

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Carina Cunha Silva

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOPROTETORES E ANSIOLÍTICOS DO
ACETURATO DE DIMINAZENO EM MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO

Belo Horizonte

2021

Carina Cunha Silva

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOPROTETORES E ANSIOLÍTICOS DO
ACETURATO DE DIMINAZENO EM MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes

Belo Horizonte

2021

043

Silva, Carina Cunha.

Investigação dos efeitos cardioprotetores e ansiolíticos do aceturato de diminazeno em modelo de estresse crônico [manuscrito] / Carina Cunha Silva. - 2021.

57 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Doenças Cardiovasculares. 3. Sistema Renina-Angiotensina. 4. Estresse Psicológico. 5. Diminazena. I. Fontes, Marco Antônio Peliky. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 336 DE CARINA CUNHA SILVA

"Investigação dos Efeitos Cardioprotetores e Ansiolíticos do Aceturato de Diminazeno em Modelo de Estresse Crônico"

CARINA CUNHA SILVA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **12 de maio de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Maria Claudia Costa Irigoyen, InCor/Universidade de São Paulo
Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari, Universidade do Estado de São Paulo
Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais
Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais
Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientador

Belo Horizonte, 12 de maio de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Fabrício de Araujo Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 18/05/2021, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Debora Simoes de Almeida Colombari, Usuário Externo**, em 19/05/2021, às 12:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Marco Antonio Peliky Fontes, Membro de comissão**, em 20/05/2021, às 11:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robson Augusto Souza dos Santos, Professor do Magistério Superior**, em 20/05/2021, às 17:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Claudia Costa Irigoyen, Usuário Externo**, em 09/06/2021, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0696328** e o código CRC **43045FAC**.

Agradecimentos

Ao meu orientador Marco Antônio Peliky Fontes pela oportunidade de continuar o trabalho iniciado durante o mestrado, pelos conhecimentos e suporte sempre que necessário.

Aos amigos do Laboratório de Hipertensão pela convivência e aprendizado. Em especial ao Erick Bryan, Liliane Ramos, Ana Flávia, Ana Clara e Adelson Heric, por trazer mais alegria para nossos dias e serem empáticos com as dificuldades uns dos outros.

Aos demais professores do Laboratório de Hipertensão por terem ao longo do tempo, construído e trabalhado para manter este ambiente dedicado a pesquisa e por me receberem.

À professora Silvia Guatimosim, ao Itamar, aos professores Lucas Kangussu e Anderson Ferreira pela colaboração.

Aos meus pais e minha irmã por todo o apoio, amor e compreensão.

Ao meu companheiro de vida, Leandro por partilhar comigo as coisas boas e ruins, por me apoiar e sempre me incentivar a buscar a minha melhor versão.

Aos meus queridos amigos Silvia Zebal, Luana Carvalho, Jônathas Almeida e Luiz Filipe por todos os momentos que passamos e que ainda iremos passar juntos.

À minha terapeuta Ionice por todo o auxílio.

Ao programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas com área de concentração em Fisiologia e Farmacologia da UFMG.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Resumo

Dentre os diversos fatores que predisõem às doenças cardiovasculares, destaca-se o estresse emocional. O aceturato de diminazeno (DIZE) é um antiprotozoário utilizado na medicina veterinária que por agir secundariamente como um ativador da ECA2 aumentando os níveis de Ang-(1-7) circulante, tem despertado o interesse de pesquisadores por seus efeitos benéficos em modelos de ansiedade, infarto do miocárdio, estresse emocional e hipertensão. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos cardioprotetores e ansiolíticos do tratamento por via oral com o DIZE em ratos Wistar, submetidos ao estresse crônico. Os 5 protocolos experimentais, objetivaram avaliar os efeitos cardiovasculares do estresse crônico e avaliar os efeitos do tratamento com o DIZE associado ao estresse crônico nos níveis de ansiedade, glicemia e integridade do músculo cardíaco, reatividade ao estresse, função cardíaca, aspectos morfológicos do coração, das adrenais e do peso corporal, expressão das proteínas SERCA2 e fosfolambam no ventrículo esquerdo. Além de investigar os mecanismos de ação do DIZE através da avaliação da atividade da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e expressão do receptor Mas. O grupo tratado com veículo e submetido ao estresse crônico apresentou menor ganho de peso corporal, maiores níveis de ansiedade, menor pressão de perfusão coronariana e maior frequência cardíaca no modelo de coração isolado, maior peso do coração e diâmetro de cardiomiócitos. O grupo tratado com o DIZE e submetido ao estresse crônico apresentou menores níveis de ansiedade, atenuação da reatividade cardíaca ao estresse, aumento da eficiência cardíaca e maior atividade da ECA2. Em conjunto nossos dados evidenciam os efeitos deletérios causados pelo estresse crônico no sistema cardiovascular e sugerem que o DIZE pode contribuir de forma significativa para prevenir essas alterações. Palavras-chave: estresse, doença cardiovascular, aceturato de diminazeno, sistema renina angiotensina.

Abstract

Among the several factors that predispose to cardiovascular diseases, emotional stress stands out. Diminazene aceturate (DIZE) is an antiprotozoan used in veterinary medicine that by acting secondarily as an ECA2 activator increasing the levels of circulating Ang- (1-7), has aroused the interest of researchers for its beneficial effects on anxiety models, myocardial infarction, emotional stress and hypertension. The aim of this study was to investigate the cardioprotective and anxiolytic effects of oral treatment with DIZE in Wistar rats, subjected to chronic stress. The 5 experimental protocols aimed to evaluate the cardiovascular effects of the chronic stress and to evaluate the effects of treatment with DIZE associated with chronic stress on the levels of anxiety, glycemia and integrity of the cardiac muscle, reactivity to stress, cardiac function, morphology of the heart, adrenals and body weight, expression of SERCA2 and phospholamban proteins in the left ventricle and mechanisms of action of DIZE through the evaluation of the activity of the angiotensin-converting enzyme 2 (ECA2) and expression of the Mas receptor. The vehicle-treated group subjected to chronic stress showed lower body weight gain, higher levels of anxiety, lower coronary perfusion pressure and higher heart rate in the isolated heart model, greater heart weight and cardiomyocyte diameter. The group treated with DIZE and subjected to chronic stress showed lower levels of anxiety, attenuation of cardiac reactivity to stress, increased cardiac efficiency and greater activity of ACE2. Together, our data show the deleterious effects caused by chronic stress on the cardiovascular system and suggest that DIZE can contribute significantly to prevent these changes.

Keywords: stress, cardiovascular diseases, diminazene aceturate, renin angiotensin system.

Lista de abreviaturas

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

Ang- angiotensina

DIZE- aceturato de diminazeno

dp/dt- derivada de pressão por tempo

ECA2- enzima conversora de angiotensina 2

FC- frequência cardíaca

GSK3 β - Glicogênio sintase quinase

NFAT – Fator nuclear de ativação das células T

PDVE- pressão diastólica final ventricular esquerda

PDVE- pressão sistólica ventricular esquerda

PAM- pressão arterial média

PLN – fosfolambam

pPLN – fosfolambam fosforilado

SERCA2 - sarco/retículo endoplasmático Ca²⁺ ATPase

SNC- sistema nervoso central

SRA- sistema renina angiotensina

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama representando as interações entre diferentes estruturas do sistema nervoso central durante condições de estresse emocional.	3
Figura 2. Diagrama representando as principais alterações decorrentes do excesso de catecolaminas em condições de estresse.	5
Figura 3. Representação dos componentes do sistema renina angiotensina.	9
Figura 4. Foto representativa do teste de marble burying.	16
Figura 5. Representação adaptada do modelo experimental de coração isolado no sistema de Langendorff.	19
Figura 6. Esquema representativo do protocolo experimental 1	23
Figura 7. Esquema representativo do protocolo experimental 2.	24
Figura 8. Esquema representativo do protocolo para avaliar os mecanismos de ação do DIZE.	25
Figura 9. Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento nos níveis de ansiedade, ganho de peso corporal e glicemia	31
Figura 10. Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento na PAM e FC antes do estresse e reatividade cardiovascular ao estresse	33
Figura 11. Efeitos do estresse agudo, crônico e tratamento na função cardíaca.	35
Figura 12. Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento no peso do coração e adrenais e diâmetro de cardiomiócitos	37
Figura 13. Análise densitométrica do Western Blot para a expressão proteica de SERCA2, PLN, relação pPLN (Thr17)/PLN e relação SERCA2/PLN	39
Figura 14. Atividade da ECA2 e expressão do receptor Mas	40
Figura 15. Esquema representativo dos efeitos provocados pela administração periférica do DIZE e possíveis alvos de ação (cérebro e coração).	38

Lista de tabela

Tabela 1. Protocolo de estresse crônico imprevisível de intensidade moderada..... 47

Sumário

1. Introdução	1
1.1 - Resposta fisiológica ao estresse emocional	1
1.2 - Alterações cardíacas e sistêmicas resultantes do estresse crônico.....	3
1.3 – Sistema renina angiotensina	5
1.4 - Participação do sistema renina angiotensina na resposta ao estresse emocional	7
1.4 - Aceturato de diminazeno: propriedades gerais e efeitos atribuídos a ativação de ECA2	9
2. Justificativa	11
3. Objetivo Geral	12
3.1- Objetivos específicos	12
4. Materiais e métodos	12
4.1 - Animais	12
4.2 – Grupos experimentais	13
4.3 - Drogas	14
4.4 – Anestesia e analgesia	14
4.5 – Modelo de estresse crônico imprevisível.....	14
4.6 – Modelo de estresse agudo	15
4.7 - <i>Marble burying</i>	15
4.8 - Análise do ganho de peso corporal, glicemia e troponina cardíaca	17
4.9 - Canulação da artéria femoral	17
4.10 - Registro da reatividade cardiovascular ao estresse	18

4.11 - Modelo de coração isolado no sistema de Langendorff	18
4.12 - Análise do coração e glândulas adrenais	20
4.13 - <i>Western Blot</i>	20
4.14 – Ensaio da ECA2.....	21
4.15 - Protocolos experimentais	22
4.15.1 - Protocolo 1	22
4.15.2 - Protocolo 2	23
4.15.3 - Protocolo 3	24
4.15.4 - Protocolo 4	25
4.16 - Análise estatística	26
5. Resultados.....	26
5.1 – Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico sobre o comportamento, ganho de peso corporal e outros marcadores metabólicos da resposta ao estresse.....	26
5.2 – Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico na reatividade cardiovascular.....	32
5.3 - Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico nos parâmetros hemodinâmicos relacionados a função cardíaca	34
5.4 - Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico na morfologia do coração e adrenais.....	36
5.5 – Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico na expressão das proteínas SERCA2 e PLN no ventrículo esquerdo.....	38
5.5 – Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico na atividade da ECA2 e expressão proteica do receptor Mas no ventrículo esquerdo	40

6. Discussão.....	41
7. Conclusões.....	47
8. Referências.....	38
9. Anexos.....	47

1. Introdução

1.1 - Resposta fisiológica ao estresse emocional

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, representando 31% de todas as mortes (KISHORE *et al.*, 2018; WANG, H. *et al.*, 2016). Dentre os diversos fatores que predisõem a doenças cardiovasculares, destacam-se o estresse emocional, hipertensão, obesidade, sedentarismo, uso de tabaco e álcool, dietas inadequadas e fatores hereditários (BASTOS, 2016).

