências UP (condição  $F_{(2,71)} = 1,04$ , P>0,05; ANOVA-two way; tratamento  $F_{(2,71)} = 0,18$ , P>0,05; ANOVA-two way). Por outro lado, no ganho das sequências DOWN houve efeito do tratamento e da condição (condição  $F_{(2,71)} = 5.93$ , P<0,05; ANOVA-two way; tratamento  $F_{(2,71)} = 9,57$ , P>0,05; ANOVA-two way).

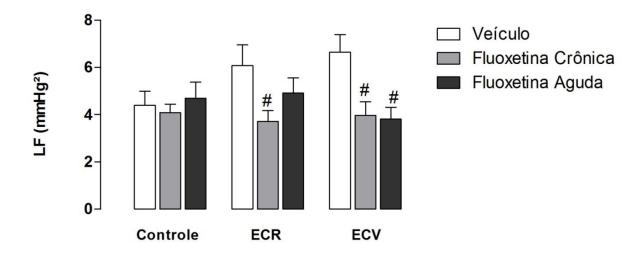
Com relação BEI, é possível observar na figura 31, que os animais que foram tratados com fluoxetina crônica e aguda não apresentaram efeito da condição e do tratamento no BEI de todas as sequências (condição  $F_{(2,71)} = 1,14$ , P>0,05; ANOVA-two way; tratamento  $F_{(2,71)} = 0,43$ , P>0,05; ANOVA-two way), bem como no BEI das sequências UP (condição  $F_{(2,71)} = 0,37$ , P>0,05; ANOVA-two way; tratamento  $F_{(2,71)} = 0,50$ , P>0,05; ANOVA-two way). O tratamento crônico com fluoxetina foi capaz reduzir o BEI das sequências DOWN (condição  $F_{(2,71)} = 2,11$ , P>0,05; ANOVA-two way; tratamento  $F_{(2,71)} = 5,11$ , P>0,05; ANOVA-two way).



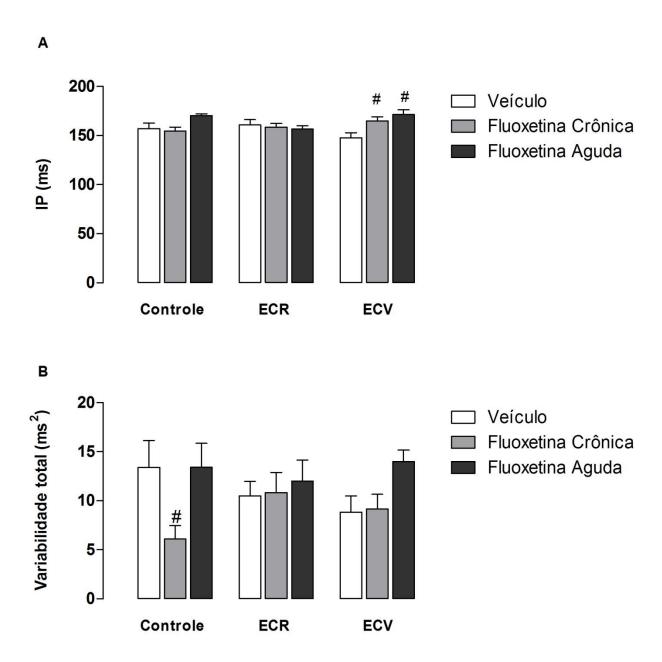
**Figura 24**. Pressão arterial sistólica (PAS) de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias e tratados com fluoxetina crônica ou aguda durante 21 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle x veículo (n=8); controle x fluoxetina crônica (n=11); controle x fluoxetina aguda (n=6); estresse crônico repetido (ECR x veículo n=9); ECR x fluoxetina crônica (n=11); ECR x fluoxetina aguda (n=8);estresse crônico variado (ECV x veículo, n=11); ECV x fluoxetina crônica (n=10); e ECV x fluoxetina aguda (n=6) \*P<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.



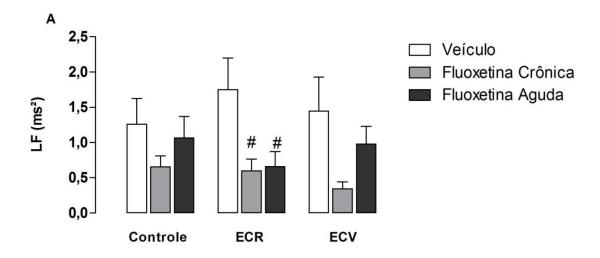
**Figura 25**. Variabilidade total da PAS de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias e tratados com fluoxetina crônica ou aguda durante 21 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle x veículo (n=8); controle x fluoxetina crônica (n=11); controle x fluoxetina aguda (n=6); estresse crônico repetido (ECR x veículo n=9); ECR x fluoxetina crônica (n=11); ECR x fluoxetina aguda (n=8); estresse crônico variado (ECV x veículo, n=11); ECV x fluoxetina crônica (n=10); e ECV x fluoxetina aguda (n=6) \*P<0,05 comparado ao grupo controle; \*P<0,05 comparado ao seu respectivo veículo. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.

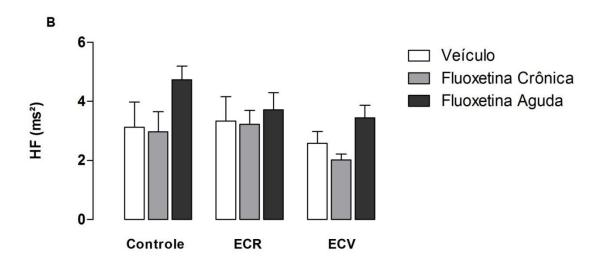


**Figura 26.** Potência da banda de baixa frequência (LF) do espectro da pressão arterial sistólica (PAS) de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias e tratados com fluoxetina crônica ou aguda durante 21 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle x veículo (n=8); controle x fluoxetina crônica (n=11); controle x fluoxetina aguda (n=6); estresse crônico repetido (ECR x veículo n=9); ECR x fluoxetina crônica (n=11); ECR x fluoxetina aguda (n=8); estresse crônico variado (ECV x veículo, n=11); ECV x fluoxetina crônica (n=10); e ECV x fluoxetina aguda (n=6) \*P<0,05 comparado ao grupo controle; \*P<0,05 comparado ao seu respectivo veículo. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.

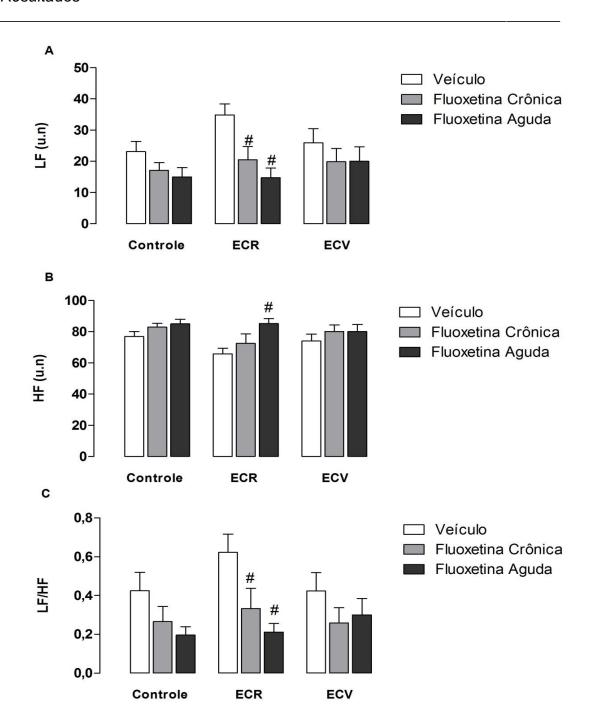


**Figura 27. (A)** Intervalo de pulso (IP) e **(B)** Variabilidade total do intervalo de pulso de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias e tratados com fluoxetina crônica ou aguda durante 21 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle x veículo (n=8); controle x fluoxetina crônica (n=11); controle x fluoxetina aguda (n=6); estresse crônico repetido (ECR x veículo n=9); ECR x fluoxetina crônica (n=11); ECR x fluoxetina aguda (n=8); estresse crônico variado (ECV x veículo, n=11); ECV x fluoxetina crônica (n=10); e ECV x fluoxetina aguda (n=6) \*P<0,05 comparado ao grupo controle; \*P<0,05 comparado ao seu respectivo veículo. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.





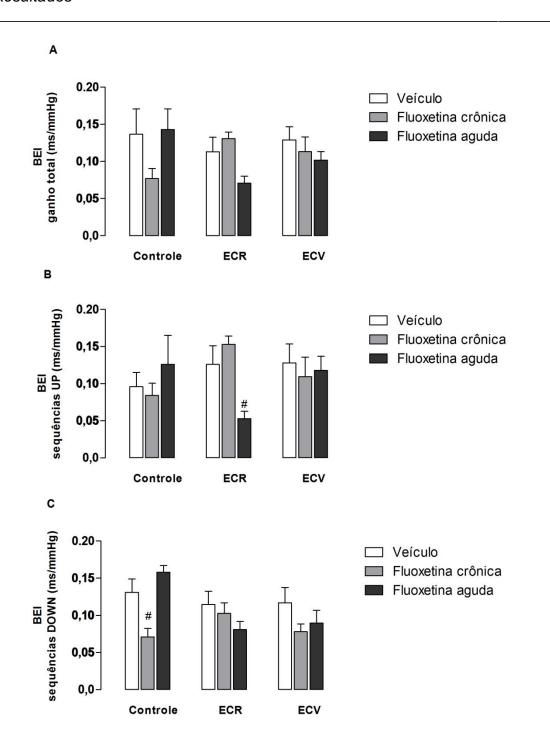
**Figura 28. (A)** Potência da banda de baixa frequência (LF) e **(B)** alta frequência (HF) do espectro do intervalo de pulso de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias e tratados com fluoxetina crônica ou aguda durante 21 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle x veículo (n=8); controle x fluoxetina crônica (n=11); controle x fluoxetina aguda (n=6); estresse crônico repetido (ECR x veículo n=9); ECR x fluoxetina crônica (n=11); ECR x fluoxetina aguda (n=8); estresse crônico variado (ECV x veículo, n=11); ECV x fluoxetina crônica (n=10); e ECV x fluoxetina aguda (n=6) \*P<0,05 comparado ao grupo controle; \*P<0,05 comparado ao seu respectivo veículo. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.



**Figura 29.(A)** Potência da banda de alta frequência (LF) **(B)** alta frequência (HF) do espectro do intervalo de pulso e **(C)** razão entre as potências das bandas de LF/HF de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias e tratados com fluoxetina crônica ou aguda durante 21 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle x veículo (n=8); controle x fluoxetina crônica (n=11); controle x fluoxetina aguda (n=6); estresse crônico repetido (ECR x veículo n=9); ECR x fluoxetina crônica (n=11); ECR x fluoxetina aguda (n=8); estresse crônico variado (ECV x veículo, n=11); ECV x fluoxetina crônica (n=10); e ECV x fluoxetina aguda (n=6) \*P<0,05 comparado ao grupo controle; \*P<0,05 comparado ao seu respectivo veículo. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.

Α 1,5todos os ganhos (ms/mmHg) Veículo Fluoxetina crônica Barorreflexo Fluoxetina aguda 1,0 0,5 0,0 **ECR ECV** Controle В 1,5 sequências UP (ms/mmHg) □ Veículo Fluoxetina crônica Barorreflexo Fluoxetina aguda 1,0 0,5 0.0-**ECR ECV** Controle C Sequências DOWN (ms/mmHg) 2,0 Veículo Fluoxetina crônica 1,5 Barorreflexo Fluoxetina aguda 1,0 0,5 0,0-Controle **ECR ECV** 

**Figura 30. (A)** Ganho de todas as sequências barorreflexas, **(B)** ganho das sequências UP e **(C)** ganho das sequências DOWN avaliados pelo método da sequência de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias e tratados com fluoxetina crônica ou aguda durante 21 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle x veículo (n=8); controle x fluoxetina crônica (n=11); controle x fluoxetina aguda (n=6); estresse crônico repetido (ECR x veículo n=9); ECR x fluoxetina crônica (n=11); ECR x fluoxetina aguda (n=8); estresse crônico variado (ECV x veículo, n=11); ECV x fluoxetina crônica (n=10); e ECV x fluoxetina aguda (n=6) \*P<0,05 comparado ao grupo controle; \*P<0,05 comparado ao seu respectivo veículo. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.



**Figura 31. (A)** Índice de efetividade do barorreflexo total (BEI), **(B)** BEI das sequências barorreflexas UP e **(C)** BEI das sequências barorreflexas DOWN de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias e tratados com fluoxetina crônica ou aguda durante 21 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle x veículo (n=8); controle x fluoxetina crônica (n=11); controle x fluoxetina aguda (n=6); estresse crônico repetido (ECR x veículo n=9); ECR x fluoxetina crônica (n=11); ECR x fluoxetina aguda (n=8); estresse crônico variado (ECV x veículo, n=11); ECV x fluoxetina crônica (n=10); e ECV x fluoxetina aguda (n=6) \*P<0,05 comparado ao grupo controle; \*P<0,05 comparado ao seu respectivo veículo. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.