O estresse emocional é uma resposta adaptativa específica já que de acordo com o agente estressor, vias e circuitos neurais distintos podem ser ativados (PACAK; PALKOVITS, 2001). Essa resposta resulta da percepção subjetiva de alterações potencialmente adversas do ambiente (JOËLS; BARAM, 2009), causando mudanças nas respostas autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais, a fim de ajustar a homeostase corporal em situações de emergência, aumentando as chances de sobrevivência (FONTES *et al.*, 2014).

A resposta de estresse emocional é mediada pela percepção de estímulos sensoriais (auditivos, olfatórios, visuais e ameaçadores) que resultam na ativação de estruturas do sistema nervoso central como córtex frontal, amígdala e hipotálamo dorsomedial (FONTES *et al.*, 2014).

A amígdala é uma estrutura situada no lobo temporal que possui núcleos distintos (DI MARINO; ETIENNE; NIDDAM, 2016; LEDOUX, 2007; RESSLER, 2010), sendo ativada em condições de estresse, medo e ansiedade. Essa estrutura é controlada pelo córtex frontal do cérebro, porém esse controle pode não ser realizado em condições de emergência (DI MARINO; ETIENNE; NIDDAM, 2016). Essa estrutura envia projeções para o hipotálamo, modulando a atividade autonômica a curto e longo prazo (DI MARINO; ETIENNE; NIDDAM, 2016; MYERS

et al., 2014) (figura 1). O hipotálamo dorsomedial é um importante núcleo envolvido no controle central das respostas cardiovasculares decorrentes de condições de estresse. Esse núcleo controla a via simpatoexcitatória para o coração e vasos (DIMICCO *et al.*, 2002; FONTES *et al.*, 2011). Além de controlar as respostas cardiovasculares ao estresse agudo, recentemente um estudo demonstrou que o hipotálamo dorsomedial também está envolvido no controle da resposta cardiovascular ao estresse crônico (FILHO; FONTES, 2016).

Em condições de estresse, a ativação do hipotálamo a curto prazo, resulta em aumento da atividade simpática com concomitante redução da atividade parassimpática e elevação dos níveis de cortisol (MCEWEN, 2008). As catecolaminas produzidas pela medula da adrenal agindo em receptores α adrenérgicos causam vasoconstrição, aumentando a pressão arterial (HILTON, 1975) e agindo em receptores β adrenérgicos presentes no miocárdio resultam em efeitos inotrópico e cronotrópico positivos (LYON *et al.*, 2008). A longo prazo, a homeostase cardiovascular depende da interação entre os hormônios e sistema nervoso simpático, podendo resultar em aumento sustentado da atividade simpática vasomotora e cardíaca (DAMPNEY *et al.*, 2002).

Embora estas alterações diante do estímulo estressor, sejam essenciais em curto prazo, diversos estudos têm relacionado os estímulos estressantes frequentes ou de longa duração com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como arritmias, hipertensão arterial, infarto do miocárdio e em alguns casos, morte súbita (ESLER *et al.*, 2008; LAGRAAUW; KUIPER; BOT, 2015; MATTA; LAWLER; LOWN, 1976; ROZANSKI; BLUMENTHAL; KAPLAN, 1999; STEPTOE; KIVIMÄKI, 2012; TAGGART; CRITCHLEY; LAMBIASE, 2011).

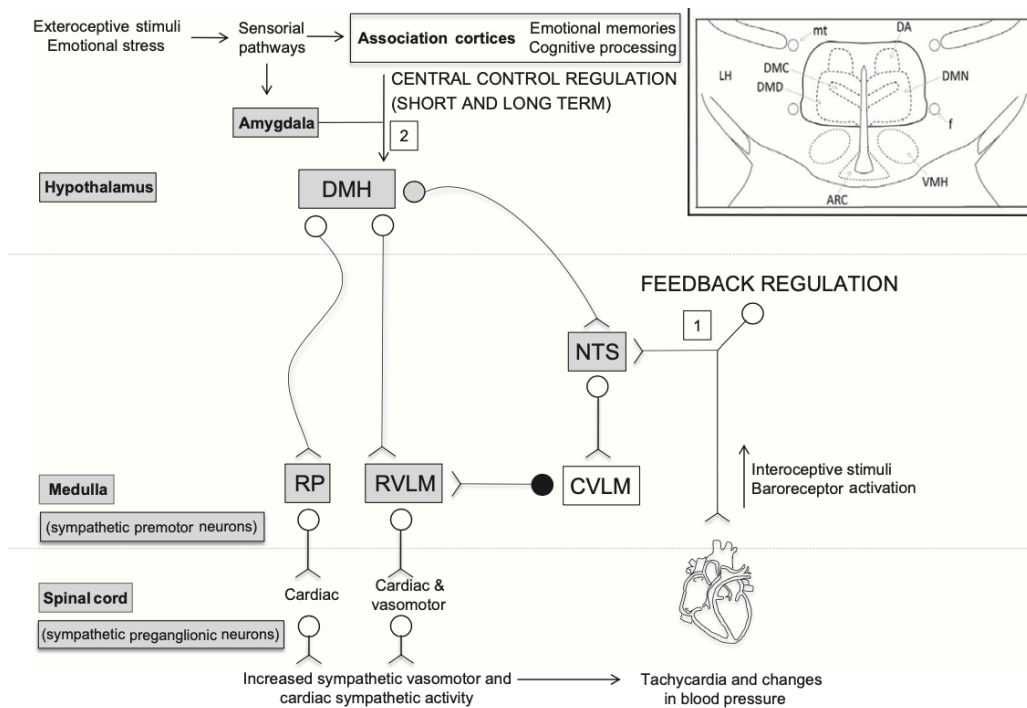


Figura 1. Diagrama representando as interações entre diferentes estruturas do sistema nervoso central durante condições de estresse emocional (Fontes, 2014).

1.2 - Alterações cardíacas e sistêmicas resultantes do estresse crônico

Estudos têm associado a elevação excessiva dos níveis de catecolaminas durante o estresse (MLINAREVIC *et al.*, 2017; NEF *et al.*, 2007) à cardiotoxicidade caracterizada por alterações histológicas e funcionais do miocárdio (RANDHAWA *et al.*, 2014). Essas mudanças do tecido podem resultar em disfunção transitória ventricular esquerda com alterações na região apical (região mais sensível a ação das catecolaminas por ter grande densidade de receptores β adrenérgicos) (MORI *et al.*, 1993). A alteração morfológica do ventrículo está associada a distúrbios de microcirculação decorrentes de altos níveis de endotelina e aumento matriz extracelular, que contribuem para a disfunção do cardiomiócito (AKASHI; NEF; LYON, 2015).

O aumento de matriz extracelular está associado a maior deposição de colágeno tipo I e III (NEF *et al.*, 2007; SZARDIEN *et al.*, 2013), que gera o aumento de fibrose. Esse processo é decorrente do aumento dos níveis de norepinefrina e epinefrina e mediadores pró-fibróticos como a Ang II e espécies reativas de oxigênio (MLINAREVIC *et al.*, 2017; SZARDIEN *et al.*, 2013). O excesso de catecolaminas também causa mudanças no citoesqueleto, aumento do diâmetro e alterações dos núcleos de cardiomiócitos, alterações de proteínas contráteis do miocárdio e concentrações de proteínas reguladoras de cálcio como a sarco/retículo endoplasmático Ca^{2+} ATPase (SERCA2) (figura 2) e injúria isquêmica do miocárdio, evidenciada por desnivelamento do segmento ST no eletrocardiograma (KANG *et al.*, 2017; NEF *et al.*, 2007).

Em condições isquêmicas, em decorrência da perda da glicólise aeróbica, a energia para a manutenção da atividade metabólica normal das células é perdida. Isso resulta em perda da integridade da membrana celular e necrose celular, resultando em liberação na corrente sanguínea de macromoléculas como a troponina cardíaca I e T. Portanto, os níveis de troponinas cardíacas (I e T) podem ser utilizado como biomarcador da integridade cardíaca (NUNES; FIGUEIREDO, 2018).

Além de alterações cardiovasculares, Ulrich-Lai e cols. demonstraram que o estresse crônico também induz hiperplasia e hipertrofia da adrenal (ULRICH-LAI *et al.*, 2006) e aumento de imunorreatividade da proteína c-Fos ou aumento da expressão de mRNA desta proteína na glândula adrenal, coração e regiões do SNC envolvidas no estresse como hipotálamo dorsomedial, amígdala e núcleo paraventricular do hipotálamo (UEYAMA *et al.*, 2006).

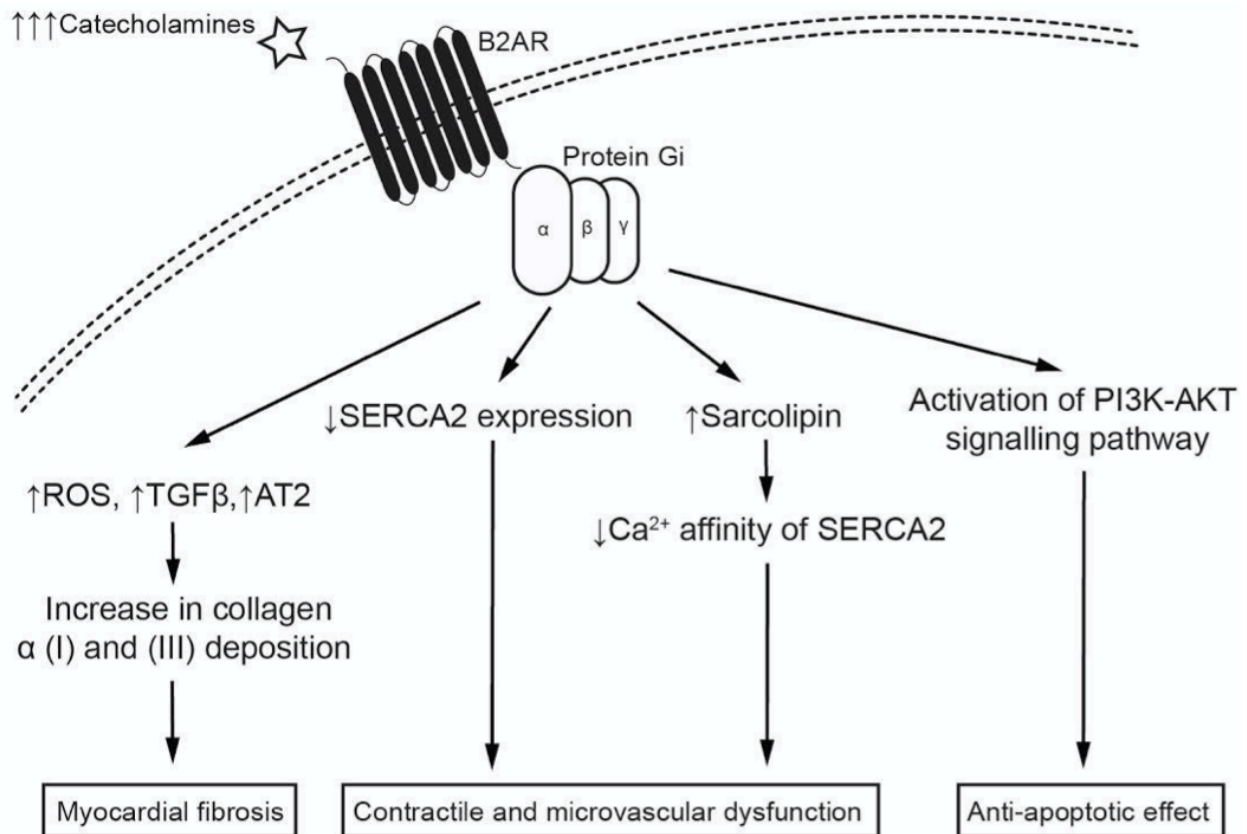


Figura 2. Diagrama representando as principais alterações decorrentes do excesso de catecolaminas em condições de estresse (MLINAREVIC, 2017).

1.3 – Sistema renina angiotensina

O sistema renina angiotensina (SRA) é extremamente importante no equilíbrio cardiovascular e hidroeletrolítico (OCARANZA *et al.*, 2020; PASSOS-SILVA; BRANDAN; SANTOS, 2015; SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2019). Esse complexo sistema é subdividido em dois eixos contra regulatórios, sendo o clássico representado pela ECA/Angiotensina II/ Receptor AT₁

e o não clássico representado pela ECA2/ Angiotensina (1-7)/Receptor Mas (FONTES; LIMA; SANTOS, 2015; PASSOS-SILVA; BRAGA; SANTOS, 2013; SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2019).

O SRA é composto pela glicoproteína angiotensinogênio produzida pelo fígado e outros órgãos (SILVA; BRAGA; SANTOS, 2013), que é clivada pela protease renina dando origem a Angiotensina I (Ang I). Esse peptídeo é clivado ou convertido pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em Angiotensina II (Ang II) (SARAIVA; BARBOSA; GUIMARÃES, 2008; SILVA; BRAGA; SANTOS, 2013). A Ang I pode ser clivada por peptidases, dando origem a Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] (RICE *et al.*, 2004), ou pode ser convertida pela ECA2 em Ang-(1-9), que por sua vez, pode ser clivada pela ECA, dando origem a Ang-(1-7) (OCARANZA *et al.*, 2020; PASSOS-SILVA; BRAGA; SANTOS, 2013; SARAIVA; BARBOSA; GUIMARÃES, 2008).

A Ang II é extremamente importante para a manutenção da homeostase e age principalmente em receptores AT₁ presentes no coração, vasos e rins, promovendo assim a vasoconstrição e aumento da resistência vascular, reabsorção de sódio e água para controle da pressão arterial e inflamatório (SARAIVA; BARBOSA; GUIMARÃES, 2008). Esse peptídeo também pode agir em receptor AT₂, promovendo efeitos contrários aqueles mediados pelo receptor AT₁. Dentre esses efeitos destaca-se a vasodilatação, inibição da hipertrofia celular, efeito cardioprotetor e anti-inflamatório (OCARANZA *et al.*, 2020; UNGER; PAULIS; SICA, 2011). A Ang II via receptor AT₁ atua como hormônio pró-estresse aumentando a atividade simpática periférica e central (PAVEL *et al.*, 2008) e reduzindo a sensibilidade barorreflexa (AVERILL; DIZ, 2000). São atribuídos a este peptídeo efeitos inotrópico, cronotrópico, trófico, fibrótico e pró-arritmogênico no coração. A Ang II pode ser convertida pela ECA2 em Ang-(1-7) (OCARANZA *et al.*, 2020; SANTOS, R. A. S. *et al.*, 2017; VERANO-BRAGA *et al.*, 2020; VICKERS, 2002).

A Ang-(1-7) age preferencialmente em receptor Mas e possui o efeito vasodilatador mediado pela liberação de óxido nítrico e prostaglandinas (OCARANZA *et al.*, 2020; SANTOS, R. A. S., 2014; SARAIVA; BARBOSA; GUIMARÃES, 2008), anti-fibrótico, anti-hipertrofico (KANGUSSU *et al.*, 2015; OCARANZA *et al.*, 2020; PASSOS-SILVA; BRAGA; SANTOS, 2013), anti-inflamatório e cardioprotetor (OCARANZA *et al.*, 2020; PASSOS-SILVA; BRAGA; SANTOS, 2013; PASSOS-SILVA; BRANDAN; SANTOS, 2015). A Ang-(1-7) também atua melhorando a modulação autonômica cardiovascular, aumentando o tônus parassimpático (DARTORA *et al.*, 2017) e reduzindo o tônus simpático (LIMA *et al.*, 2013; SANTOS, R. A. S., 2014), além de aumentar a sensibilidade barorreflexa (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1992).

Em condições fisiológicas os efeitos da Ang II em receptor AT₁ são contrabalanceados pelos efeitos da Ang-(1-7) em receptor Mas (SARAIVA; BARBOSA; GUIMARÃES, 2008). O desequilíbrio entre esses dois eixos favorece o aparecimento de doenças cardiovasculares (SARAIVA; BARBOSA; GUIMARÃES, 2008).

Outros peptídeos pertencentes a esses sistema são a Ang A, Alamandina, Ang III e Ang IV (PASSOS-SILVA; BRANDAN; SANTOS, 2015) (figura 3).

1.4 - Participação do sistema renina angiotensina na resposta ao estresse emocional

Além de suas amplas ações periféricas, estudos tem demonstrado o envolvimento do SRA nas respostas fisiológicas ao estresse emocional, ansiedade e depressão (FONTES; LIMA; SANTOS, 2015; GARD, 2004; OSCAR *et al.*, 2015). Componentes desse sistema já foram identificados em regiões SNC envolvidas na resposta ao estresse, como núcleo paraventricular do

hipotálamo, hipotálamo dorsomedial, amígdala, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal (BECKER *et al.*, 2007; CASTREN; SAAVEDRA, 1988; SHEKHAR, 2006).

Estudos demonstram alguns efeitos benéficos relacionados ao tratamento com antagonista de receptor AT₁, como a redução da ansiedade, depressão e declínio cognitivo em pacientes com doença de Alzheimer (GARD, 2004), aumento da sensibilidade barorreflexa, redução da atividade simpática periférica e central em animais hipertensos e prevenção da fibrose microvascular provocada pelo estresse crônico (FIROOZMAND *et al.*, 2018; GARD *et al.*, 2001; GAUDET; GODWIN; HEAD, 2000; SRINIVASAN; SURESH; RAMANATHAN, 2003; YE *et al.*, 2002).

A Ang-(1-7) atua periféricamente e centralmente modulando o tônus simpático, atenuando a reatividade cardiovascular ao estresse emocional (FONTES; LIMA; SANTOS, 2015; LIMA *et al.*, 2013). Efeitos como a inibição da liberação de norepinefrina em núcleos centrais como o hipotálamo e seu efeito simpatoinibitório já foram descritos, além da redução da reatividade cardiovascular ao estresse agudo (LIMA *et al.*, 2013; OSCAR *et al.*, 2015; SANTOS, D. M. *et al.*, 2017) via redução do tônus simpático para órgãos alvo (LIMA *et al.*, 2013) e redução da ansiedade (KANGUSSU *et al.*, 2017; SANTOS, D. M. *et al.*, 2017).

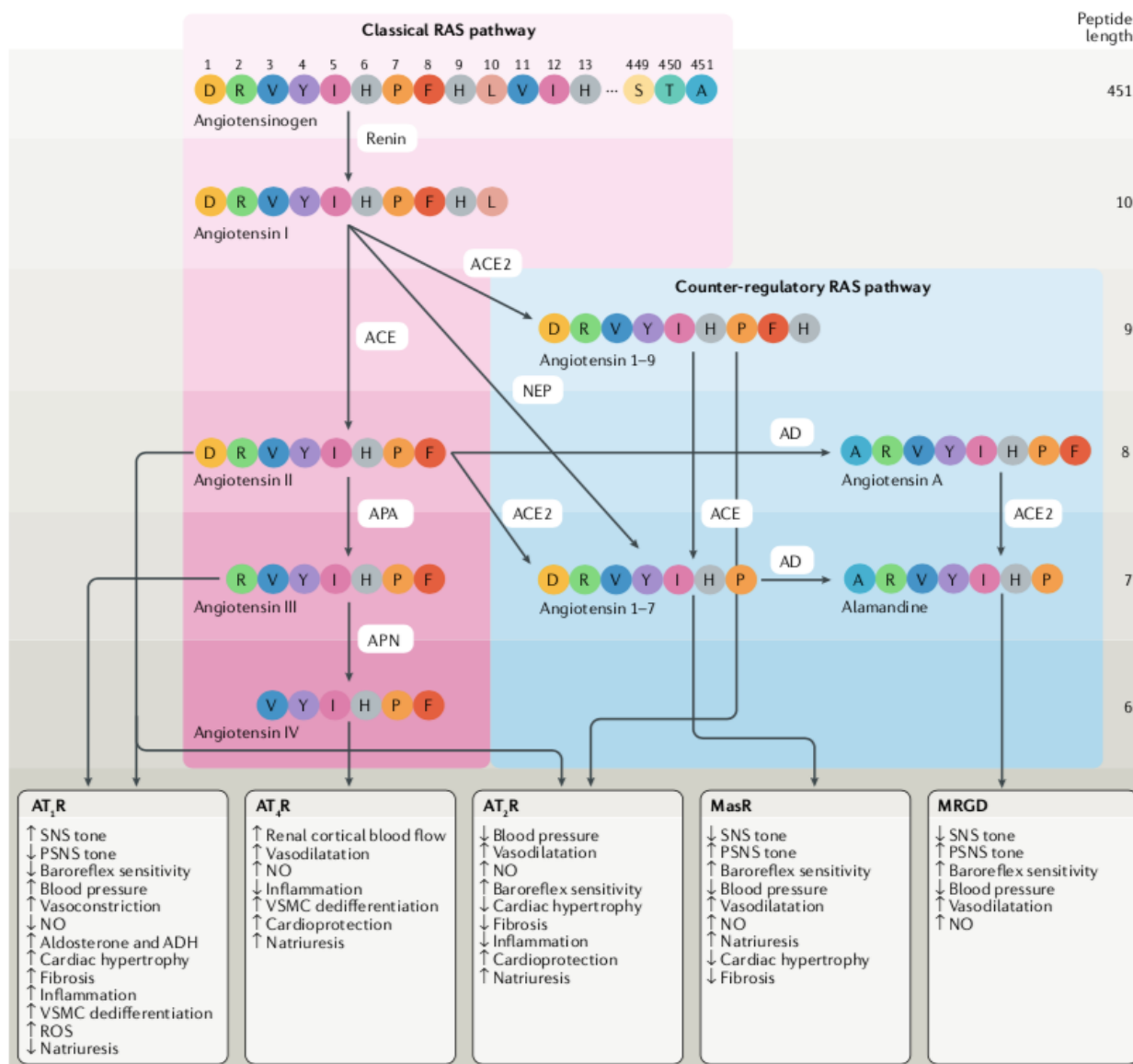


Figura 3. Representação dos componentes do sistema renina angiotensina (OCARANZA, 2019).