6.10 Experimento de ativação do quimiorreflexo em ratos submetidos ao estresse crônico.

A figura 28 apresenta os traçados de animal, representativos de seus grupos, mostrando as alterações na pressão PA, FC e na respiração de um animal em condições basais e no momento da ativação do quimiorreflexo com KCN (40 μg/0,05 mL). É possível observar que a ativação do quimiorreflexo altera tanto as respostas cardiovasculares quanto respiratórias, promovendo uma resposta de aumento na PA e f<sub>R</sub> e diminuição FC.

6.10.1 Respostas cardiovasculares e ventilatórias à ativação do quimiorreflexo com KCN (40  $\mu$ g/0,05 mL) em animais submetidos ao estresse crônico.

Na figura 33 é apresentado o conjunto de variações na PAM e FC decorrentes do estresse crônico promovidas pela ativação do quimiorreflexo com KCN (40  $\mu$ g/0,05 mL). Como é possível observar, os grupos ECR e ECV promoveram uma diminuição na magnitude da resposta pressora à ativação do quimiorreflexo quando comparado ao grupo controle ( $F_{(2,30)} = 10,32$ ; P<0,05; ANOVA-one way), no entanto, não houve diferença significativa entre os grupos com relação à resposta bradicárdica ( $F_{(2,30)} = 1,048$ ; P>0.05; ANOVA one way).

Em todos os grupos experimentais, a  $f_R$  dos animais foi quantificada a cada 2 segundos durante 20 segundos antes e 20 segundos após a ativação

do quimiorreflexo com KCN. Além disso, também foram quantificados os valores de  $V_E$  e  $V_T$  a cada dois segundos antes da ativação do quimiorreflexo em condições basais. A figura 34 apresenta as alterações na  $f_R$  dos animais 20 segundos antes (basal) e 20 segundos após a administração de KCN. Com relação à resposta de aumento da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo, a análise dos resultados demonstrou que ambos os grupos que passaram pelo estresse crônico apresentaram maior aumento na média do aumento máximo da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo quando comparado ao grupo controle ( $F_{(2,30)} = 5,317$ ; P>0,05 ANOVA-one way).

Com relação a  $f_R$  basal, antes da ativação do quimiorreflexo, como é possível verificar na figura 35, os resultados apresentados demonstram que apenas o grupo ECV demonstrou maior aumento na  $f_R$  basal quando comparado ao grupo controle ( $F_{(2,30)} = 4.365$ ; P>0.05).

Já em relação aos parâmetros ventilatórios basais, a figura 36 apresenta o conjunto das variações médias nos valores de  $V_E$  e  $V_T$  entre os diferentes grupos. É possível observar que tanto o grupo ECR quanto o grupo ECV apresentaram atenuação nas respostas de volume corrente  $(V_T;)$ ;  $(F_{(2,30)} = 8.154 \text{ P} < 0.05; \text{ ANOVA-one way})$  ventilação minuto  $(V_E;)$ ;  $(F_{(2,30)} = 6.411; \text{ P} < 0.05; \text{ ANOVA-one way})$  quando comparados ao grupo controle.

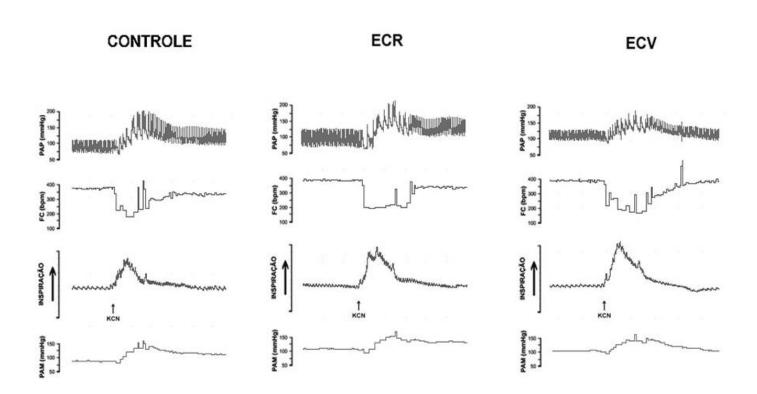
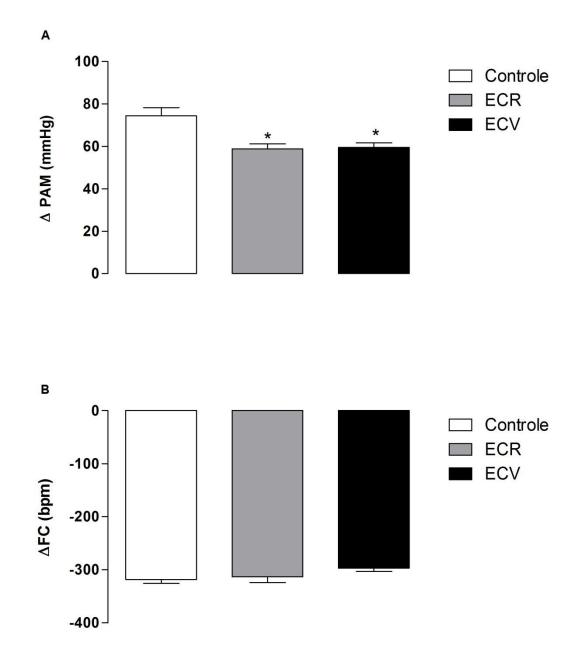
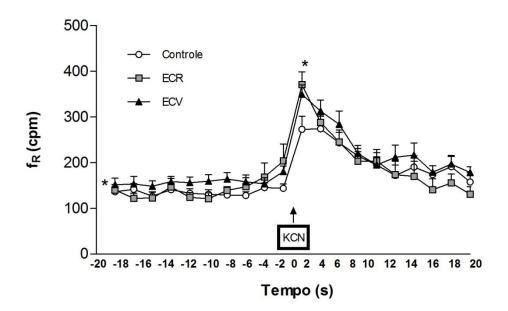


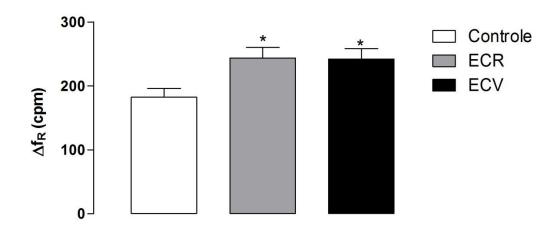
Figura 32. Traçados representativos da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM, mmHg), frequência cardíaca (FC, bpm) e das oscilações de pressão decorrentes da respiração de um animal (inspiração) antes (basal) e após administração de KCN. É possível observar a resposta característica pressora, bradicárdica e aumento da frequência respiratória após a administração de cianeto de potássio (KCN) entre os diferentes grupos controle, estresse crônico repetido (ECR) e estresse crônico variado (ECV).



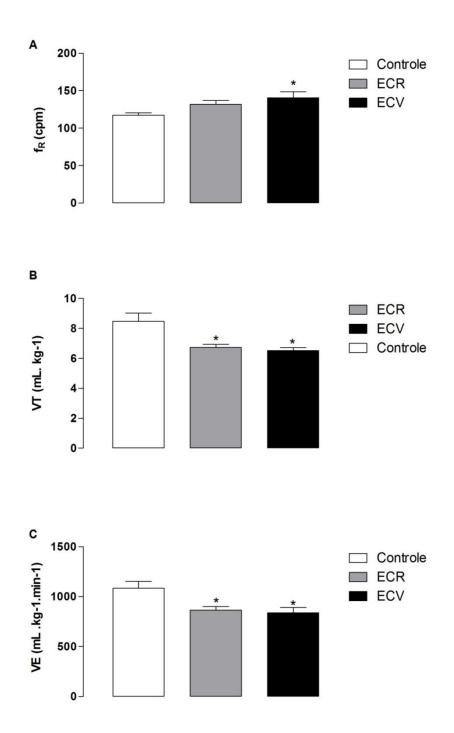
**Figura 33**. **(A)** Variação da pressão arterial média (PAM) e **(B)** frequência cardíaca (FC) à ativação de KCN de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle (n=11); estresse crônico repetido, (ECR, n=10); estresse crônico variado(ECV, n=10). (\*) Foram considerados significativos p<0,05; ANOVA-one way, seguido do post hoc Newman-Keuls.



**Figura 34**. Decurso temporal das alterações na frequência respiratória (f<sub>R</sub>, cpm) basal e na resposta de aumento da fR à ativação do quimiorreflexo com KCN de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias. Os pontos representam média ± EPM entre os grupos controle (n=11); estresse crônico repetido, (ECR, n=10); estresse crônico variado(ECV, n=10). (\*) Foram considerados significativos p<0,05; ANOVA-one way, seguido do post hoc Newman-Keuls.



**Figura 35.** Variações no aumento da f<sub>R</sub> a ativação do quimiorreflexo com KCN de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle (n=11); estresse crônico repetido, (ECR, n=10); estresse crônico variado(ECV, n=10). (\*) Foram considerados significativos p<0,05; ANOVA-one way, seguido do post hoc Newman-Keuls.



**Figura 36. (A)** Frequência respiratória ( $f_R$ , cpm) basal **(B)** volume corrente ( $V_T$ ) e **(C)** ventilação minuto ( $V_E$ ) de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias. As colunas representam média  $\pm$  EPM entre os grupos controle (n=11); estresse crônico repetido, (ECR, n=10); estresse crônico variado (ECV, n=10). (\*) Foram considerados significativos p<0,05; ANOVA-one way, seguido do post hoc Newman-Keuls.

6.10.2 Efeito do tratamento crônico e agudo com fluoxetina nas respostas cardiovasculares e ventilatórias à ativação do quimiorreflexo com KCN (40 µg/0,05 mL) em animais submetidos ao estresse crônico.

A figura 37 apresenta o conjunto de variações na PAM e FC decorrentes do estresse crônico promovidas pela ativação do quimiorreflexo com KCN (40  $\mu$ g/0,05 mL) e o efeito do tratamento crônico e agudo com fluoxetina frente às alterações ocasionadas pelo estresse crônico. Como é possível observar, tanto o grupo ECR quanto o grupo ECV apresentaram uma atenuação na magnitude da resposta pressora decorrente da ativação do quimiorreflexo quando comparados ao grupo controle ( $F_{(2,69)} = 17,15$ ; P<0,05; ANOVA-two way), já o tratamento crônico e agudo com fluoxetina foram capazes de aumentar a magnitude da resposta pressora ( $F_{(2,69)} = 35,67$ ; P<0.05; ANOVA-two way) quando comparados aos seus respectivos veículos, do mesmo modo, não havendo interação entre o tratamento e a condição ( $F_{(4,69)} = 13,53$ ; p<0,05; ANOVA-two way).

Em relação à FC, nossos resultados demonstraram que a resposta bradicárdica frente à ativação do quimiorreflexo com KCN (40  $\mu$ g/0,05 mL) não foi alterada pelo estresse crônico (F<sub>(2,69)</sub> = 0,93; P>0,05; ANOVA-two way). No entanto, o tratamento agudo com fluoxetina foi capaz de aumentar a magnitude da resposta bradicárdica quando comparado com seus respectivos veículos (F<sub>(2,69)</sub> = 9,47; P<0.05; ANOVA-two way).

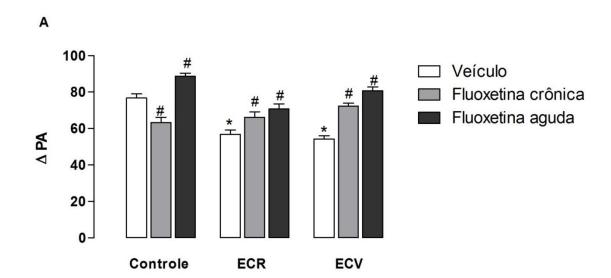
Em todos os grupos experimentais, a f<sub>R</sub> dos animais foi quantificada a cada 2 segundos durante 20 segundos antes e 20 segundos após a ativação

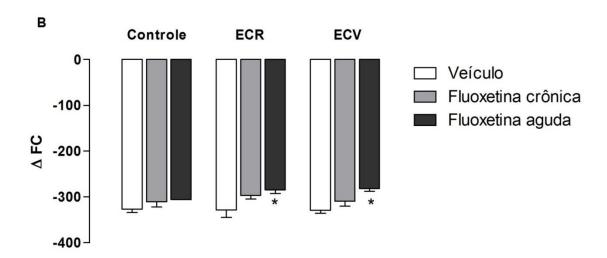
do quimiorreflexo com KCN. Além disso, também foram quantificados os valores de  $V_E$  e  $V_T$  a cada 2 segundos antes da ativação do quimiorreflexo em condições basais. A figura 38 apresenta as alterações na  $f_R$  dos animais 20 segundos antes (basal) e 20 segundos após a administração de KCN. Com relação à resposta de aumento da  $f_R$  frente à ativação do quimiorreflexo, é possível observar na figura 39 que ambos os grupos que passaram pelo estresse crônico apresentaram um aumento na média do aumento máximo da  $f_R$  decorrente da ativação do quimiorreflexo quando comparado ao grupo controle ( $F_{(2,69)} = 6,26$ ; P>0,05; ANOVA-two way), no entanto, tanto tratamento crônico quanto o tratamento agudo com fluoxetina foram capazes de provocar um aumento ainda maior na  $f_R$  em decorrência da ativação do quimiorreflexo ( $F_{(2,69)} = 7,34$ ; P>0,05; ANOVA-two way).

A figura 39 apresenta o conjunto de variações médias na  $f_R$  basal, antes da ativação do quimiorreflexo. Os resultados apresentados demonstram que apenas o grupo ECV foi capaz de promover um aumento na  $f_R$  basal quando comparado ao grupo controle ( $F_{(2,69)}=3,65;\ P<0,05;\ ANOVA-two$  way), reproduzindo os resultados anteriores. Todavia o tratamento crônico com fluoxetina foi capaz de atenuar o aumento da  $f_R$  basal no grupo ECR e ECV, porém ambos os tratamentos aumentaram a  $f_R$  do grupo controle, ou seja, os animais que não foram submetidos ao estresse crônico ( $F_{(2,69)}=5,74;\ P<0,05;\ ANOVA-two$  way).

Com relação aos parâmetros ventilatórios basais, a figura 40 (B,C) apresenta o conjunto das variações médias nos valores de V<sub>E</sub> e V<sub>T</sub> entre os diferentes grupos. É possível observar que tanto o grupo ECR quanto o grupo

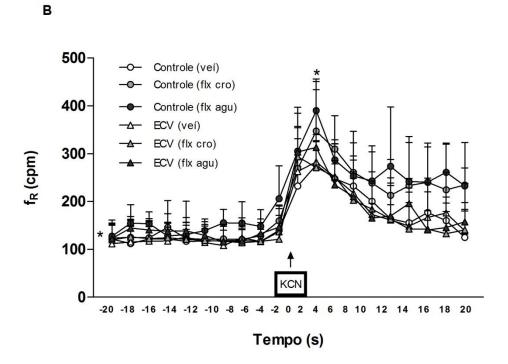
ECV promoveram uma atenuação nas respostas de volume corrente (V<sub>T</sub>;); ( $F_{(2.69)} = 5.96$ ; P<0,05; ANOVA-two way) e ventilação minuto (V<sub>E</sub>;); ( $F_{(2.69)} = 7.91$ ; P<0,05; ANOVA-two way) quando comparado ao grupo controle. No entanto ao analisar o V<sub>T</sub>, observa-se que houve interação entre o tratamento crônico com fluoxetina e o ECR, e controle, uma vez que o tratamento crônico foi capaz de prevenir as alterações ocasionadas frente o ECR, no entanto apresentou efeito por si só no grupo controle ( $F_{(2.69)}$  3,99; P<0.05; ANOVA-two way), provocando um aumento do V<sub>T</sub>. Em relação à ventilação minuto, tanto o ECR quanto o ECV foram capazes de atenuar a resposta ventilatória ( $F_{(2.69)} = 7.91$ ; P<0.05; ANOVA-two way), porém o tratamento crônico com fluoxetina apenas promoveu uma diminuição por si na resposta ventilatória do grupo controle ( $F_{(2.69)} = 6.17$ ; p<0.05; ANOVA-two way).



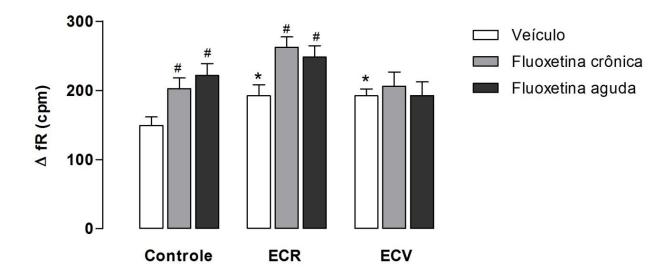


**Figura 37. (A)** Variação da pressão arterial média (PAM) e **(B)** frequência cardíaca (FC) à ativação de KCN de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias e tratados com fluoxetina crônica ou aguda durante 21 dias. As colunas representam média ± EPM entre os grupos controle x veículo (n=8); controle x fluoxetina crônica (n=10); controle x fluoxetina aguda (n=6); ECR + veículo (n=9); ECR + fluoxetina crônica (n=10); ECR + fluoxetina aguda (n=9) e ECV + veículo (n=9); ECV + fluoxetina crônica (n=10) e ECV + fluoxetina aguda (n=6). \*P<0,05 comparado ao grupo controle; \*P<0,05 comparado ao seu respectivo veículo. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.

A 500-Controle (veí) Controle (flx cro) Controle (flx agu) 400 ECR (vei) ECR (flx cro) 300 f<sub>R</sub> (cpm) ECR (flx agu) 200 100 0 -20 -18 -16 -14 -12 -10 -8 -6 -4 -2 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 Tempo (s)



**Figura 38. (A,B)** Discurso temporal das alterações na frequência respiratória (fR, cpm) basal e na resposta de aumento da fR à ativação do quimiorreflexo com KCN de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias e tratados com fluoxetina crônica ou aguda durante 21 dias. Os pontos representam média ± EPM entre os grupos controle x veículo (n=8); controle x fluoxetina crônica (n=10); controle + fluoxetina aguda (n=6); ECR x veículo (n=9); ECR + fluoxetina crônica (n=10); ECR + fluoxetina aguda (n=9) e ECV + veículo (n=9); ECV + fluoxetina crônica (n=10) e ECV + fluoxetina aguda (n=6).



**Figura 39.** Resposta de aumento da f<sub>R</sub> à ativação do quimiorreflexo com KCN de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias e tratados com fluoxetina crônica ou aguda durante 21 dias. As colunas e os pontos representam média ± EPM entre os grupos controle x veículo (n=8); controle + fluoxetina crônica (n=10); controle + fluoxetina aguda (n=6); ECR + veículo (n=9); ECR + fluoxetina crônica (n=10); ECR + fluoxetina aguda (n=9) e ECV + veículo (n=9); ECV + fluoxetina crônica (n=10) e ECV+ fluoxetina aguda (n=6). \*P<0,05 comparado ao grupo controle; \*P<0,05 comparado ao seu respectivo veículo. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni.

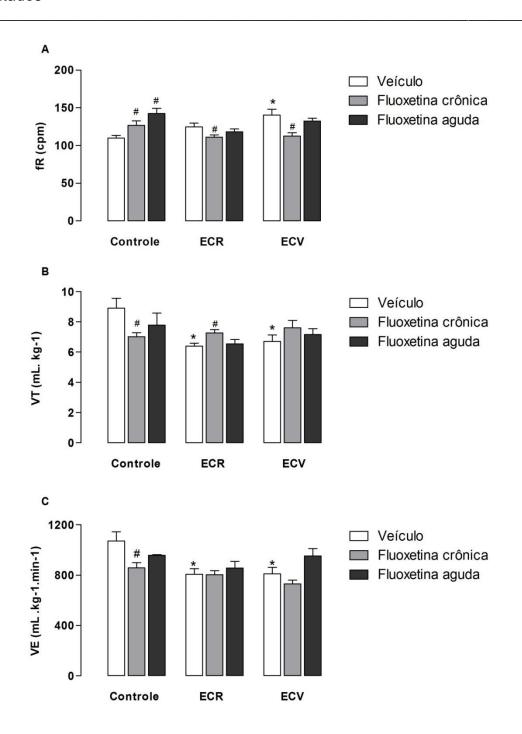


Figura 40. (A) Frequência respiratória ( $f_R$ , cpm) basal (B) volume corrente ( $V_T$ ) e (C) ventilação minuto ( $V_E$ ) de animais submetidos ao protocolo de estresse crônico durante 14 dias e tratados com fluoxetina crônica ou aguda durante 21 dias. As colunas e os pontos representam média  $\pm$  EPM entre os grupos controle x veículo (n=8); controle x fluoxetina crônica (n=10); controle x fluoxetina aguda (n=6); ECR + veículo (n=9); ECR + fluoxetina crônica (n=10); ECR x fluoxetina aguda (n=9) e ECV + veículo (n=9); ECV + fluoxetina crônica (n=10) e ECV + fluoxetina aguda (n=6). \*P<0,05 comparado ao grupo controle; \*P<0,05 comparado ao seu respectivo veículo. ANOVA-two way, seguido do post hoc Bonferroni

7. DISCUSSÃO

A hipótese do presente trabalho foi que o estresse crônico de diferentes tipos (ECR e ECV) altera as respostas cardiovasculares e ventilatórias que são ativadas por mecanismos autonômicos como o barorreflexo e quimiorreflexo, além de interferir na variabilidade da frequência cardíaca e, finalmente, que o tratamento com fluoxetina era capaz de prevenir as alterações ocasionadas pelo estresse crônico.

O presente trabalho demonstrou que os animais que foram submetidos ao ECV e ECR apresentaram um comportamento do tipo depressivo, uma que vez que demonstraram uma menor preferência por sacarose quando comparados aos animais controle, e que o tratamento crônico com fluoxetina foi capaz de prevenir essas alterações. Além disso, ambos os protocolos de estresse crônico reduziram o peso corporal dos animais, no entanto não alteraram os níveis basais de PAM e FC, sendo que o tratamento crônico ou agudo com fluoxetina não interferiu com esses parâmetros cardiovasculares.

Nosso estudo também demonstrou que o ECR, mas não o ECV é capaz de potencializar as respostas taquicárdicas e bradicárdicas frente à ativação do barorreflexo com a infusão de drogas vasoativas (fenilefrina e nitroprussiato de sódio) e que o tratamento crônico com fluoxetina foi capaz de prevenir as alterações ocasionas pelo ECR. Além disso, observamos que o estresse crônico é capaz de alterar a variabilidade do intervalo de pulso e a sensibilidade do barorreflexo, além de promover alterações da PA à ativação do quimiorreflexo, bem como os parâmetros respiratórios. Observamos ainda

que o tratamento crônico e agudo com fluoxetina interferiu na maioria dos parâmetros avaliados.

Inicialmente, nossos resultados demonstraram que animais que são submetidos ao estresse crônico apresentam uma diminuição pela preferência por sacarose. Levando em consideração que modelos de estresse crônico são bastante utilizados e apropriados para o estudo experimental de depressão (Katz et al., 1981). Willner et al., (1987) demonstraram que a exposição ao estresse crônico, seja em ratos ou camundongos, provoca uma diminuição na capacidade de resposta de recompensa, que geralmente é expressa por um menor consumo e preferência por solução de sacarose. No entanto, esse comportamento alterado, é revertido após o tratamento crônico com todas as principais classes de medicamentos antidepressivos, além disso, o tratamento crônico com drogas antidepressivas afeta o comportamento apenas dos animais que foram cronicamente estressados, sem alterar o comportamento dos animais que não sofreram estresse (D'Aquila et al., 1994, Willner, 1997).

A exposição ao estresse crônico é conhecida por alterar os mecanismos básicos da resposta ao estresse. Vários estudos na literatura tem demonstrado que a exposição ao estresse crônico provoca alterações anatômicas, comportamentais e neuroendócrinos, perda peso corporal e redução na ingestão de alimentos; indução à hipertrofia adrenal, involução do timo, baço e gânglios linfáticos;p modificação da plasticidade neuronal (Marti et al., 1994, Dominguez-Gerpe and Rey-Mendez, 1997, Marin et al., 2007).

Alguns estudos demonstram que o ECR e o ECV, em ratos jovens, afetam de maneiras diferentes o comportamento, peso corporal e secreção de

corticosterona plasmática (Marti et al., 1994, Ortiz et al., 1996, Marin et al., 2007). Nossos resultados demonstram quem ambos os estresses são capazes de diminuir o peso corporal dos animais. Estes resultados estão sd acordo com estudos realizados por Duarte et al., (2015a) que relatam que o ECR e o ECV diminuem o peso corporal dos animais adultos.

Ao analisar o efeito do tratamento com fluoxetina, nos grupos ECR e ECV, foi possível obsevar que não houve diferença significativa entre os pesos dos animais, no entanto o tratamento crônico com fluoxetina reduziu o peso dos animais não estressados. Vários estudos têm demonstrado que o tratamento crônico com fluoxetina reduz a ingestão de alimentos e o peso corporal em roedores (Yen and Fuller, 1992, Crestani et al., 2011). Estudos clínicos também tem relatado uma perda de peso dos pacientes durante o tratamento com fluoxetina (Serretti and Mandelli, 2010). O efeito do tratamento agudo com fluoxetina observado nos animais não estressados possivelmente se dá pela diferença de peso no início do protocolo.

Com relação à corticosterona plasmática, vários estudos demonstram que o estresse crônico aumenta os níveis de corticosterona quando os animais são expostos a um novo estressor (Magarinos and McEwen, 1995, Gadek-Michalska and Bugajski, 2003). Porém, assim como no estudo de Almeida et al., (2015), nossos resultados demonstraram que não houve efeito nem da condição e nem do tratamento sobre os parâmetros de corticosterona. As diferenças de protocolos podem ser responsáveis por essas diferenças, uma vez que nós coletamos as amostras 24 horas após a última sessão de estresse.

Além dessas alterações no peso e comportamento, vários estudos demonstram que o estresse pode levar a alterações no sistema circulatório, dependendo do tipo de estressor envolvido (Esch et al., 2002), uma vez que a exposição ao estresse provoca o aumento da PA e da FC (Irvine et al., 1997, Barres et al., 2004, Carrive, 2006, Tavares and Correa, 2006, Grippo et al., 2008, Duarte et al., 2015b). Nossos achados estão em conformidade com estudos de Grippo et al., (2006), que demonstraram que o estresse crônico não foi capaz de alterar os parâmetros basais de PA e FC.