1.4 - Aceturato de diminazeno: propriedades gerais e efeitos atribuídos a ativação de ECA2

Estudos de Kulemina e cols. identificaram o efeito benéfico secundário de algumas drogas de baixo peso molecular, que consistia na capacidade de aumentar a ativação da ECA2 *in vitro*.

Dentre os 38 compostos que demonstraram capacidade de modular a atividade de ECA2, o aceturato de diminazeno (DIZE) se destacou no teste de cinética por melhorar a ativação da ECA2 de forma dose-dependente, resultando em aumento da sua eficiência geral, melhorando a clivagem de Ang II em Ang-(1-7) (KULEMINA; OSTROV, 2011).

O DIZE é uma diamina aromática utilizada como antiprotozoário na medicina veterinária (OLIVEIRA; FREITAS, 2015; QI *et al.*, 2013; SILVA, A. S. *et al.*, 2008; VELKOSKA; PATEL; BURRELL, 2016) que por atuar secundariamente como ativador de ECA2, auxilia a ativação do eixo não clássico do SRA (ECA2/Ang-(1-7)/Mas) (OLIVEIRA; FREITAS, 2015; QI *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2016). Embora o mecanismo de ação do DIZE não seja bem conhecido, sabe-se que os seus efeitos benéficos estão relacionados a maior ativação da ECA2, que resulta em aumento da formação de Ang-(1-7) e sua interação com o receptor Mas, além da redução de Ang II. Diversos estudos têm comprovado os efeitos cardiovasculares benéficos do DIZE em modelos experimentais distintos, sugerindo que a ativação de ECA2 possa contribuir para o tratamento e prevenção de diversas doenças como hipertensão, estresse emocional, acidente vascular encefálico hipertensão pulmonar, infarto do miocárdio, diabetes, doenças renais, aterosclerose, doenças oftálmicas e doença de Alzheimer (BENNION; HALTIGAN; REGENHARDT; *et al.*, 2015; DUAN *et al.*, 2020; FRAGA-SILVA *et al.*, 2015; QI *et al.*, 2013; SILVA, C. C. *et al.*, 2020; VELKOSKA; PATEL; BURRELL, 2016). Dentre os principais efeitos relacionados ao DIZE, estão a ação ansiolítica (SILVA, C. C.; FONTES, 2016), redução da resposta comportamental e fisiológica ao estresse emocional (WANG, L. *et al.*, 2016), redução da pressão arterial (GJYMISHKA *et al.*, 2010), melhora da contratilidade e do relaxamento do ventrículo esquerdo, redução da deposição de colágeno após a indução do infarto do miocárdio (CASTARDELI *et al.*, 2018), efeito antiarrítmico (JOVIANO-SANTOS *et al.*, 2020) e renoprotetor em modelos de

isquemia e reperfusão renal (MALEK; NEMATBAKHSI, 2014). Bessa e cols. demonstraram que o tratamento com o DIZE em ratas gestantes hipertensas atenuou a hipertensão arterial, remodelamento cardíaco e melhorou a vasodilatação coronariana na prole adulta (BESSA, 2019). Recentemente, demonstramos que a administração central de DIZE reduz a taquicardia ao estresse emocional agudo. Além disso, o DIZE administrado por via periférica alterou a atividade da amígdala, reduzindo a frequência de correntes pós-sinápticas excitatórias via modulação do tônus glutamatérgico (SILVA, *et al.*, 2020).

2. Justificativa

Estudos têm demonstrado a participação de componentes do eixo não clássico (ECA2/Ang-(1-7)/receptor Mas) do SRA na resposta fisiológica ao estresse emocional. Dentre suas principais ações, destaca-se a redução da ansiedade e reatividade cardiovascular ao estresse. O DIZE por atuar ativando a ECA2 tem sido alvo de vários estudos, e embora muitos estudos tenham comprovado os efeitos cardioprotetores, poucos deles avaliaram sua eficácia em modelos de estresse. Recentemente demonstramos que o DIZE reduz a ansiedade e reatividade ao estresse emocional agudo, no entanto, em modelos de estresse crônico seu efeito ainda não foi avaliado. Condições de estresse recorrente e prolongado (crônico) são cada vez mais comuns na sociedade e resultam em diversos efeitos deletérios sobre a função cardiovascular, tanto a nível morfológico quanto funcional. Estudos que explorem o envolvimento de componentes do eixo não clássico em condições de estresse crônico são de grande relevância, pois, a partir deles, novos alvos terapêuticos podem se revelar para o tratamento de doenças cardiovasculares associadas a esta condição.

3. Objetivo Geral

- Investigar os efeitos produzidos pelo DIZE nas alterações cardiovasculares resultantes do estresse crônico.

3.1- Objetivos específicos

Avaliar os efeitos resultantes do tratamento com o DIZE em ratos submetidos ao estresse crônico:

- nos níveis de ansiedade, glicemia e integridade do músculo cardíaco;
- na resposta cardiovascular ao estresse;
- na função cardíaca;
- nos aspectos morfológicos do coração, das adrenais e do peso corporal;
- na expressão das proteínas SERCA2 e fosfolambam no ventrículo esquerdo do coração;
- investigar os mecanismos de ação do DIZE, avaliando se seus efeitos são decorrentes da maior ativação da ECA2 e/ou maior expressão do receptor de Ang-(1-7), o Mas.

4. Materiais e métodos

4.1 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com 11 a 12 semanas de idade, pesando entre 300 e 310 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da

Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). Os animais foram mantidos em ambiente adequado com temperatura e luminosidade controladas, alimentados com ração e água à vontade. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as regras estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA), sob o protocolo aprovado 274/2018 (anexos). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Hipertensão, Laboratório de Sinalização Cardíaca e Laboratório de Biologia Translacional.

4.2 – Grupos experimentais

Inicialmente 4 grupos experimentais foram feitos em 4 grupos, veículo/Intacto [veíc/Int (tratados com água por 15 dias e não submetidos ao estresse)], veíc/estresse agudo [veíc/Est ag, usado como controle adicional (tratados com água por 15 dias e submetidos ao estresse apenas no último dia)], veículo/estresse crônico [veíc/Est cro (tratados com água por 15 dias e submetidos ao estresse por 14 dias)] e DIZE/estresse crônico [DIZE/Est cro (tratados com DIZE por 15 dias e submetidos ao estresse por 14 dias)]. Para avaliar o mecanismo de ação do DIZE, os experimentos foram feitos nos 4 grupos mencionados acima e em um quinto grupo denominado DIZE/Intacto [DIZE/Int, usado como controle adicional (tratados com DIZE por 15 dias e não submetidos ao estresse)].

4.3 - Drogas

Os tratamentos foram feitos por gavagem, por 15 dias, começando um dia antes do início do protocolo de estresse. O DIZE foi usado na dose de 1mg/kg diluído em água e os grupos controles (veículo) receberam água filtrada (0,1ml/100g). A dose do DIZE e via de administração foram escolhidas baseada em trabalhos publicados (MARIA *et al.*, 2016).

4.4 – Anestesia e analgesia

Para a realização dos experimentos de análise da reatividade cardiovascular ao estresse, os animais foram anestesiados com Quetamina 10% na dose de 90 mg/ kg (Agener União) e Xilazina 2% na dose de 6 mg/kg (Syntec) (2:1; 0,1mL/100g de peso vivo) administrados por via intraperitoneal (IP) e logo após foram submetidos ao procedimento cirúrgico para a implantação da cânula na artéria femoral. Para reduzir a dor e inflamação os animais foram medicados com 0,1mL/100g de Banamine® (50mg/mL MSD) por via subcutânea e para evitar processos infecciosos foram medicados com 0,2 mL de Pentabiótico® veterinário (1:200000 Fort Dodge) por via intramuscular.

4.5 – Modelo de estresse crônico imprevisível

O modelo de estresse crônico imprevisível possui capacidade de induzir o estresse emocional de forma prolongada, depressão, anedonia e ansiedade. Nesse protocolo os animais são expostos a agentes estressores variáveis de forma imprevisível, não ocorrendo, portanto, adaptação

do animal ao agente estressor, garantindo a ativação prolongada e constante do eixo HPA. No nosso trabalho, o protocolo de estresse crônico teve duração de 14 dias, começando no segundo dia de tratamento. A escolha dos agentes estressores e duração do protocolo e modelos experimentais foram definidos de acordo com estudos anteriores (FRISBEE *et al.*, 2015; ULRICH-LAI *et al.*, 2006; ZELDETZ *et al.*, 2018). Os animais foram expostos aos agentes estressores uma a duas vezes por dia e o agente estressor usado em cada dia foi escolhido de forma aleatória como descrito na tabela 1 (anexos). Os agentes estressores usados foram o nado forçado em água a 16-18°C por 5min, shake estresse (100 rpm) por 40 minutos, estresse por contenção por 30 min, isolamento social (24 horas), inclinação da gaiola sem maravalha a 45° por 4 horas, exposição por 3 horas à caixa com 300 ml de água, exposição por 10 minutos à caixa com 300 ml de água e plataforma elevada por 30 minutos.

4.6 – Modelo de estresse agudo

No modelo de estresse agudo foi usado o mesmo agente estressor do último dia de estresse do modelo de estresse crônico. Os animais foram tratados com veículo por 15 dias e apenas no último dia, foram colocados por 10 minutos na caixa com 300 ml de água.