Além disso, o tratamento com fluoxetina também não influenciou nesses parâmetros. Tais resultados estão de acordo com estudos de Almeida et al., (2015) eRoose et al., (1998) em que o estresse crônico e o tratamento com SSRIs não provocam alteração na pressão arterial, concordando com nossos resultados. Segundo, Fone and Porkess, (2008) o manuseio diário para o tratamento farmacológico e o manuseio excessivo do experimentador podem atenuar as consequências fisiológicas de estressores crônicos. Além disso, as diferenças de linhagens de ratos e idade poderiam explicar estas diferenças cardiovasculares.

Embora as alterações cardiovasculares sejam comuns frente à exposição ao estresse, elas podem variar de acordo com os diferentes estressores utilizados (Crestani et al., 2010c). Adicionalmente, alterações cardiovasculares provocadas por pelo estresse crônico são seguidas por alterações da atividade do barorreflexo (Duarte et al., 2015a). Baseado nisso, nossos resultados demonstraram que ECR foi capaz de aumentar a inclinação das curvas de regressão linear (ganho do barorreflexo) tanto do componente

PA.

taquicárdico quanto do componente bradicárdico do barorreflexo cardíaco. Logo, ocorreu uma maior variação da FC dos animais frente às alterações de

Do mesmo modo, a maior parte dos parâmetros da curva sigmoide também sofreram alterações (P1, P2, G e ΔP). Segundo Head and McCarty, (1987) o platô inferior da curva sigmóide, chamado de P1, é um indicador de atividade parassimpática máxima, enquanto que o platô superior, ou P2, é um indicador de atividade simpática máxima. É possível observar que houve um aumento de ambos os platôs após o ECR, demonstrando que o estresse crônico por restrição está afetando os componentes simpático e parassimpático do barorreflexo.

Relatos na literatura demonstram que respostas taquicárdicas exacerbadas constituem um importante fator de risco para isquemia do miocárdio e morte súbita (Palatini and Julius, 1997). Dessa forma, a potencialização das respostas reflexas taquicárdicas após o ECR podem constituir um risco fator de risco cardiovascular, já a facilitação das respostas bradicárdicas podem constituir um mecanismos de atenuação das alterações cardivasculares induzidas pelo estresse crônico (Duarte et al., 2015a).

Várias estruturas do sistema nervoso central podem ser responsáveis pela modulação da atividade do barorreflexo cardíaco em situações de estresse, uma vez que estudos demonstram que a estimulação ou a inibição de estruturas límbicas envolvidas com respostas autonômicas e comportamentais à ameaça, como o córtex pré frontal medial (Resstel et al., 2004, Resstel et al., 2006a), hipotálamo anterior (Simon et al., 1985) ou

hipotálamo posterior (Bauer et al., 1988), e substância cinzenta periaquedutal (Pelosi et al., 2007), são capazes de modular a função do barorreflexo.

Após verificar o efeito do estresse crônico sobre a atividade do barorreflexo, nós realizamos o tratamento crônico e agudo com fluoxetina, pois além das alterações cardiovasculares, o estresse crônico também pode desempenhar um papel importante na alteração do comportamento que é semelhante a depressão em humanos (Willner et al., 1992). Frequentemente na prática pré-clínica a fluoxetina é utilizada para reverter efeitos comportamentais ocasionados pelo estresse. Dessa forma, nossos resultados demonstraram que o tratamento crônico com fluoxetina preveniu as alterações ocasionadas pelo ECR, ou seja, os animais estressados cronicamente e que foram previamente tratados com fluoxetina por um período de 21 dias, com o término da 21 <sup>a</sup> injeção no dia do experimento, apresentaram uma diminuição da taquicardia e bradicardia evocadas pelo ECR, além de diminuir ambos os platôs, demonstrando que o tratamento crônico com fluoxetina inibiu tanto o componentes simpático quanto o parassimpático do barorreflexo, sem alterar a atividade barorreflexa dos animais que passaram pelo ECV. No entanto, o tratamento crônico com fluoxetina diminuiu as respostas reflexas de taquicardia e bradicardia do grupo controle.

Alguns mecanismos podem explicar o efeito da fluoxetina sobre a atividade do barorreflexo. Já foi relatado que estruturas do sistema nervoso central estão envolvidas na resposta do barorreflexo cardíaco. Considerando que estudos demonstraram que o tratamento crônico com fluoxetina de 21 dias aumenta o número de células que expressam a proteína Fos, um marcador de

ativação neuronal em várias áreas envolvidas no controle da atividade autonômica (Lino-de-Oliveira et al., 2001), é possível que a ação central da fluoxetina possa mediar essa alteração no barorreflexo, sugerindo que uma mudança no padrão de ativação central poderia influenciar a ação da fluoxetina sobre as respostas cardiovasculares frente ao estresse crônico por restrição.

Já em relação ao tratamento agudo com fluoxetina, nossos resultados demonstram que o tratamento agudo não interferiu na resposta taquicárdica, no entanto foi capaz de atenuar a resposta bradicárdica tanto do grupo controle, quanto do grupo ECR, analisados pelas curvas de regressão linear. O mesmo foi observado através das curvas sigmóides, onde o platô inferior foi reduzido com o tratamento agudo, sem alterar o platô superior.

Além das alterações cardiovasculares frente à atividade do barorreflexo o estresse crônico também promoveu alteração na variabilidade da do intervalo de pulso e a sensibilidade do barorreflexo espontâneo. A análise da variabilidade dos parâmetros cardiovasculares, como PA e FC, assim como a avaliação da sensibilidade do barorreflexo, são importante ferramentas utilizadas em estudos de modulação autonômica sobre o coração (Akselrod et al., 1981, (Bertinieri et al., 1985). Em nosso estudo, foi possível observar que o estresse crônico alterou a variabilidade do intervalo de pulso, uma vez que o ECR apresentou um aumento na PAS, seguido do aumento da potência da banda de LF do espectro PAS. A literatura demonstra que oscilações de baixa frequência, tanto da PA quanto do IP estão associadas à modulação simpática cardíaca (Malik and Camm, 1995). Apesar do aumento da PAS e aumento na potência da banda LF do espectro da PAS, esse aumento não foi suficiente

para ocasionar alteração da PA. Não houve aumento no IP, porém os protocolos de estresse crônico diminuiram as potências das bandas das de LF e HF do espectro do IP, bem como a razão das potências dessas bandas (LF/HH). ). As oscilações de baixa frequência (LF) do espectro do IP são mediadas, essencialmente, pelo sistema nervoso simpático, e dependem da integridade do barorreflexo (Malik and Camm, 1995). Já as oscilações de alta frequência (HF) estão relacionadas ao sistema nervoso parassimpático. Observa-se que apesar da potencialização simpática e parassimpática frente à ativação barorreflexa com a infusão de drogas vasoativas, as potências das bandas de baixa (LF) e alta (HF) frequência do espectro do IP foram diminuídas.

Vários estudos na literatura demonstram que uma das formas de avaliar a sensibilidade barorreflexa é através da quantificação da resposta reflexa de FC frente às variações de PA desencadeadas por drogas vasoativas (Crestani et al., 2006, Resstel et al., 2006b, Crestani et al., 2010a, Engi et al., 2012). No entanto, neste estudo a sensibilidade do barorreflexo também foi avaliada no domínio do tempo por meio do método da sequência.

Vários estudos na literatura relatam que o estresse crônico promove um aumento da atividade simpática e altera a sensibilidade do barorreflexo (Malliani et al., 1991, Grassi et al., 2004, Duarte et al., 2015b). Duarte et al., (2015b) demonstram que o estresse crônico em animais adolescentes aumentou a potência da banda de LF, HF e a razão LF/HF espectro do IP, indicando, portanto, tanto um aumento da modulação simpática cardíaca, como um aumento da modulação parassimpática cardíaca. Além disso, ao analisar a

sensibilidade do barorreflexo espontâneo, foi possível observar que os animais submetidos ao ECR apresentaram um aumento no ganho das sequências barorreflexas totais, demonstrando aumento na SBR. Segundo Grassi et al., (2004) alterações na atividade do barorreflexo tem sido relacionada à hiperatividade do tônus simpático.

Nossos resultados demonstraram que além das alterações nas potências das bandas de LF e HF do espectro do IP, o estresse crônico também foi capaz de diminuir a sensibilidade barorreflexa analisado através do método da sequência. Esses resultados vão de encontro com os dados supra citados. É importante ressaltar ainda que estudos da literatura demonstram que casos de hiperatividade simpática (Mortara et al., 1994), deficiência barorreflexa (Casadei et al., 1996) ou baixa responsividade do nodo sinusal (Malik and Camm, 1993) podem ocasionar diminuição do componente LF. Essa diminuição na potência da banda de LF e da razão LF/HF do espectro do IP, além da diminuição na SBR provavelmente podem ser explicadas por uma hiperatividade simpática, fazendo com que oscilações de baixa frequência sejam pouco evidentes no espectro do IP, como no caso de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (Van de Borne et al., 1997) em que nos estágios mais graves da doença a excitação neuro-hormonal ocorre uma redução da modulação da frequência cardíaca que apenas pequenas flutuações que são síncronas com atividade respiratória são detectáveis (Mortara et al., 1994).

No entanto, ao realizarmos o tratamento com fluoxetina, nossos resultados foram contraditórios do protocolo inicial, uma vez que o estresse não

diminui a modulação simpato-vagal como descrito anteriormente, apresentando dessa forma, uma tendência no aumento na modulação simpática na potência da banda de LF e da razão LF/HF do espectro do IP. Provavelmente à alta manipulação dos animais durante o tratamento crônico e agudo com fluoxetina pode ter interferido nos resultados, pois, de acordo com Fone and Porkess, (2008) o manuseio diário para o tratamento farmacológico pode atenuar as consequências fisiológicas de estressores crônicos.

Nossos resultados demonstram que o tratamento crônico atenuou a variabilidade total da PAS, bem como a LF/HF. No entanto, no trabalho de Almeida et al., (2015), esses parâmetros estavam aumentados após o tratamento crônico com fluoxetina. Esssas diferenças podem ser explicadas devido a diferença de protocolo, já que o mesmo realiza o tratamento de apenas 15 dias, enquanto nós realizamos o tratamento durante 21 dias. Da mesma forma nós observamos que o tratamento crônico com fluoxetina também diminuiu a modulação simpática do IP, demonstrado pelas potências da banda de LF (u.n) e pela razão LF/HF e aumentou a modulação vagal, representado pela potência da panda de HF (u.n). Esses resultados estão de acodo com estudo de (Cohen et al., 2000), no qual indivíduos diagnosticados com estresse pós traumático, apresentaram prejuízo na função autonômica que foi normalizada pelo tratamento crônico com fluoxetina, apresentando uma diminuição do componente simpático e um aumento do componente parassimpático cardíaco.

Inesperadamente, a avaliação da SBR por meio da técnica do método da sequência apresentou resultados diferentes do anterior, em virtude da

manipulação dos animais já discutida acima. Além disso, esses resultados também foram diferentes da abordagem farmacológica utilizada frente a ativação do barorreflexo. Embora os grupos controle e ECV tenham apresentado aumento das sequências DOWN após o tratamento agudo, ambos os grupos apresentaram uma diminuição da bradicardia ao aumento da pressão por infusão de fenilefrina. Essas alterações podem ser explicadas por diferentes circuitos neurais que podem estar envolvidos em alterações de pequenas faixas de pressão arterial, seguidas de respostas reflexas, e durante alterações mais pronunciadas de pressão arterial. Estudos de Crestani et al., (2010b) e de Andrade et al., (2014) demonstraram que a ablação aguda de regiões específicas do sistema nervoso central afeta diretamente as respostas de barorreflexo analisadas por diferentes métodos de avaliação do barorreflexo.

Outro importante reflexo autonômico é o quimiorreflexo (Fitzgerald, 2000), um importante mecanismo neural envolvido no controle cardiovascular e respiratório. Nossos resultados demonstram que o ECR e ECV provocam alterações cardiovasculares, uma vez que ambos os protocolo diminuiram a magnitude da resposta pressora sem alterar a frequência cardíaca. Esse aumento da pressão arterial, em resposta à ativação quimiorreflexa, sem alterar a frequência cardíaca, está de acordo com evidências anteriores que suportam o conceito de que os componentes simpático e parassimpático do quimiorreflexo são mediadas por diferentes vias neurais e mecanismos neuroquímicos independentes (Franchini and Krieger, 1993, Haibara et al., 1995).

Quando ocorre a ativação dos quimiorreceptores periféricos através da administração de KCN, impulsos são gerados no corpúsculo carotídeos e conduzidos pelos nervo vago e glossofaríngeo para o bulbo, onde os terminais aferentes realizam sinapse na região comissural do núcleo do trato solitário (cNTS) (Paton et al., 2001). Estudos sugerem que existe uma importante via que compõe a resposta simpática do quimiorreflexo, devido à existência de projeções diretas do NTS para a área bulbar ventrolateral rostral (RVLM). No entanto esta projeção não parece ser essencial para a resposta simpática da ativação do quimiorreflexo em ratos não anestesiados já que a lesão bilateral do núcleo paraventricular do hipotálamo reduz a magnitude e duração da resposta pressora (Olivan et al., 2001) sugerindo que outras estruturas também podem estar envolvidas na modulação das respostas cardiovasculares

Estudos realizado por Granjeiro et al., (2011) confirmam que estruturas supra-bulbares são capazes de modular as respostas cardiovasculares ativadas pelo quimiorreflexo, uma vez que a inibição do córtex pré limbíco com cloreto de cobalto (Cocl<sub>2</sub>) foi capaz de diminui a resposta pressora de animais não anestesiados sem alterar a resposta bradicárdica quando comparado ao grupo controle.

causadas pela ativação quimiorreflexa junto ao NTS e RVLM.