4.7 - *Marble burying*

O teste de *marble burying* foi feito para avaliar os níveis de ansiedade nos animais. O teste foi realizado como descrito por Schneider e col. (SCHNEIDER; POPIK, 2007). Os animais foram colocados individualmente em uma caixa com 47 x 27 x 15 cm contendo maravalha e nove bolas de vidro com 2cm de diâmetro, posicionadas em 3 fileiras (cada uma contendo 3 bolas), por 10

minutos (figura 4). Após esse período, o animal foi removido e o número de bolas enterradas foi contado. Foi considerado como enterrada aquelas que apresentassem pelo menos metade de sua superfície coberta por maravalha. Os animais foram expostos a caixas diferentes e as bolas foram higienizadas com álcool 70% entre um teste e outro, para retirar todo tipo de odor. Neste teste, os roedores ansiosos enterram as bolas por considerá-las nocivas e potencialmente perigosas. O número de bolas enterradas possui uma correlação direta com o nível de ansiedade do animal, quanto maior o número, maior a ansiedade do animal.



Figura 4. Foto representativa do teste de *marble burying*.

4.8 - Análise do ganho de peso corporal, glicemia e troponina cardíaca

Os animais foram pesados diariamente e a porcentagem de ganho de peso corporal foi usado como um indicador do impacto do estresse agudo, estresse crônico e do tratamento associado ao estresse crônico sobre as condições fisiológicas nos grupos. O sangue coletado no momento da decapitação foi usado para a análise quantitativa da glicemia usando tiras medidoras de glicose (Accu Chek Active Roche), e para a detecção qualitativa de troponina cardíaca I (marcador de lesão miocárdica), para constatar a integridade do músculo cardíaco, visto que após uma lesão cardíaca esta proteína é liberada no sangue dentro de 4 a 6 horas. Essa avaliação foi realizada após o término do protocolo de estresse por meio de ensaio imunocromatográfico rápido (ABON) com o nível de detecção mínimo de 0,5ng/ml.

4.9 - Canulação da artéria femoral

A canulação da artéria femoral foi realizada para obter o registro dos parâmetros cardiovasculares. A cânula foi confeccionada a partir do aquecimento e união de tubo de polietileno PE-10 (4 cm) e PE-50 (15cm). Posteriormente, foi preenchida com solução salina (0,9%) e obstruída na extremidade livre do P-50 com alfinetes de metal. O procedimento de canulação teve início com uma incisão na região inguinal unilateral em ratos anestesiados em decúbito dorsal para a dissecação e isolamento da artéria femoral. A cânula de polietileno foi implantada na artéria femoral (chegando até a aorta abdominal) e fixada por amarraduras. A extremidade livre da cânula foi então passada pela região lateral e dorsal do tronco pelo espaço subcutâneo até a região interescapular, por onde foi exteriorizada através de uma pequena incisão

previamente realizada e então fixada externamente por amarrações. Por fim, as incisões foram suturadas.

4.10 - Registro da reatividade cardiovascular ao estresse

A cânula inserida na a artéria foi conectada a um transdutor de pressão ligado a um amplificador e a um sistema de conversão analógico-digital (MP100A-CE) para aferição dos parâmetros cardiovasculares. Através do equipamento e do software Biopac®, Systems, Inc., as oscilações de valores de pressão pulsátil (PAP), a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e frequência cardíaca filtrada (FCF) foram coletados e posteriormente analisados. Os valores de PAM e FC referentes a reatividade ao estresse (Δ) foram obtidos através da diferença da resposta máxima durante o estresse e a média dos 30 segundos antes do estresse.

4.11 - Modelo de coração isolado no sistema de Langendorff

Após o registro dos parâmetros cardiovasculares foi feita a avaliação da função cardíaca no modelo de coração isolado. Os animais foram heparinizados (100 U.I) por via intraperitoneal e após 10 minutos foram eutanasiados por decapitação. Foi feita uma incisão abaixo do processo xifoide seguindo até as margens costais. A parede peitoral anterior foi rebatida e o coração foi retirado através da transecção da aorta descendente, veia cava inferior, aorta ascendente e veia cava superior, sendo transferido para uma placa de petri com solução de Krebs-Ringer (solução nutritora, oxigenada e tamponada) gelada contendo 118.4 mmol/l NaCl, 4.7 mmol/l KCl, 1.2 mmol/l KH₂PO₄, 1.2 mmol/l MgSO₄·7H₂O, 2.0 mmol/l CaCl₂·2H₂O, 11.7 mmol/l glicose e 26.5

mmol/l NaHCO₃. O coração foi transportado para o aparato de Langendorff (ADInstruments, São Paulo, Brasil), onde foi dissecado e canulado pela aorta. O coração foi fixado ao aparelho com fluxo constante (8ml/min) e perfundido de Krebs-Ringer aquecida (37°C). Um balão intraventricular flexível, feito de plástico filme, foi inserido no ventrículo esquerdo através do átrio esquerdo para registrar a pressão sistólica ventricular esquerda (LVSP), pressão diastólica final ventricular esquerda (LVEDP), frequência cardíaca (FC), tempo de arritmias e dP/dt máxima (máx) e mínima (mín). Também foi avaliado a pressão de perfusão. Os dados foram obtidos pelo sistema de aquisição PowerLab, LabChart 7 (ADInstruments, São Paulo, Brasil) (figura 5). O coração permaneceu em estabilização por 30min e após este período, foi realizado o registro da função cardíaca por mais 15 minutos. Os últimos 8 minutos de registro foram usados para a análise.

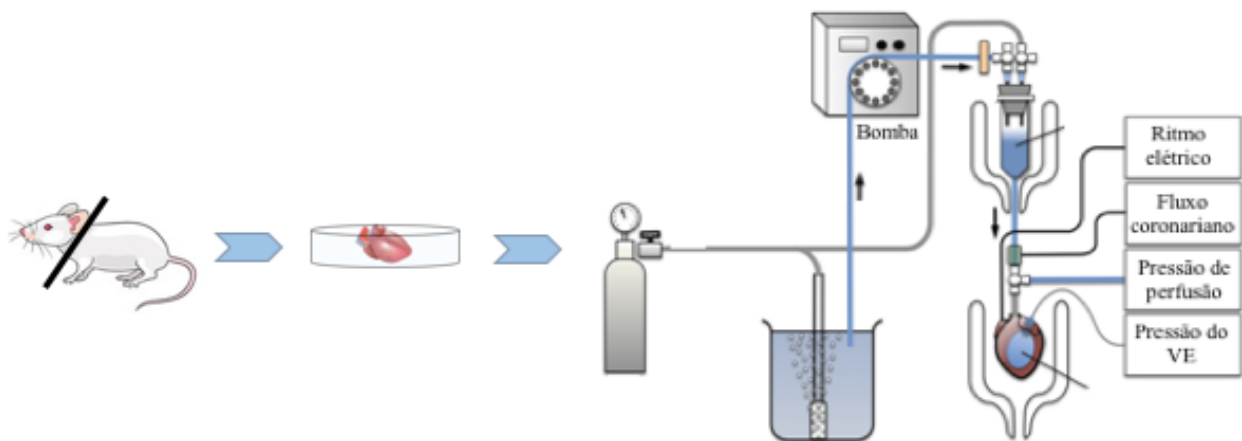


Figura 5. Representação adaptada do modelo experimental de coração isolado no sistema de Langendorff utilizado nos experimentos do presente estudo (LIAO; PODESSER; LIM, 2012).

4.12 - Análise do coração e glândulas adrenais

Após o protocolo de coração isolado, o coração, as adrenais e a tibia esquerda foram coletados. Os pesos do coração e adrenais foram mensurados para estimar a hipertrofia e normalizados pelo tamanho da tibia de cada animal. Cinco corações de cada grupo foram mantidos em solução de formol 10% overnight e álcool 70%, para posterior avaliação morfométrica dos cardiomiócitos através da histologia do coração (ventrículo esquerdo), corado com hematoxilina e eosina. Os cardiomiócitos foram observados na objetiva de 20x, sendo mensurado 100 células por coração. O diâmetro das fibras foi analisado pelo programa Image J.

4.13 - *Western Blot*

Os animais foram eutanasiados por decapitação, os corações foram removidos e foi separado o ventrículo esquerdo o qual foi congelado em nitrogênio líquido. Os ventrículos foram homogeneizados separadamente por 30 minutos em tampão de lise (em mM: NaCl, 100; Tris-base, 50; EDTA-2Na, 5; Na₄P₂O₇·10H₂O, 50; MgCl₂, 1; pH 8,0) com detergentes (Nonidet P40 1%, Triton x-100 0,3% e deoxicolato de sódio 0,5%), contendo inibidores de protease (PMSF 200 mM; benzamidina 15,7 mg/mL; pepstatina 10 mM; aprotinina 10 mg/mL) e inibidores de fosfatase (em mM: NaF, 20; Na₃VO₄, 1). Ao fim do procedimento, foi realizada centrifugação do material (12 minutos, 8000 rpm, 4°C), coleta do sobrenadante e armazenamento em freezer -80°C para posterior uso. As proteínas foram quantificadas de acordo com o método descrito por Bradford (BRADFORD, 1976). O *Western Blot* foi realizado baseado no método descrito por Jesus e cols. (JESUS *et al.*, 2018). 40 µg de proteínas foram separadas num gel de poliacrilamida cuja concentração variou entre 10% (SERCA2) e 12% (PLB) dependendo da massa molecular da

proteína-alvo. As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos. As corridas foram realizadas com voltagem fixa em 120V por 1:30 horas. A transferência foi realizada utilizando-se o aparato de transferência semi-dry (BioRad), com voltagem fixa em 20V e tempo de transferência de 30 minutos. Logo após, as membranas foram lavadas em solução de TBS-T (Tris-Buffered Saline; em mmol/L: NaCl, 150; Tris, 25 e 0,05% de Tween 20, pH 8,0). O bloqueio foi realizado em solução de TBS-T com leite a 5% por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas por 16 a 20 horas, a 4°C, com anticorpo primário diluído em solução de leite 1% em TBS-T. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-SERCA2 (sc - 73022, Santa Cruz), anti-fosfolambano (sc - 393990), anti-fosfolambano fosforilada (Thr17) - R (sc - 17024 - R, Santa Cruz), anti-GAPDH (sc - 32233, Santa Cruz) e anti-Mas (Aar-013, Alomome Labs). Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora. Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: anti-coelho (1:15000, Sigma-Aldrich) e anti-camundongo (1:15000, Sigma-Aldrich). Após este período, as membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos). As bandas foram detectadas por reação de quimioluminescência utilizando o reagente ECL Plus® e analisadas no Image Quant TL®. Foram utilizados o GAPDH e a expressão total da proteína como normalizador da expressão proteica.