Sabe-se que o córtex pré-frontal (CPF), a substância periaquidutal cinzenta (PAG), a amígdala e o hipocampo são componentes do sistema límbico (O'Mara et al., 2001) e essas estruturas são responsáveis por integrar respostas autonômicas e emocionais, tanto que já foi demonstrado que algumas de destas áreas estão envolvidas na modulação de respostas

cardiovasculares (PA e FC) associadas ao estresse e ai medo condicionado ao contexto, que é um modelo de aprendizado associativo (Fanselow, 1980, Fendt and Fanselow, 1999, Resstel et al., 2006a, Resstel et al., 2008a, Resstel et al., 2008b, Resstel et al., 2008c). Dessa forma, possivelmente o ECR desencadeia alterações nessas principais áreas que por sua vez, estão modulando as respostas cardiovasculares, provocando uma diminuição na resposta pressora frente à ativação do quimiorreflexo.

O tratamento crônico com fluoxetina aumentou a magnitude da resposta pressora, sem alterar a bradicárdica. Entretanto, o tratamento agudo com fluoxetina foi capaz de aumentar a resposta pressora e atenuar a resposta bradicárdica. Como dito anteriormente, quando ocorre a ativação dos quimiorreceptores periféricos através da administração de KCN, os impulsos gerados são conduzidos até o cNTS (Paton et al., 2001). O núcleo do solitário trato (NTS) recebe projeções de neurônios serotoninérgicos do núcleo caudal da rafe (Thor and Helke, 1987), dessa forma, foi demonstrado que diminuição de serotonina no bulbo dorsomedial atenua tanto as respostas ventilatórias quanto as respostas simpáticas decorrentes da administração de KCN Kung and Scrogin, (2011), sugerindo que a serotonina nessa região facilitaria a atividade do quimiorreflexo, o que poderia justificar o aumento da magnitude da resposta pressora após o tratamento com fluoxetina. No entanto, quando ocorre a ativação do núcleo obscuro da rafe, o mesmo envia projeções de serotoninérgicas para o NTS, desempenhando um papel inibitório sobre a resposta bradicárdica frente à situação de hipóxia e consequente ativação do quimiorreflexo (Weissheimer and Machado, 2007), provavelmente levando a

diminuição da resposta bradicárdica evocada pela administração aguda com fluoxetina.

Além das alterações cardiovasculares o ECR e o ECV também provocaram alterações respiratórias basais, ocasionando a diminuição de V<sub>T</sub>, V<sub>E</sub> e aumento na magnitude da f<sub>R</sub> em resposta a ativação do quimiorreflexo. Sabe-se que a resposta ventilatória hipóxica (HVR) não é o produto de um único mecanismo, mas sim uma interação entre vários mecanismos distintos. Esses mecanismos dependem dos estímulos específicos que os evocam, como por exemplo intensidade e exposição à hipóxia; o tempo de curso da resposta (segundos a anos); e os efeitos sobre os componentes de ventilação (volume corrente x frequência) (Powell et al., 1998).

Alguns estudos demonstram que o estresse interfere na atividade respiratória e que a exposição ao estresse no início da vida altera a trajetória de desenvolvimento do sistema de controle respiratório (Bavis and Mitchell, 2008, Cayetanot et al., 2009). De acordo com Genest et al., (2004) animais previamente separados de suas mães no início da vida apresentam alterações ventilatórias como alteração do V<sub>E</sub>, além de alterar os componentes do quimiorreflexo central e periférico do controle respiratório (Kinkead et al., 2001). Porém, apesar de haver relatos na literatura evidenciando alterações respiratórias ocasionadas pelo estresso crônico na vida adulta, os estudos em animais sobre o tema ainda são escassos.

Animais que são submetidos ao estresse crônico apresentam comportamento do tipo depressivo, que são revertidos com o uso de inibidores da recaptação de serotonina. Baseado nisso, sabe-se que a serotonina (5HT)

desempenha um papel fundamental no controle da respiração (Bianchi et al., 1995) e que regiões do cérebro e a medula espinhal estão envolvidas com o controle respiratório por receber projeções serotoninérgicas principalmente a partir dos núcleos da rafe (Li et al., 1993). Segundo Kinkead et al., (2001), os neurônios do rafe caudal são ativados durante situações de hipóxia, e liberam 5HT em regiões circunvizinhas à neurônios respiratórios. Dessa forma, as alterações respiratórias também podem ser induzidas pela administração de SSRIs, como no caso da fluoxetina.

Baseado nisso, nosso estudo demonstrou que ambos os grupos que passaram pelo estresse crônico apresentaram um aumento na média da resposta máxima da  $f_R$ , no entanto, tanto o tratamento crônico quanto o tratamento agudo com fluoxetina foram capazes de provocar um aumento ainda maior na  $f_R$  em decorrência da ativação do quimiorreflexo. Os estudos Kung and Scrogin, (2011) demonstraram que a diminuição de serotonina no bulbo dorsomedial atenua as respostas ventilatórias a ativação ao KCN, sendo assim, provavelmente o aumento da  $f_R$  esteja relacionado a grande quantidade de serotonina disponível, facilitando assim sua ação nos centros respiratórios.

Com relação às variações médias na f<sub>R</sub> basal antes da ativação do quimiorreflexo, o ECV provocou um aumento na f<sub>R</sub> basal, porém o tratamento atenuou a f<sub>R</sub> basal no grupo ECR e ECV. Nota-se que tanto o grupo ECR quanto o grupo ECV apresentaram uma atenuação nas respostas V<sub>T</sub> e V<sub>E</sub>, porém o tratamento crônico com fluoxetina foi capaz de prevenir as alterações ocasionadas frente o ECR nos parâmetros de V<sub>T</sub>. Alguns estudos sugerem que os núcleos da rafe bulbares não são ativados em condições basais, uma vez

que a microinjeção de fluoxetina (inibidor da recaptação de 5-HT) ou muscimol (agonista de receptor GABAA) na rafe bulbar não causaram alterações na ventilação (Hodges et al., 2004, Taylor et al., 2004, Taylor et al., 2006), sugerindo a participação de outros núcleos nessas respostas.

Então, baseando-se no fato de que a resposta respiratória à hipóxia é um dos componentes mais importantes da ativação do quimiorreflexo, concluise que todos os mecanismos envolvidos na geração da atividade respiratória são bastante complexos devido aos diferentes núcleos que participam dessa resposta, como núcleos da rafe, NTS e núcleo ambíguo (Fuxe, 1965, Holtman, 1988, Li et al., 1993)

As diferentes respostas ventilatórias encontradas após o tratamento crônico e agudo com fluoxetina, provavelmente ocorrem pelos distintos efeitos moduladores da 5-HT sobre os diferentes receptores envolvidos no controle respiratório (Hodges and Richerson, 2008), uma vez que existem diversos subtipos diferentes de receptores 5-HT expressos nos núcleos respiratórios (Lein et al., 2007) que podem estar mediando respostas distintas.

## 8. CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo demonstram pela primeira vez que o estresse crônico provoca comportamento do tipo depressivo, além de alterar as respostas autonômicas de barorreflexo e quimiorreflexo e variabilidade cardiocirculatória (PAS e IP), o que pode desencadear patologias no sistema cardiovascular e respiratório. Adicionalmente, nosso trabalho é um dos primeiros a demonstrar que o tratamento crônico com fluoxetina previne a maioria das alterações ocasionadas pelo estresse crônico frente a essas alterações autonômicas.

## 9. REFERÊNCIAS

(Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Circulation 93:1043-1065.1996).

Aguilera G (Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. Trends Endocrinol Metab 9:329-336.1998).

Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ (Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. Science 213:220-222.1981).

Albaghdadi M (Baroreflex control of long-term arterial pressure. Revista Brasileira de Hipertensão 14:212-225.2007).

Almeida J, Duarte JO, Oliveira LA, Crestani CC (Effects of nitric oxide synthesis inhibitor or fluoxetine treatment on depression-like state and cardiovascular changes induced by chronic variable stress in rats. Stress 18:462-474.2015).

Annerbrink K, Olsson M, Hedner J, Eriksson E (Acute and chronic treatment with serotonin reuptake inhibitors exert opposite effects on respiration in rats: possible implications for panic disorder. J Psychopharmacol 24:1793-1801.2010).

Aubert AE, Seps B, Beckers F (Heart rate variability in athletes. Sports Med 33:889-919.2003).

Averill DB, Diz DI (Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. Brain Res Bull 51:119-128.2000).

Barres C, Cheng Y, Julien C (Steady-state and dynamic responses of renal sympathetic nerve activity to air-jet stress in sinoaortic denervated rats. Hypertension 43:629-635.2004).

Barros RC, Bonagamba LG, Okamoto-Canesin R, de Oliveira M, Branco LG, Machado BH (Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. Auton Neurosci 97:110-115.2002).

Bartlett D, Tenney SM (Control of Breathing in Experimental Anemia. Resp Physiol 10:384-&.1970).

Barton DA, Dawood T, Lambert EA, Esler MD, Haikerwal D, Brenchley C, Socratous F, Kaye DM, Schlaich MP, Hickie I, Lambert GW (Sympathetic activity in major depressive disorder: identifying those at increased cardiac risk? J Hypertens 25:2117-2124.2007).

Bauer RM, Vela MB, Simon T, Waldrop TG (A GABAergic mechanism in the posterior hypothalamus modulates baroreflex bradycardia. Brain Res Bull 20:633-641.1988).

Bavis RW, Mitchell GS (Long-term effects of the perinatal environment on respiratory control. J Appl Physiol (1985) 104:1220-1229.2008).

Bertinieri G, di Rienzo M, Cavallazzi A, Ferrari AU, Pedotti A, Mancia G (A new approach to analysis of the arterial baroreflex. J Hypertens Suppl 3:S79-81.1985).

Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J (Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. Physiol Rev 75:1-45.1995).

Biscoe TJ, Bradley GW, Purves MJ (The relation between carotid body chemoreceptor activity and carotid sinus pressure in the cat. J Physiol 203:40P.1969).

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).

Carnevali L, Bondarenko E, Sgoifo A, Walker FR, Head GA, Lukoshkova EV, Day TA, Nalivaiko E (Metyrapone and fluoxetine suppress enduring behavioral but not cardiac effects of subchronic stress in rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 301:R1123-1131.2011)

Carpeggiani C, Skinner JE (Coronary flow and mental stress. Experimental findings. Circulation 83:II90-93.1991).

Carrive P (Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. Clin Exp Pharmacol Physiol 33:1251-1254.2006).

Casadei B, Conway J, Forfar C, Sleight P (Effect of low doses of scopolamine on RR interval variability, baroreflex sensitivity, and exercise performance in patients with chronic heart failure. Heart 75:274-280.1996).

Cayetanot F, Larnicol N, Peyronnet J (Antenatal environmental stress and maturation of the breathing control, experimental data. Respir Physiol Neurobiol 168:92-100.2009).

Cohen H, Kotler M, Matar M, Kaplan Z (Normalization of heart rate variability in post-traumatic stress disorder patients following fluoxetine treatment: preliminary results. Isr Med Assoc J 2:296-301.2000).

Crestani CC, Alves FH, Busnardo C, Resstel LB, Correa FM (N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. Neurosci Res 67:317-326.2010a).

Crestani CC, Alves FH, Correa FM, Guimaraes FS, Joca SR (Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test. Behav Brain Funct 6:30.2010b).

Crestani CC, Alves FH, Resstel LB, Correa FM (The bed nucleus of the stria terminalis modulates baroreflex in rats. Neuroreport 17:1531-1535.2006).

Crestani CC, Deolindo MV, Alves FH, Resstel LB, Correa FM (Non-N-methyl-d-aspartate glutamate receptors in the lateral hypothalamus modulate cardiac

baroreflex responses in conscious rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 36:1079-1085.2009).

Crestani CC, Tavares RF, Alves FH, Resstel LB, Correa FM (Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. Stress 13:61-72.2010c).

Crestani CC, Tavares RF, Guimaraes FS, Correa FM, Joca SR, Resstel LB (Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. Eur J Pharmacol 670:527-533.2011).

Cruz FC, Marin MT, Leao RM, Planeta CS (Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. Int J Dev Neurosci 30:19-23.2012).

D'Aquila PS, Brain P, Willner P (Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. Physiol Behav 56:861-867.1994).

Dalymde B, Hazzledine JL, Howe A (Reflex Respiratory and Peripheral Vascular Responses to Stimulation of the Isolated Perfused Aortic Arch Chemoreceptors of the Dog. J Physiol 177:300-322.1965).

de Andrade O, Borghi SM, de Souza HC, Fontes MA, Martins-Pinge MC (Paraventricular nucleus of hypothalamus participates in the sympathetic modulation and spontaneous fluctuation of baroreflex during head up tilt in unanesthetized rats. Neurosci Lett 558:1-7.2014).

Dominguez-Gerpe L, Rey-Mendez M (Time-course of the murine lymphoid tissue involution during and following stressor exposure. Life Sci 61:1019-1027.1997).

Drorbaugh JE, Fenn WO (A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. Pediatrics 16:81-87.1955).

Drummond HA, Welsh MJ, Abboud FM (ENaC subunits are molecular components of the arterial baroreceptor complex. Ann N Y Acad Sci 940:42-47.2001).

Duarte JO, Cruz FC, Leao RM, Planeta CS, Crestani CC (Stress vulnerability during adolescence: comparison of chronic stressors in adolescent and adult rats. Psychosom Med 77:186-199.2015a).

Duarte JO, Planeta CS, Crestani CC (Immediate and long-term effects of psychological stress during adolescence in cardiovascular function: comparison of homotypic vs heterotypic stress regimens. Int J Dev Neurosci 40:52-59.2015b).

Duffin J (2010) The role of the central chemoreceptors: a modeling perspective. Respir Physiol Neurobiol 173:230-243.

Engi SA, Cruz FC, Leao RM, Correa FM, Planeta CS, Crestani CC (Effect of the single or combined administration of cocaine and testosterone on cardiovascular function and baroreflex activity in unanesthetized rats. J Cardiovasc Pharmacol 59:231-240.2012).

Esch T, Stefano GB, Fricchione GL, Benson H (Stress in cardiovascular diseases. Med Sci Monit 8:RA93-RA101.2002).

Fanselow MS (Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. Pavlov J Biol Sci 15:177-182.1980).

Fendt M, Fanselow MS (The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. Neurosci Biobehav Rev 23:743-760.1999).

Fitzgerald RS (Oxygen and carotid body chemotransduction: the cholinergic hypothesis - a brief history and new evaluation. Respir Physiol 120:89-104.2000).

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 36:2547-2555.2012).

Fone KC, Porkess MV (Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. Neurosci Biobehav Rev 32:1087-1102.2008).

Franchini KG, Krieger EM (Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic-denervated rats. Am J Physiol 262:R677-683.1992).

Franchini KG, Krieger EM (Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. J Auton Nerv Syst 42:63-69.1993).

Freet CS, Stoner JF, Tang X (Baroreflex and chemoreflex controls of sympathetic activity following intermittent hypoxia. Auton Neurosci 174:8-14.2013a).

Freet CS, Stoner JF, Tang X (Baroreflex and chemoreflex controls of sympathetic activity following intermittent hypoxia. Auton Neurosci.2013b).

Fuller RW, Holland DR, Yen TT, Bemis KG, Stamm NB (Antihypertensive effects of fluoxetine and L-5-hydroxytryptophan in rats. Life Sci 25:1237-1242.1979).

Fuxe K (Evidence for the Existence of Monoamine Neurons in the Central Nervous System. Iv. Distribution of Monoamine Nerve Terminals in the Central Nervous System. Acta Physiol Scand Suppl SUPPL 247:237+.1965).

Gadek-Michalska A, Bugajski J (Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress. J Physiol Pharmacol 54:449-459.2003).

Gelfand R, Lamberts.Cj (Dynamic Respiratory Response to Abrupt Change of Inspired Co2 at Normal and High Po2. J Appl Physiol 35:903-913.1973).

Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. J Physiol 554:543-557.2004).

Glassman AH, Shapiro PA (Depression and the course of coronary artery disease. Am J Psychiatry 155:4-11.1998).

Granjeiro EM, Gomes FV, Alves FH, Crestani CC, Correa FM, Resstel LB (Bed nucleus of the stria terminalis and the cardiovascular responses to chemoreflex activation. Auton Neurosci 167:21-26.2012).

Granjeiro EM, Scopinho AA, Correa FM, Resstel LB (Prelimbic but not infralimbic cortex is involved in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. Exp Physiol 96:518-527.2011).

Grassi G, Seravalle G, Dell'Oro R, Facchini A, Ilardo V, Mancia G (Sympathetic and baroreflex function in hypertensive or heart failure patients with ventricular arrhythmias. J Hypertens 22:1747-1753.2004).

Grippo AJ, Beltz TG, Weiss RM, Johnson AK (The effects of chronic fluoxetine treatment on chronic mild stress-induced cardiovascular changes and anhedonia. Biol Psychiatry 59:309-316.2006).

Grippo AJ, Moffitt JA, Johnson AK (Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 282:R1333-1341.2002).

Grippo AJ, Moffitt JA, Johnson AK (Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. Psychosom Med 70:435-443.2008).

Gulemetova R, Drolet G, Kinkead R (Neonatal stress augments the hypoxic chemoreflex of adult male rats by increasing AMPA receptor-mediated modulation. Exp Physiol 98:1312-1324.2013).

Haibara AS, Colombari E, Chianca DA, Jr., Bonagamba LG, Machado BH (NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. Am J Physiol 269:H1421-1427.1995).

Head GA, McCarty R (Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. J Auton Nerv Syst 21:203-213.1987).

Herman JP (Neural control of chronic stress adaptation. Front Behav Neurosci 7:61.2013).

Heymans C, Bouckaert JJ (Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. J Physiol 69:254-266.1930).

Hodges MR, Opansky C, Qian B, Davis S, Bonis J, Bastasic J, Leekley T, Pan LG, Forster HV (Transient attenuation of CO2 sensitivity after neurotoxic lesions in the medullary raphe area of awake goats. J Appl Physiol (1985) 97:2236-2247.2004).

Hodges MR, Richerson GB (Contributions of 5-HT neurons to respiratory control: neuromodulatory and trophic effects. Respir Physiol Neurobiol 164:222-232.2008).

Holtman JR, Jr. (Immunohistochemical localization of serotonin- and substance P-containing fibers around respiratory muscle motoneurons in the nucleus ambiguus of the cat. Neuroscience 26:169-178.1988).

Huether G, Doering S, Ruger U, Ruther E, Schussler G (The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. Psychiatry Res 87:83-95.1999).

Huang CC, Wu YS, Chen T, Chang WN, Du YC, Wu CJ, Yip HK, Tsai NW, Tan TY, Chuang YC, Wang HC, Lu CH (Long-term effects of baroreflex function after stenting in patients with carotid artery stenosis. Auton Neurosci 158:100-104.2010).

Irvine RJ, White J, Chan R (The influence of restraint on blood pressure in the rat. J Pharmacol Toxicol Methods 38:157-162.1997).

Jankord R, Herman JP (Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. Ann N Y Acad Sci 1148:64-73.2008).

Jankord R, Solomon MB, Albertz J, Flak JN, Zhang R, Herman JP (Stress vulnerability during adolescent development in rats. Endocrinology 152:629-638.2011).

Julius S (Autonomic nervous system dysregulation in human hypertension. Am J Cardiol 67:3B-7B.1991).

Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ (Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. Neurosci Biobehav Rev 5:247-251.1981).

Kinkead R, Bach KB, Johnson SM, Hodgeman BA, Mitchell GS (Plasticity in respiratory motor control: intermittent hypoxia and hypercapnia activate opposing serotonergic and noradrenergic modulatory systems. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 130:207-218.2001).

Kolber BJ, Wieczorek L, Muglia LJ (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered glucocorticoid or mineralocorticoid receptor function. Stress 11:321-338.2008).

Kung LH, Scrogin KE (Serotonin nerve terminals in the dorsomedial medulla facilitate sympathetic and ventilatory responses to hemorrhage and peripheral chemoreflex activation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 301:R1367-1379.2011).

Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliss TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramee AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR. Schaffnit K, Shapovalova NV, Sivisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wohnoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zwingman TA, Jones AR (Genomewide atlas of gene expression in the adult mouse brain. Nature 445:168-176.2007).

Levine S (Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. Psychoneuroendocrinology 30:939-946.2005).

Li YQ, Takada M, Mizuno N (The sites of origin of serotoninergic afferent fibers in the trigeminal motor, facial, and hypoglossal nuclei in the rat. Neurosci Res 17:307-313.1993).

Lino-de-Oliveira C, Sales AJ, Del Bel EA, Silveira MC, Guimaraes FS (Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. Brain Res Bull 55:747-754.2001).

Lugliani R, Whipp BJ, Seard C, Wasserma.K (Effect of Bilateral Carotid-Body Resection on Ventilatory Control at Rest and during Exercise in Man. New Engl J Med 285:1105-&.1971).

Magarinos AM, McEwen BS (Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. Neuroscience 69:83-88.1995).

Maley B, Elde R (The Ultrastructural-Localization of Serotonin Immunoreactivity within the Nucleus of the Solitary Tract of the Cat. J Neurosci 2:1499-1506.1982).

Malik M, Camm AJ (Components of heart rate variability--what they really mean and what we really measure. Am J Cardiol 72:821-822.1993).

Malik M, Camm AJ (1995) Heart rate variability. Armonk, NY: Futura Pub. Co.

Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S (Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. Circulation 84:482-492.1991).

Manaker S, Verderame HM (Organization of serotonin 1A and 1B receptors in the nucleus of the solitary tract. J Comp Neurol 301:535-553.1990).

Marin MT, Cruz FC, Planeta CS (Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. Physiol Behav 90:29-35.2007).

Marshall JM (Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. Physiol Rev 74:543-594.1994).

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 55:747-753.1994).

Mason P, Gao KM, Genzen JR (Serotonergic raphe magnus cell discharge reflects ongoing autonomic and respiratory activities. J Neurophysiol 98:1919-1927.2007).

McDougall SJ, Lawrence AJ, Widdop RE (Differential cardiovascular responses to stressors in hypertensive and normotensive rats. Exp Physiol 90:141-150.2005).

McEwen BS (The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. Brain Res 886:172-189.2000).

McEwen BS, Eiland L, Hunter RG, Miller MM (Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. Neuropharmacology 62:3-12.2012).

Merahi N, Orer HS, Laporte AM, Gozlan H, Hamon M, Laguzzi R (Baroreceptor reflex inhibition induced by the stimulation of serotonin3 receptors in the nucleus tractus solitarius of the rat. Neuroscience 46:91-100.1992).

Michelini LC (Vasopressin in the nucleus tractus solitarius: a modulator of baroreceptor reflex control of heart rate. Braz J Med Biol Res 27:1017-1032.1994).

Michelini LC (Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic preautonomic neurons on circulatory control: reflex mechanisms and changes during exercise. Clin Exp Pharmacol Physiol 34:369-376.2007).

Michelini LC, Morris M (Endogenous vasopressin modulates the cardiovascular responses to exercise. Ann N Y Acad Sci 897:198-211.1999).

Mortara A, La Rovere MT, Signorini MG, Pantaleo P, Pinna G, Martinelli L, Ceconi C, Cerutti S, Tavazzi L (Can power spectral analysis of heart rate variability identify a high risk subgroup of congestive heart failure patients with excessive sympathetic activation? A pilot study before and after heart transplantation. Br Heart J 71:422-430.1994).

Mortola JP, Frappell PB (On the barometric method for measurements of ventilation, and its use in small animals. Can J Physiol Pharmacol 76:937-944.1998).

Myers B, McKlveen JM, Herman JP (Glucocorticoid actions on synapses, circuits, and behavior: implications for the energetics of stress. Front Neuroendocrinol 35:180-196.2014).

Nakata T, Berard W, Kogosov E, Alexander N (Cardiovascular change and hypothalamic norepinephrine release in response to environmental stress. Am J Physiol 264:R784-789.1993).

Natelson BH, Ottenweller JE, Cook JA, Pitman D, McCarty R, Tapp WN (Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. Physiol Behav 43:41-46.1988).

O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J (The subiculum: a review of form, physiology and function. Prog Neurobiol 64:129-155.2001).

Olivan MV, Bonagamba LG, Machado BH (Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. Brain Res 895:167-172.2001).

Ortiz J, Fitzgerald LW, Lane S, Terwilliger R, Nestler EJ (Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress. Neuropsychopharmacology 14:443-452.1996).

Pacher P, Kecskemeti V (Cardiovascular side effects of new antidepressants and antipsychotics: new drugs, old concerns? Curr Pharm Des 10:2463-2475.2004).

Palatini P, Julius S (Association of tachycardia with morbidity and mortality: pathophysiological considerations. J Hum Hypertens 11 Suppl 1:S19-27.1997).

Papademetriou V, Doumas M, Faselis C, Tsioufis C, Douma S, Gkaliagkousi E, Zamboulis C (Carotid baroreceptor stimulation for the treatment of resistant hypertension. Int J Hypertens 2011:964394.2011).

Paton JF, Deuchars J, Li YW, Kasparov S (Properties of solitary tract neurones responding to peripheral arterial chemoreceptors. Neuroscience 105:231-248.2001).

Pazos A, Cortes R, Palacios JM (Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. Brain Res 346:231-249.1985).

Peeters BW, Broekkamp CL (Involvement of corticosteroids in the processing of stressful life-events. A possible implication for the development of depression. J Steroid Biochem Mol Biol 49:417-427.1994).

Pelosi GG, Resstel LB, Correa FM (Dorsal periaqueductal gray area synapses modulate baroreflex in unanesthetized rats. Auton Neurosci 131:70-76.2007).

Powell FL, Milsom WK, Mitchell GS (Time domains of the hypoxic ventilatory response. Respir Physiol 112:123-134.1998).

Prado RLd (Variabilidade da Freqüência Cardíaca: Estudo comparativo das respostas autonômicas cardiovasculares em atletas de Futsal e sedentários jovens.2005).

Pratt GD, Bowery NG (The 5-Ht3 Receptor Ligand, [H-3] Brl 43694, Binds to Presynaptic Sites in the Nucleus Tractus Solitarius of the Rat. Neuropharmacology 28:1367-1376.1989).