4.14 – Ensaio da ECA2

A atividade da ECA2 foi analisada de acordo com o método previamente descrito por (HUANG *et al.*, 2003; HUENTELMAN *et al.*, 2004) e adaptado por (FRAGA-SILVA *et al.*, 2013;

KANGUSSU *et al.*, 2015). O ensaio cinético foi realizado usando substratos fluorogênicos da R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA) (ECA2: ES007). Amostras da região apical do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em tampão composto por Tris-HCl 75 mM, pH 7.5; NaCl 1M e ZnCl₂ 0,5 mM. Todos os ensaios foram realizados em duplicata em pH 7.4 com um volume final de 100 µL. A solução de reação continha: homogenato de ventrículo 140 µg, 50 µM de substrato, NaCl 5 M, Tris-HCl 75 mM, ZnCl₂ 0,5 µM, inibidor específico da ECA2 (DX 600) 10 µM e um inibidor específico da ECA (Captopril) 10 µM. Imediatamente após a adição do substrato fluorogênico, a cinética de atividade da enzima com a leitura de fluorescência a cada minuto foi realizada em um leitor de fluorescência Spectra Max (Molecular Devices, EUA), durante 60 minutos, a 37°C.

O controle de fluorescência foi realizado com reações sem a presença de amostra. O resultado de cada amostra foi expresso em unidades arbitrárias (u.a.) correspondentes a média dos últimos 5 minutos de leitura, onde a reação atingiu o platô. Além disso, a atividade enzimática foi corrigida pela concentração de proteínas presentes nas amostras. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A atividade da ECA2 foi expressa em fluorescência (u.a.)/minuto/ mg de proteína.

4.15 - Protocolos experimentais

4.15.1 - Protocolo 1

Este protocolo teve como objetivo investigar os impactos causados pelo estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico nos níveis de ansiedade [veíc/Int (n=5), veíc/Est ag (n=5),

veíc/Est cro (n=4) e DIZE/Est cro (n=5)], no ganho de peso corporal (%) [veíc/Int (n=15), veíc/Est ag (n=16), veíc/Est cro (n=14) e DIZE/Est cro (n=13)], na glicemia e no nível de troponina cardíaca [veíc/Int (n=5), veíc/Est ag (n=5), veíc/Est cro (n=5) e DIZE/Est cro (n=5)].

O estresse foi iniciado um dia após o início do tratamento e foi feito por 14 dias. No último dia, após o estresse, foi feito o teste de *marble burying*, eutanásia, coleta do sangue e do coração.

Todos os procedimentos experimentais estão demonstrados em ordem cronológica na linha do tempo abaixo (figura 6) e descritos em detalhes nos métodos. Visando utilizar o menor número de animais no nosso projeto, ao final do protocolo, os corações foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a temperatura de -80°C até futura análise molecular.

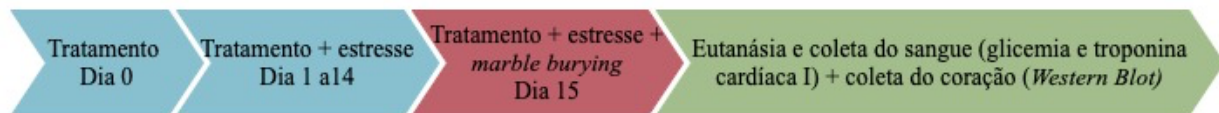


Figura 6. Esquema representativo do protocolo experimental para a avaliação dos níveis de ansiedade, peso corporal, glicemia e integridade do músculo cardíaco em animais submetidos ao estresse crônico tratados ou não com o DIZE.

4.15.2 - Protocolo 2

Este protocolo teve como objetivo avaliar a resposta cardiovascular [veíc/Int (n=8), veíc/Est ag (n=8), veíc/Est cro (n=6) e DIZE/Est cro (n=7)], função cardíaca [veíc/Int (n=6), veíc/Est ag (n=7), veíc/Est cro (n=7) e DIZE/Est cro (n=6)], peso do coração [veíc/Int (n=5), veíc/Est ag (n=8), veíc/Est cro (n=6), DIZE/Est cro (n=7)], peso das adrenais [veíc/Int (n=6), veíc/Est ag (n=9), veíc/Est cro (n=8), DIZE/Est cro (n=7)] e morfometria dos cardiomiócitos [veíc/Int (n=5), veíc/Est ag (n=5), veíc/Est cro (n=5), DIZE/Est cro (n=5)] após o estresse agudo, estresse crônico e tratamento.

O estresse foi iniciado um dia após o início do tratamento e foi feito por 14 dias. No penúltimo dia de estresse, os animais foram canulados e 24 horas após foi realizado o registro dos parâmetros cardiovasculares antes e durante o estresse. Após o registro, os animais foram eutanasiados e a função cardíaca foi avaliada no modelo de coração isolado no aparato de Langendorff. No final do procedimento, o coração e adrenais foram coletados e pesados. O tamanho da tíbia foi usado para normalizar o peso desses órgãos. Cinco corações de cada grupo foram mantidos em formol 10% por 24h e posteriormente em álcool 70% para análise histológica.

Todos os procedimentos experimentais estão demonstrados em ordem cronológica na linha do tempo abaixo e descritos em detalhes nos métodos (figura 7).



Figura 7. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliar a resposta cardiovascular ao estresse e alterações cardiovasculares em animais submetidos ao estresse crônico tratados ou não com o DIZE.

4.15.3 - Protocolo 3

Neste protocolo foram investigados os possíveis mecanismos envolvidos nas alterações da função contrátil observadas no modelo de coração isolado. Considerando que a SERCA2 é uma das principais proteínas envolvidas no transporte de cálcio para o retículo sarcoplasmático, processo essencial para a fase de contração cardíaca, por meio do Western Blot, nós avaliamos a sua expressão no ventrículo esquerdo. Também avaliamos a expressão da proteína fosfolambam (PLN), relação pPLN(Thr17)/PLN e relação SERCA2/PLN, visto que o fosfolambam regula a

atividade da SERCA2. Esse experimento foi feito nos corações coletados durante os experimentos do protocolo 1 que foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a temperatura de -80°C [veíc/Int (n=5), veíc/Est ag (n=5), veíc/Est cro (n=5), DIZE/Est cro (n=5)].

4.15.4 - Protocolo 4

Para avaliar o possível mecanismo de ação do DIZE como ativador da ECA2, foi realizado o ensaio cinético para avaliar a atividade da ECA2 [veíc/Int (n=5), veíc/Est ag (n=5), veíc/Est cro (n=5), DIZE/Est cro (n=5) e DIZE/Int (n=5)]. Além disso, como na literatura já foi demonstrado que o DIZE pode alterar a expressão do receptor de Ang-(1-7), o Mas, em cultura de células (SILVA, C. C. *et al.*, 2020), nós também avaliamos a expressão desse receptor através do *Western Blot* nos grupos veíc/Int (n=5), veíc/Est ag (n=4), veíc/Est cro (n=5), DIZE/Est cro (n=5) e DIZE/Int (n=5). O estresse foi iniciado um dia após o início do tratamento e foi feito por 14 dias. Após o estresse do último dia os animais foram eutanasiados por decapitação e tiveram seus corações removidos, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a 80°C até o processamento das amostras. O ventrículo esquerdo foi usado para os dois ensaios, sendo que a região apical foi usada para o ensaio enzimático da ECA2 e o restante para o *Western Blot*. Todos os procedimentos experimentais estão demonstrados em ordem cronológica na linha do tempo abaixo e descritos em detalhes nos métodos (figura 8).

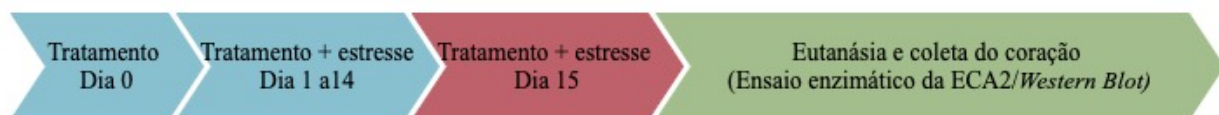


Figura 8. Esquema representativo do protocolo para avaliar os mecanismos de ação do DIZE.

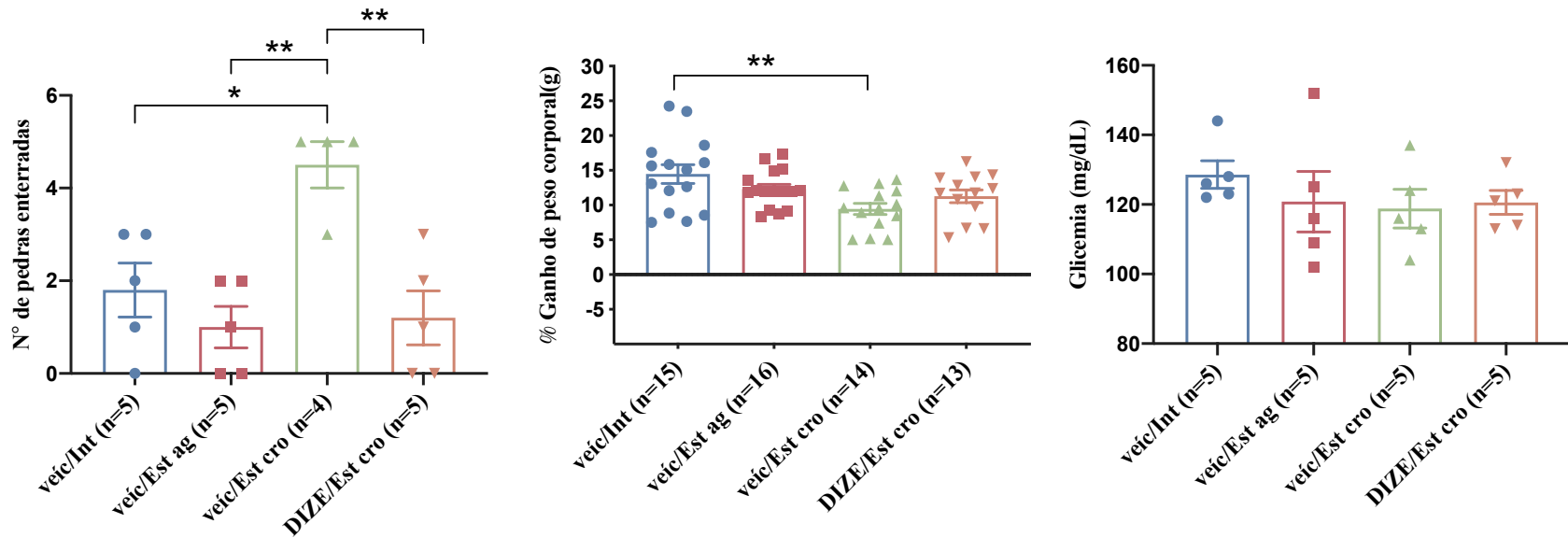
4.16 - Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média. Na análise estatística para comparação entre grupos foi utilizado a análise de variância (ANOVA One Way), seguido pelo pós teste de Bonferroni. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$. Todos os resultados foram analisados pelo software GraphPad Prism® 8.0.