Pumprla J, Howorka K, Groves D, Chester M, Nolan J (Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. Int J Cardiol 84:1-14.2002).

Resstel LB, Alves FH, Reis DG, Crestani CC, Correa FM, Guimaraes FS (Anxiolytic-like effects induced by acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis. Neuroscience 154:869-876.2008a).

Resstel LB, Correa FM, Guimaraes FS (The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. Cereb Cortex 18:2027-2035.2008b).

Resstel LB, Fernandes KB, Correa FM (Medial prefrontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. Brain Res 1015:136-144.2004).

Resstel LB, Joca SR, Correa FM, Guimaraes FS (Effects of reversible inactivation of the dorsal hippocampus on the behavioral and cardiovascular responses to an aversive conditioned context. Behav Pharmacol 19:137-144.2008c).

Resstel LB, Joca SR, Guimaraes FG, Correa FM (Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. Neuroscience 143:377-385.2006a).

Resstel LB, Tirapelli CR, Lanchote VL, Uyemura SA, de Oliveira AM, Correa FM (Chronic ethanol consumption alters cardiovascular functions in conscious rats. Life Sci 78:2179-2187.2006b).

Roche M, Harkin A, Kelly JP (Chronic fluoxetine treatment attenuates stressor-induced changes in temperature, heart rate, and neuronal activation in the olfactory bulbectomized rat. Neuropsychopharmacology 32:1312-1320.2007).

Roose SP, Glassman AH, Attia E, Woodring S, Giardina EG, Bigger JT, Jr. (Cardiovascular effects of fluoxetine in depressed patients with heart disease. Am J Psychiatry 155:660-665.1998).

Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J (Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. Circulation 99:2192-2217.1999).

Selye H (The stress concept. Can Med Assoc J 115:718.1976).

Sequeira H, Viltart O, Ba-M'Hamed S, Poulain P (Cortical control of somato-cardiovascular integration: neuroanatomical studies. Brain Res Bull 53:87-93.2000).

Serretti A, Mandelli L (Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis. J Clin Psychiatry 71:1259-1272.2010).

Simon OR, Basuray BN, West WL, Copeland R (Interaction between the baroreflex and anterior hypothalamic stimulation. Demonstration of a noradrenergic involvement. Neuropharmacology 24:665-675.1985).

Steinbusch HW (Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. Neuroscience 6:557-618.1981).

Sved AF, Gordon FJ (Amino-Acids as Central Neurotransmitters in the Baroreceptor Reflex Pathway. News in Physiological Sciences 9:243-246.1994).

Tavares RF, Correa FM (Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. Neuroscience 143:231-240.2006).

Taylor NC, Li A, Green A, Kinney HC, Nattie EE (Chronic fluoxetine microdialysis into the medullary raphe nuclei of the rat, but not systemic administration, increases the ventilatory response to CO2. J Appl Physiol (1985) 97:1763-1773.2004).

Taylor NC, Li A, Nattie EE (Ventilatory effects of muscimol microdialysis into the rostral medullary raphe region of conscious rats. Respir Physiol Neurobiol 153:203-216.2006).

Thor KB, Helke CJ (Serotonin- and substance P-containing projections to the nucleus tractus solitarii of the rat. J Comp Neurol 265:275-293.1987).

Thor KB, Helke CJ (Serotonin and substance P colocalization in medullary projections to the nucleus tractus solitarius: dual-colour immunohistochemistry combined with retrograde tracing. J Chem Neuroanat 2:139-148.1989).

Ulrich-Lai YM, Herman JP (Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. Nat Rev Neurosci 10:397-409.2009).

Ungvari Z, Pacher P, Koller A (Serotonin reuptake inhibitor fluoxetine decreases arteriolar myogenic tone by reducing smooth muscle [Ca2+]i. J Cardiovasc Pharmacol 35:849-854.2000).

van de Borne P, Montano N, Pagani M, Oren R, Somers VK (Absence of low-frequency variability of sympathetic nerve activity in severe heart failure. Circulation 95:1449-1454.1997).

Weissheimer KV, Machado BH (Inhibitory modulation of chemoreflex bradycardia by stimulation of the nucleus raphe obscurus is mediated by 5-HT3 receptors in the NTS of awake rats. Auton Neurosci-Basic 132:27-36.2007).

Willner P (Animal models of depression: an overview. Pharmacol Ther 45:425-455.1990).

Willner P (Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Psychopharmacology (Berl) 134:319-329.1997).

Willner P, Muscat R, Papp M (Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia - a Realistic Animal-Model of Depression. Neurosci Biobehav R 16:525-534.1992).

Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R (Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. Psychopharmacology (Berl) 93:358-364.1987).

Wood SK, McFadden KV, Grigoriadis D, Bhatnagar S, Valentino RJ (Depressive and cardiovascular disease comorbidity in a rat model of social stress: a putative role for corticotropin-releasing factor. Psychopharmacology (Berl) 222:325-336.2012).

Yen TT, Fuller RW (Preclinical pharmacology of fluoxetine, a serotonergic drug for weight loss. Am J Clin Nutr 55:177S-180S.1992).

## 10. APÊNDICES

**Tabela 2.** Valores de percentagem (%) de ingestão de sacarose entre os grupos veículos e tratados cronicamente com fluoxetina (10mg/kg).

Grupo	Preferência por sacarose (%)
Controle veículo (n=5)	95,40 ± 1,664
Controle fluoxetina crônica (n=5)	97,54 ± 1,053
ECR veículo (n=5)	82,27 ± 4,812*
ECR fluoxetina crônica (n=5)	89,93 ± 3,195#
ECV veículo (n=5)	80,30 ± 4,811*
ECV fluoxetina crônica (n=5)	91,69 ± 1,774#

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's #P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

**Tabela 3.** Valores de média e EPM do peso corporal (g), e valores médios basal de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (Fc) obtidos do grupo controle, ECR e ECV.

Grupo	Peso corporal (g)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
CONTROLE (n=11)	403,9 ± 6,117	107,5 ± 1,609	362.5± 10,90
ECR (n=10)	383,4 ± 5,518 *	$108,2 \pm 1,153$	$364,1 \pm 5,290$
ECV (n=10)	384,5 ± 5,452*	106,3 ± 2,526	360 ± 8,471

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

**Tabela 4.** Valores de média e EPM do peso corporal (g), e valores médios basal de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (Fc) obtidos entre os diferentes grupos após o estresse crônico e tratamento crônico e agudo com fluoxetina (10mg/kg).

Grupo	Peso corporal (g)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Controle veículo (n=8)	423 ± 6,555	104,1 ± 2,539	375,5 ± 13,90
Controle fluoxetina crônica (n=11)	385,5 ± 6,344#	$94,00 \pm 8,595$	$386,3 \pm 12,80$
Controle fluoxetina aguda (n=6)	419,2 ± 8,327	111,0 ± 0,3651	$347,3 \pm 7,697$
ECR veículo (n=9)	399,4 ± 4,096*	$108,4 \pm 2,935$	$377.0 \pm 13.74$
ECR fluoxetina crônica (n=11)	313,6 ± 5,508#	$105,4 \pm 3,228$	$377,9 \pm 7,694$
ECR fluoxetina aguda (n=8)	372 ± 8,683#	$106,0 \pm 2,113$	$388.0 \pm 6.876$
ECV veículo (n=11)	365,8 ± 5,617*	$99,00 \pm 9,339$	391,7 ± 15,95
ECV fluoxetina crônica (n=10)	$365 \pm 3{,}630$	$103.8 \pm 2.670$	$357,5 \pm 8,659$
ECV fluoxetina aguda (n=6)	403 ± 4,900#	$104.8 \pm 6.498$	358,7 ± 13,44

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

**Tabela 5.** Valores de média e EPM dos parâmetros derivados das curvas sigmóides após o estresse crônico entre os diferentes grupos.

Grupo	G (bpm/mmHg)	P1 (bpm)	P2 (bpm)	ΔP (bpm)	PA <sub>50</sub> (mmHg)
CONTROLE (n=9)	-1,311 ± 0,0779	-76 ± 8,360	56,78 ± 6,557	132,8 ± 12,77	5,407 ± 2,953
ECR (n=7)	-2,236 ± 0,1454*	-108 ± 11,48*	95,57 ± 10,02*	204,4 ± 15,87*	0,03813 ± 1,992
ECV (n=12)	-1346 ± 0,0876	-70,42 ± 5,81	58,42 ± 6,929	120,5 ± 12,82	5,302 ± 3,045
	F <sub>(2,27)</sub> = 24	F <sub>(2,27)</sub> = 5,80	F <sub>(2,27)</sub> = 6,90	F <sub>(2,27)</sub> = 9,43	F <sub>(2,27)</sub> = 0,9

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA one way, seguido por post hoc Newman-Keuls

<sup>\*</sup>P>0,05 versus seus respectivos veículos, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

**Tabela 6.** Valores de média e EPM dos parâmetros derivados das curvas sigmóides após o estresse crônico entre os diferentes grupos após o estresse crônico e tratamento crônico e agudo com fluoxetina (10mg/kg).

Grupo	G	P1	P2	ΔP	PA <sub>50</sub>
	(bpm/mmHg)	(bpm)	(bpm)	(bpm)	(mmHg)
Con x Veículo (n=7)	-1,64 ± 0,03	-84,4 ± 2,7	75,14 ± 3	159 ± 9,09	3,01 ± 2,67
ECR x Veículo (n=7)	-1,09 ± 0,05*	-113,7 ± 4,1*	102,3 ± 1*	216 ± 9,22*	1,66 ± 2,43
ECV x Veículo (n=9)	-1,641 ± 0,03	-83 ± 3	80,5 ± 4,1	170 ± 13,8	5,68 ± 4,44
Con x flu crônica (n=7)	-2,384 ± 0,05#	-53,8 ± 3,3#	48,8 ± 3,5#	102,7 ± 15 <sup>#</sup>	$-3,52 \pm 4,01$
ECR x flu crônica (n=8)	-1,917 ± 0,04#	-86 ± 2,7#	70,3 ± 1,4#	154 ± 11,4 <sup>#</sup>	$3,05 \pm 2,88$
ECV x flu crônica (n=8)	-1,391 ± 0,03#	-95 ± 8	73,6 ± 2,2	157 ± 11,6	$1,282 \pm 1,65$
Con x flu aguda (n=6)	1,85 ± 0,064	-69,6 ± 2,5#	$77.8 \pm 5$	147,4 ± 14	-1,59 ± 2,22
ECR x flu aguda (n=7)	-1,23 ± 0,07#	-79,7 ± 0,9#	$94.2 \pm 5.5$	174 ± 14,2 <sup>#</sup>	-0,82 ± 3,53
ECV x flu aguda(n=6)	-1,71 ± 0,02	-95 ± 8	$75 \pm 2.7$	155 ± 9,6	2,67 ± 3,95
Condição:	$F_{(2,55)}$ = 13,33	$F_{(2,55)}$ = 6,31	$F_{(2,55)}$ = 5,18	F <sub>(2,55)</sub> = 66,63	$F_{(2,55)}$ = 0,98
Tratamento:	$F_{(2,55)}$ = 11,92	$F_{(2,55)}$ = 6,11	$F_{(2,55)}$ = 3,27	F <sub>(2,55)</sub> = 63,03	$F_{(2,55)}$ = 1,01
Interação:	$F_{(4,55)}$ = 7,30	$F_{(4,55)}$ = 1,17	$F_{(4,55)}$ = 0,60	F <sub>(4,55)</sub> = 11,26	$F_{(4,55)}$ = 0,45

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

**Tabela 7.** Valores de média e EPM da pressão arterial sistólica (PAS), variabilidade total e LF de animais controle, ECR e ECV.

Grupo	PAS (mmHg)	Variabilidade total (mmHg²)	LF (mmHg²)
CONTROLE (n=11)	127,5± 3,944	11,90 ± 1,533	2,647 ± 0,3161
ECR (n=10)	135,2 ± 4,171	16,07 ± 1,832	$3,960 \pm 0,4559^*$
ECV (n=10)	135,3± 3,913*	15,68± 3,049	$3,287 \pm 0,2696$
-01 (ii 10)	,-	-,,-	-,,

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA one way, seguido por post hoc Newman-Keuls

<sup>\*</sup>P>0,05 versus seus respectivos veículos, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

**Tabela 8.** Valores de média e EPM de intervalo de pulso (IP), variabilidade total e LF e HF de animais controle, ECR e ECV.

Grupo	IP (ms)	Variabilidade total (ms²)	LF (ms²)	HF (ms²)
CONTROLE (n=11)	162,8 ± 2,044	14,14 ± 2,167	1,135 ± 0,1534	4,248 ± 0,5351
ECR (n=10)	162,2 ± 1,625	11,04 ± 1,836	0,5600 ± 0,1355*	2,194 ± 0,2678*
ECV (n=10)	159,9 ± 3,851	10,89 ± 1,841	$0,4890 \pm 0,0609^*$	2,691 ± 0,3127*

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA one way, seguido por post hoc Newman-Keuls

**Tabela 9.** Valores de média e EPM de LF (u.n), HF (u.n), e razão LF/HF de animais controle, ECR e ECV.

Grupo	LF (un)	HF (un)	LF/HF
CONTROLE (n=11)	23,91 ± 1,998	76,09 ± 1,998	$0,3464 \pm 0,03767$
ECR (n=10)	15,70 ± 1,892*	83,67 ± 1,993*	0,2320 ± 0,03527*
ECV (n=10)	17,40 ± 1,815*	82,60 ± 82,60*	0,2190 ± 0,02822*

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA one way, seguido por post hoc Newman-Keuls

**Tabela 10.** Valores de média e EPM de ganho das sequências totais, número ganho das sequências barorreflexas UP e ganho das sequências barorreflexas DOWN de ratos em condições controle e que foram submetidos ao ECR e ECV.