5. Resultados

5.1 – Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico sobre o comportamento, ganho de peso corporal e outros marcadores metabólicos da resposta ao estresse

No teste de *marble burying* o grupo veíc/Est cro enterrou um maior número de pedras comparado aos demais grupos (número de pedras enterradas: veíc/Int = $1,8 \pm 0,6$; veíc/Est ag = $1 \pm 0,5$; veíc/Est cro = $4,5 \pm 0,5$ e DIZE/Est cro = $1,2 \pm 0,6$ $p = 0,0019$). O ganho de peso corporal foi menor no grupo veíc/Est cro comparado ao grupo veíc/Int (ganho de peso, % gramas: veíc/Int = $14,5 \pm 1,4$; veíc/Est ag = $12 \pm 0,7$; veíc/Est cro = $9,5 \pm 0,8$ e DIZE/Est cro = $11 \pm 0,9$ $p < 0,0001$). A glicemia não diferiu entre os grupos (glicemia, mg/dL: veíc/Int = 129 ± 4 ; veíc/Est ag = 121 ± 9 ; veíc/Est cro = 119 ± 6 e DIZE/Est cro = 121 ± 3 $p = 0,64$). Os dados agrupados estão representados na figura 9. No ensaio imunocromatográfico para a detecção qualitativa de troponina cardíaca I, todos os animais de todos os grupos apresentaram resultado negativo.



5.2 – Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico na reatividade cardiovascular

A pressão arterial média basal e FC basal não diferiram entre os grupos (PAM, mmHg: veíc/Int = 113 ± 2 , veíc/Est ag = 118 ± 4 , veíc/Est cro = 119 ± 3 e DIZE/Est cro = 120 ± 3 p = 0,375; FC, bpm: veíc/Int = 349 ± 9 , veíc/Est ag = 357 ± 10 , veíc/Est cro = 374 ± 14 e DIZE/Est cro = 374 ± 9 p = 0,253). A reatividade pressórica ao estresse não foi diferente entre os grupos veíc/Est ag, veíc/Est cro e DIZE/Est cro, no entanto, como esperado, essa reatividade foi maior nesses três grupos comparados ao grupo veíc/Int (Δ PAM, mmHg: veíc/Int = 3 ± 1 , veíc/Est ag = 63 ± 5 , veíc/Est cro = 69 ± 6 , DIZE/Est cro = 51 ± 5 p <0,0001). A reatividade cardíaca foi menor no grupo DIZE/Est cro comparado aos grupos veíc/Est ag e veíc/Est cro e como esperado essa reatividade foi menor no grupo veíc/Int comparado ao demais grupos (Δ FC, bpm: veíc/Int = 7 ± 6 , veíc/Est ag = 149 ± 10 , veíc/Est cro = 153 ± 24 e DIZE/Est cro = 84 ± 13 p <0,0001). Os dados agrupados estão representados na figura 10.

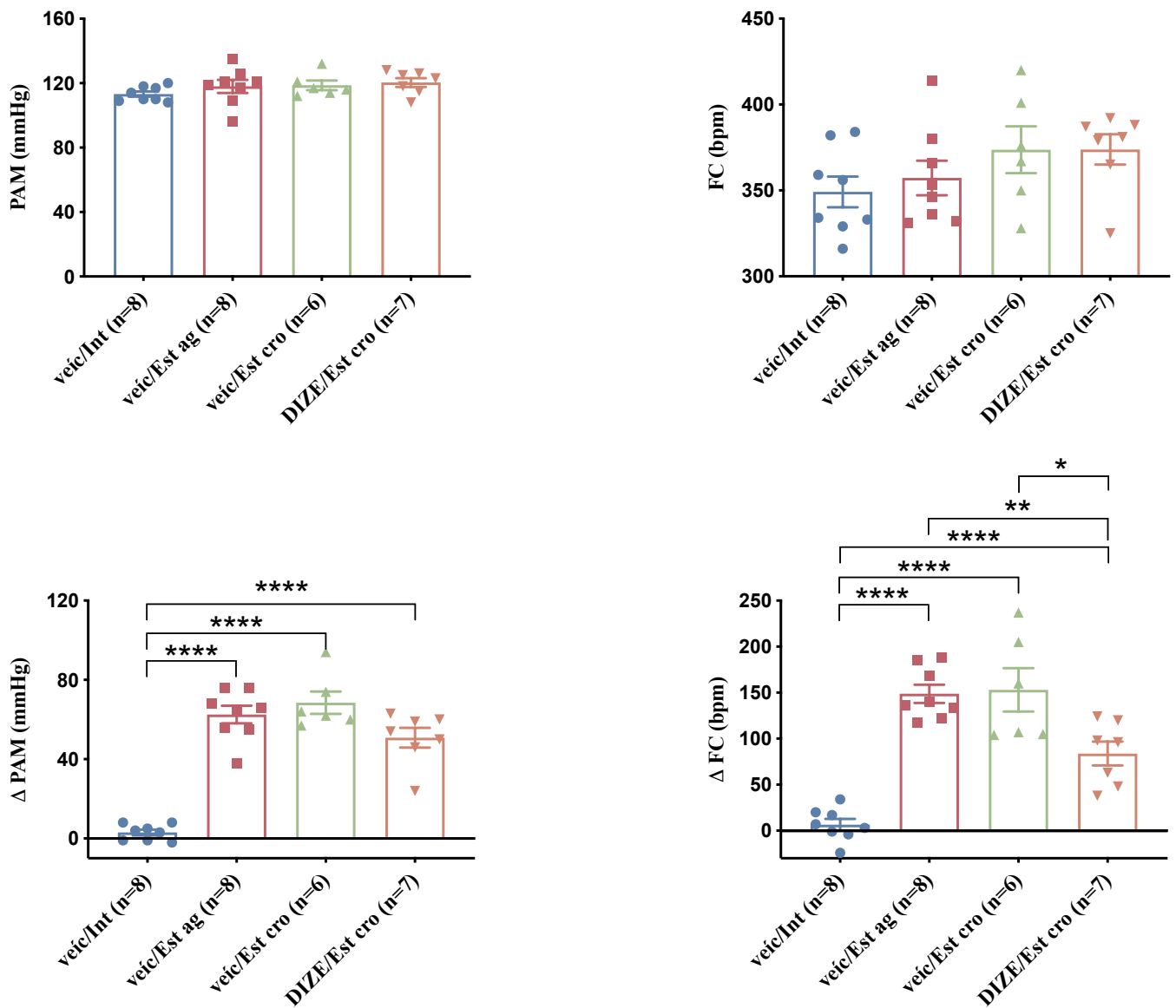


Figura 10. Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento na PAM e FC antes do estresse e reatividade cardiovascular ao estresse. Os valores de Δ PAM (A) foram expressos em mmHg e os de Δ FC (B) em batimento por minuto (bpm). ANOVA One Way com pós teste Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.3 - Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico nos parâmetros hemodinâmicos relacionados a função cardíaca

Na avaliação da função cardíaca no modelo de coração isolado, o grupo veíc/Est cro apresentou menor pressão de perfusão coronariana comparado aos grupos veíc/Int e veíc/Est ag (pressão de perfusão coronariana, mmHg: veíc/Int = 147 ± 11 vs veíc/Est cro = 93 ± 15 $p=0,028$; veíc/Est ag = 148 ± 10 vs veíc/Est cro = 93 ± 15 , $p=0,012$). A pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) foi significativamente maior no grupo DIZE/Est cro comparado aos demais (PSVE, mmHg: veíc/Int = $60 \pm 0,9$, veíc/Est ag = 63 ± 4 , veíc/Est cro = 51 ± 5 , DIZE/Est cro = 91 ± 8 $p<0,0001$). Como esperado, não houve diferença entre a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDVE) entre os grupos (PDVE, mmHg: veíc/Int = $11 \pm 0,3$, veíc/Est ag = $12 \pm 0,4$, veíc/Est cro = $11 \pm 0,7$, DIZE/Est cro = 12 ± 1 $p=0,63$). A FC do grupo veíc/Est cro foi maior comparado ao grupo veíc/Int (FC, bpm: veíc/Int = 184 ± 15 , veíc/Est ag = 198 ± 22 , veíc/Est cro = 266 ± 10 , DIZE/Est cro = 190 ± 27 $p=0,019$).

Não houve diferença entre a dP/dt max e min entre os veíc/Int, veíc/Est ag e veíc/Est cro, no entanto, o grupo DIZE/Est cro apresentou maior dP/dt max comparado veíc/Int e veíc/Est cro e maior dP/dt min comparado aos grupos veíc/Int, veíc/Est ag e veíc/Est cro (dP/dt máxima, mmHg/s: veíc/Int = 1451 ± 151 , veíc/Est ag = 1646 ± 174 , veíc/Est cro = 1332 ± 176 e DIZE/Est cro = 2437 ± 303 $p=0,005$; dP/dt mínima, mmHg/s: veíc/Int = -845 ± 76 , veíc/Est ag = -865 ± 68 , veíc/Est cro = -739 ± 121 e DIZE/Est cro = -1310 ± 159 $p=0,004$). Não houve diferença entre o tempo de arritmia entre os grupos (Arritmia, % s: veíc/Int = $0,5686 \pm 0,1868$, veíc/Est ag = $1,17 \pm 0,4976$, veíc/Est cro = $1,267 \pm 0,5817$ e DIZE/Est cro = $1,185 \pm 0,4726$ $p = 0,78$). Os dados agrupados estão representados na figura 11.