Grupo	Sequências totais (ms/mmHg)	Sequências UP (ms/mmHg)	Sequências Down (ms/mmHg)
CONTROLE (n=11)	1,239 ± 0,05043	1,302 ± 0,1553	1,313 ± 0,1376
ECR (n=10)	$0,8052 \pm 0,05036^*$	0,7746 ± 0,05462*	0,8470 ± 0,05898*
ECV (n=10)	0,7684 ± 0,1099*	0,4952± 0,1041*	0,9387 ± 0,07821*

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA one way, seguido por post hoc Newman-Keuls

**Tabela 11.** Valores de média e EPM de pressão arterial sistólica (PAS), variabilidade total e LF após o estresse crônico e tratamento crônico e agudo com fluoxetina (10 mg/kg).

Grupo	PAS (mmHg)	Variabilidade total (mmHg²)	LF (mmHg²)
Controle veículo (n=8)	130,5 ± 3,396	12,35 ± 0,9265	4,399 ± 0,5878
Controle fluoxetina crônica (n=11)	130,3 ± 3,284	15,16 ± 3,329	4,075 ± 0,5759
Controle fluoxetina aguda (n=6)	136,7 ± 1,838	$17,79 \pm 3,329$	$4,700 \pm 0,6840$
ECR veículo (n=9)	134,9± 2,685	17,79 ± 2,431	$6,078 \pm 0,8706$
ECR fluoxetina crônica (n=11)	$132,6 \pm 4,640$	11,76 ± 1,485	3,317 ± 0,4647#
ECR fluoxetina aguda (n=8)	133,6 ± 2,672	17,15 ± 2,826	4,918 ± 0,6383
ECV veículo (n=11)	138,8 ± 3,758	19,45 ± 1,775	$6,645 \pm 0,7432$
ECV fluoxetina crônica (n=10)	128,4 ± 2,634	12,75 ± 1,604#	3,968 ± 0,5812#
ECV fluoxetina aguda (n=6)	$130,7 \pm 8,965$	15,26 ± 3,235	3,808 ± 0,5042#

<sup>\*</sup>P>0,05 versus seus respectivos veículos, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

**Tabela 12.** Valores de média e EPM de intervalo de pulso (IP), potência das bandas de LF e HF do espectro do IP após o estresse crônico e tratamento crônico e agudo com fluoxetina (10mg/kg) entre os diferentes grupos.

Grupo	IP (ms)	Variabilidade total (ms²)	LF (ms²)	HF (ms²)
Controle veículo (n=8)	157,1 ± 5,521	13,40 ± 2,718	1,260 ± 0,3662	3,130 ± 0,8483
Controle fluoxetina crônica	154,7 ± 3,957	6,094 ± 1,373#	0,6545 ± 0,1561	2,969 ± 0,6862*
(n=11)  Controle fluoxetina aguda (n=6)	170,3 ± 1,801	$11,59 \pm 2,308$	$1,067 \pm 0,3007$	4,732 ± 0,4620*
ECR veículo (n=9)	$160,8 \pm 5,346$	10,49 ± 1,510	1,751 ± 0,4479	3,341 ± 0,8153
ECR fluoxetina crônica (n=11)	158,6 ± 3,367	10,82 ± 2,055	$0,5950 \pm 0,1695^{\#}$	$3,228 \pm 0,4697$
ECR fluoxetina aguda (n=8)	156,6 ± 3,459	12,01 ± 2,140	0,6575 ± 0,2140#	$3,719 \pm 0,5736$
ECV veículo (n=11)	147,7 ± 5,221	9,244 ± 1,772	1,5661 ± 0,5098	$2,022 \pm 0,1954$
ECV fluoxetina crônica (n=10)	164,9 ± 4,1881#	9,177 ± 1,488	0,34440 ± 0,0958	$2,022 \pm 0,1954$
ECV fluoxetina aguda (n=6)	171,3 ± 4,984#	13,99 ± 1,156	0,9783 ± 0,2531	$3,448 \pm 0,4207$

<sup>\*</sup>P>0,05 versus seus respectivos veículos, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

<sup>\*</sup>P>0,05 versus seus respectivos veículos, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

<sup>\*</sup>P>0,05 versus seus respectivos veículos, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

**Tabela 13.** Valores de média e EPM das potências das bandas de LF e HF, em unidades normalizadas (u.n), do espectro do IP, e da razão LF/HF de animais controle, ECR e ECV.

Grupo	LF (un)	HF (un)	LF/HF
Controle veículo (n=8)	23,13 ± 3,248	76,88 ± 3,248	$0,4250 \pm 0,00953$
Controle fluoxetina crônica (n=11)	17,09 ± 2,447	81,91 ± 2,447	$0,2655 \pm 0,07843$
Controle fluoxetina aguda (n=6)	15,00 ± 2,989	85,00 ± 2,989	0,1967 ± 0,04264
ECR veículo (n=9)	$34,89 \pm 3,519$	65,78 ± 3,616	$0,6222 \pm 0,09417$
ECR fluoxetina crônica (n=11)	20,55 ± 4,152#	72,55 ± 6,156	0,3327 ± 0,1047#
ECR fluoxetina aguda (n=8)	14,75 ± 3,104#	85,25 ± 3,104#	0,2113 ± 0,0448#
ECV veículo (n=11)	25,91 ± 4,532	80,10 ± 4,252	$0,4550 \pm 0,09896$
ECV fluoxetina crônica (n=10)	19,90 ± 4,252	84,10 ± 3,160	$0,2590 \pm 0,07932$
ECV fluoxetina aguda (n=6)	$20,00 \pm 4,640$	$80,00 \pm 4,640$	$0,3000 \pm 0,08027$

<sup>\*</sup>P>0,05 versus seus respectivos veículos, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

**Tabela 14.** Valores de média e EPM do ganho das sequências barorreflexas totais, ganho das sequências barorreflexas UP e ganho das sequências barorreflexas DOWN de ratos em condições controle e que foram submetidos ao ECR e ECV.

Grupo	Sequências totais Sequências UP (ms/mmHg) (ms/mmHg)		Sequências DOWN (ms/mmHg)	
Controle veículo (n=8)	0,8618 ± 0,1104	0,8964 ± 0,1155	0,8193 ± 0,1385	
Controle fluoxetina crônica (n=11)	0,8882 ± 0,1138	1,030 ± 0,1466	0,7452 ± 0,0915	
Controle fluoxetina aguda (n=6)	1,117 ± 0,1162	$1,049 \pm 0,09972$	1,174 ± 0,1146#	
ECR veículo (n=9)	$0,8720 \pm 0,0866$	$0,746 \pm 0,1199$	1,003 ± 0,1105	
ECR fluoxetina crônica (n=11)	1,140 ± 0,08213	$1,038 \pm 0,09696$	1,209 ± 0,1209	
ECR fluoxetina aguda (n=8)	1,111 ± 0,1522	0,9216 ± 0,1311	1,490 ± 0,2445	
ECV veículo (n=11)	0,9364 ± 0,1566	1,053 ± 0,2171	$0,733 \pm 0,1167$	
ECV fluoxetina crônica (n=10)	$0,6086 \pm 0,0783$	0,6311 ± 0,0983	$0,608 \pm 0,0783$	
ECV fluoxetina aguda (n=6)	$0,7327 \pm 0,2329$	1,301 ± 0,5700	1,316 ± 0,2441#	

<sup>\*</sup> P>0,05 versus o tratamento agudo, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's \* P>0,05 versus seus respectivos veículos, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

<sup>\*</sup>P>0,05 versus seus respectivos veículos, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

**Tabela 15.** Valores de média e EPM da variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ Fc) em resposta a infusão de KCN obtidos do grupo controle, ECR e ECV.

Grupo	ΔΡΑΜ (mmHg)	ΔFC (mmHg)
CONTROLE (n=11)	$74,49 \pm 3,789$	-318,1 ± 7,423
ECR (n=10)	58,91 ± 2,106 *	-310,2 ± 9,968
ECV (n=10)	58,82 ± 2,030*	-296,5 ± 5,647

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA one way, seguido por post hoc Newman-Keuls

**Tabela 16.** Valores de média e EPM da variação da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) e frequência cardíaca ( $\Delta$ Fc) em resposta a infusão de KCN após o estresse crônico e tratamento crônico e agudo com fluoxetina (10mg/kg) entre os diferentes grupos.

Grupo	ΔPAM ΔFC (mmHg)	
Controle veículo (n=8)	76,75 ± 2,250	$-326,4 \pm 7,353$
Controle fluoxetina crônica (n=11)	63,30 ± 2,872#	-310,5 ± 11,54
Controle fluoxetina aguda (n=6)	88,67 ± 1,647#	-305,7 ± 0,2108
ECR veículo (n=9)	56,78 ± 2,373*	-328,2 ± 16,48
ECR fluoxetina crônica (n=11)	66,18 ± 2,910#	-296,6 ± 8,004
ECR fluoxetina aguda (n=8)	70,78 ± 2,686#	-284,1 ± 7,802#
ECV veículo (n=11)	54,22 ± 1,714*	$-329,0 \pm 6,545$
ECV fluoxetina crônica (n=10)	72,30 ± 1,521#	-309,5 ± 10,86
ECV fluoxetina aguda (n=6)	80,67 ± 2,044#	-281,2 ± 5,907#

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

<sup>\*</sup>P>0,05 versus seus respectivos veículos, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

**Tabela 17.** Valores de média e EPM na variação da pressão arterial média da frequência respiratória ( $\Delta f_R$ ) em resposta a infusão de KCN, frequência respiratória basal ( $f_R$ ), ventilação minuto basal (VE) e minuto corrente basal (VT) entre os diferentes grupos.

f <sub>R</sub> (cpm)	Δf <sub>R</sub> (cpm)	VE (mL,Kg-1,min-1)	VT (mL,Kg-1)
117,3 ± 3,354	182,3 ± 13,80	1086 ± 66,89	8,478 ± 0,5580
$132,0 \pm 5,148$	243,8 ± 16,37*	865,5 ± 36,03*	6,736 ± 0,2111*
$140,6 \pm 8,009$ *	242,1 ± 16,27*	$837.8 \pm 52.83^*$	$6,522 \pm 0,2045^*$
	(cpm) 117,3 ± 3,354 132,0 ± 5,148	(cpm)(cpm) $117.3 \pm 3.354$ $182.3 \pm 13.80$ $132.0 \pm 5.148$ $243.8 \pm 16.37^*$	(cpm)     (cpm)     (mL,Kg-1,min-1)       117,3 ± 3,354     182,3 ± 13,80     1086 ± 66,89       132,0 ± 5,148     243,8 ± 16,37*     865,5 ± 36,03*

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA one way, seguido por post hoc Newman-Keuls

**Tabela 18.** Valores de média e EPM na variação da pressão arterial média da frequência respiratória ( $\Delta f_R$ ) em resposta a infusão de KCN, frequência respiratória basal ( $f_R$ ), ventilação minuto basal ( $V_E$ ) e minuto corrente basal ( $V_T$ ) após o estresse crônico e tratamento crônico e agudo com fluoxetina (10mg/kg) entre os diferentes grupos.

Grupo	f <sub>R</sub> (cpm)	Δf <sub>R</sub> (cpm)	VE (mL,Kg-1,min-1)	VT (mL,Kg-1)
Controle veículo (n=8)	109,9 ± 3,518	149,1 ± 12,56	1070 ± 73,48	8,914 ± 0,6505
Controle fluoxetina crônica (n=11)	126,7 ± 6,007#	202,3 ± 15,73#	857,6 ± 40,51	$7,028 \pm 0,2628$
Controle fluoxetina aguda (n=6)	142,6 ± 6,831#	221,5 ± 17,24#	956,8 ± 6,569#	7,788 ± 0,7896#
ECR veículo (n=9)	124,7 ± 5,036	192,2 ± 15,90*	806,2 ± 44,67*	6,390 ± 0,2111*
ECR fluoxetina crônica (n=11)	111,2 ± 3,027#	270,5 ± 14,05#	802,6 ± 31,19	7,270 ± 0,2284#
ECR fluoxetina aguda (n=8)	118,3 ± 3,685	254,6 ± 17,19#	$855,2 \pm 53,76$	$6,543 \pm 0,2992$
ECV veículo (n=9)	140,5 ± 7,797*	192,2 ± 9,816*	809,5 ± 51,69*	6,709 ± 0,4243*
ECV fluoxetina crônica (n=10)	112,7 ± 4,289#	$205,8 \pm 20,65$	$729,4 \pm 31,62$	$7,609 \pm 0,4916$
ECV fluoxetina aguda (n=6)	132,5 ± 3,677	$192,4 \pm 20,06$	951,5± 59,26	7,307 ± 0,3451

<sup>\*</sup>P>0,05 versus o grupo controle, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's

<sup>\*</sup>P>0,05 versus seus respectivos veículos, ANOVA two-way, seguido por post hoc Bonferroni's