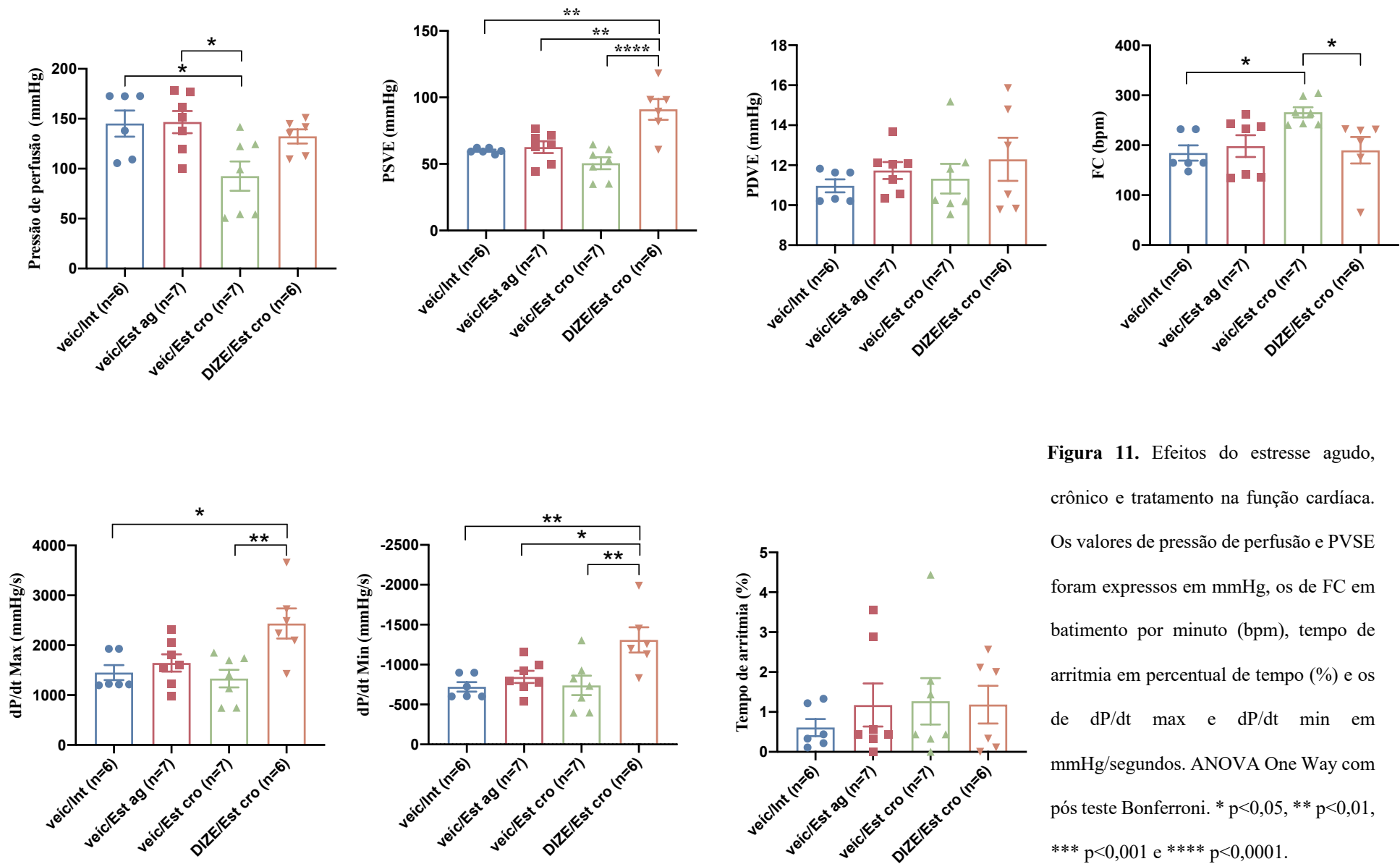


Figura 11. Efeitos do estresse agudo, crônico e tratamento na função cardíaca. Os valores de pressão de perfusão e PVSE foram expressos em mmHg, os de FC em batimento por minuto (bpm), tempo de arritmia em percentual de tempo (%) e os de dP/dt max e dP/dt min em mmHg/segundos. ANOVA One Way com pós teste Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.4 - Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico na morfologia do coração e adrenais

O peso do coração foi maior no grupo veíc/Est cro comparado aos demais grupos (peso do coração, g/cm: veíc/Int = $0,28 \pm 0,007$; veíc/Est ag = $0,27 \pm 0,007$; veíc/Est cro = $0,33 \pm 0,009$ e DIZE/Est cro = $0,28 \pm 0,015$ p = 0,008). O diâmetro de cardiomiócitos também foi maior no grupo veíc/Est cro comparado aos grupos demais grupos (diâmetro de cardiomiócitos, um: veíc/Int = $9,3 \pm 0,15$; veíc/Est ag = $9 \pm 0,28$; veíc/Est cro = $11 \pm 0,23$ e DIZE/Est cro = $9,5 \pm 0,17$ p = 0,0001).

Não houve diferença entre o peso da adrenal direita e esquerda entre os grupos (peso da adrenal direita, g/cm: veíc/Int = $0,0074 \pm 0,00018$; veíc/Est ag = $0,0074 \pm 0,00042$; veíc/Est cro = $0,0076 \pm 0,00039$ e DIZE/Est cro = $0,0080 \pm 0,00048$ p = 0,753; peso da adrenal esquerda, g/cm: veíc/Int = $0,0085 \pm 0,00024$; veíc/Est ag = $0,0078 \pm 0,00046$; veíc/Est cro = $0,0079 \pm 0,00057$ e DIZE/Est cro = $0,0079 \pm 0,00033$ p = 0,677). Os dados agrupados estão representados na figura 12.

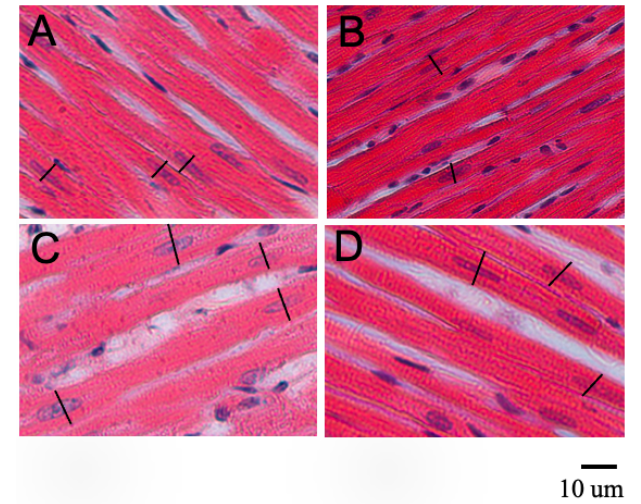
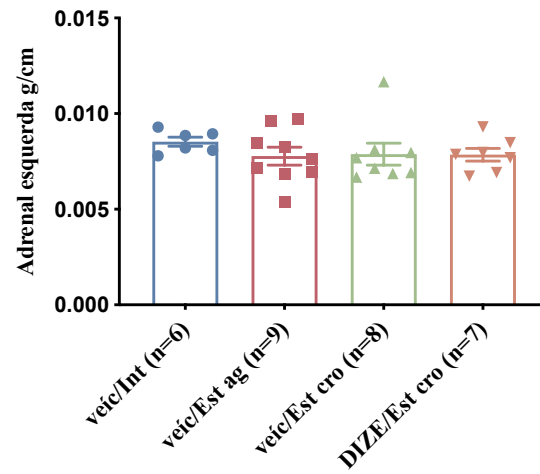
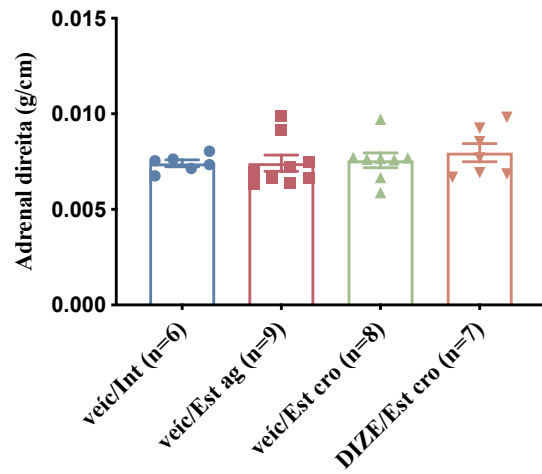
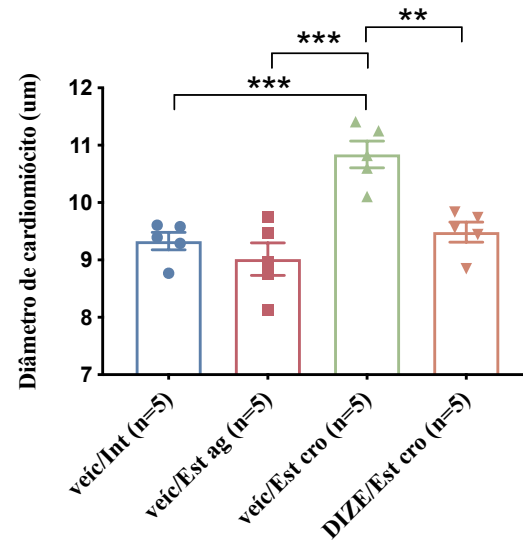
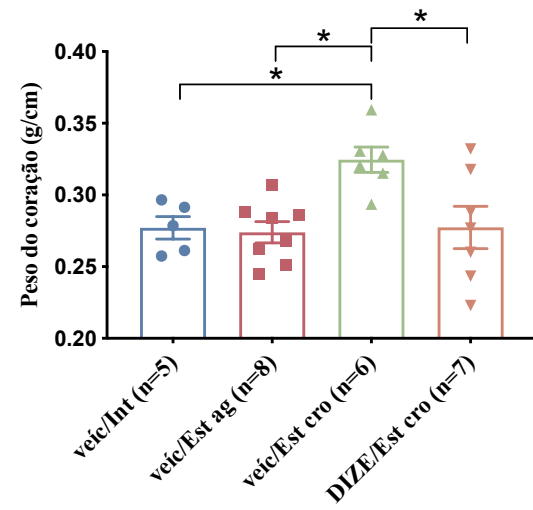


Figura 12. Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento no peso do coração e adrenais e diâmetro de cardiomiócitos. Na histologia são representados os grupos veic/Int (A), veic/Est ag (B), veic/Est cro (C) e DIZE/Est cro (D). ANOVA One Way com pós teste Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.5 – Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico na expressão das proteínas SERCA2 e PLN no ventrículo esquerdo

As expressões proteicas de SERCA2, PLN, relação pPLN(Thr17)/PLN e relação SERCA2/PLN não diferiram entre os grupos veíc/Int, veíc/Est ag, veíc/Est cro e DIZE/Est cro (Expressão de SERCA2, u.a.: veíc/Int = $1,01 \pm 0,099$; veíc/Est ag = $1,51 \pm 0,498$; veíc/Est cro = $1,44 \pm 0,319$ e DIZE/Est cro = $1,38 \pm 0,319$ p = 0,728; Expressão de PLN, u.a.: veíc/Int = $1,00 \pm 0,155$; veíc/Est ag = $0,999 \pm 0,145$; veíc/Est cro = $0,813 \pm 0,121$ e DIZE/Est cro = $0,805 \pm 0,116$ p = 0,662; Relação pPLN(Thr17)/PLN, u.a.: veíc/Int = $1,03 \pm 0,0859$; veíc/Est ag = $1,63 \pm 0,608$; veíc/Est cro = $1,35 \pm 0,505$ e DIZE/Est cro = $0,901 \pm 0,0616$ p = 0,584; Relação SERCA2/PLN, u.a.: veíc/Int = $1,03 \pm 0,0965$; veíc/Est ag = $1,45 \pm 0,358$; veíc/Est cro = $1,85 \pm 0,478$ e DIZE/Est cro = $1,80 \pm 0,559$ p = 0,487). Os dados agrupados estão representados na figura 13.

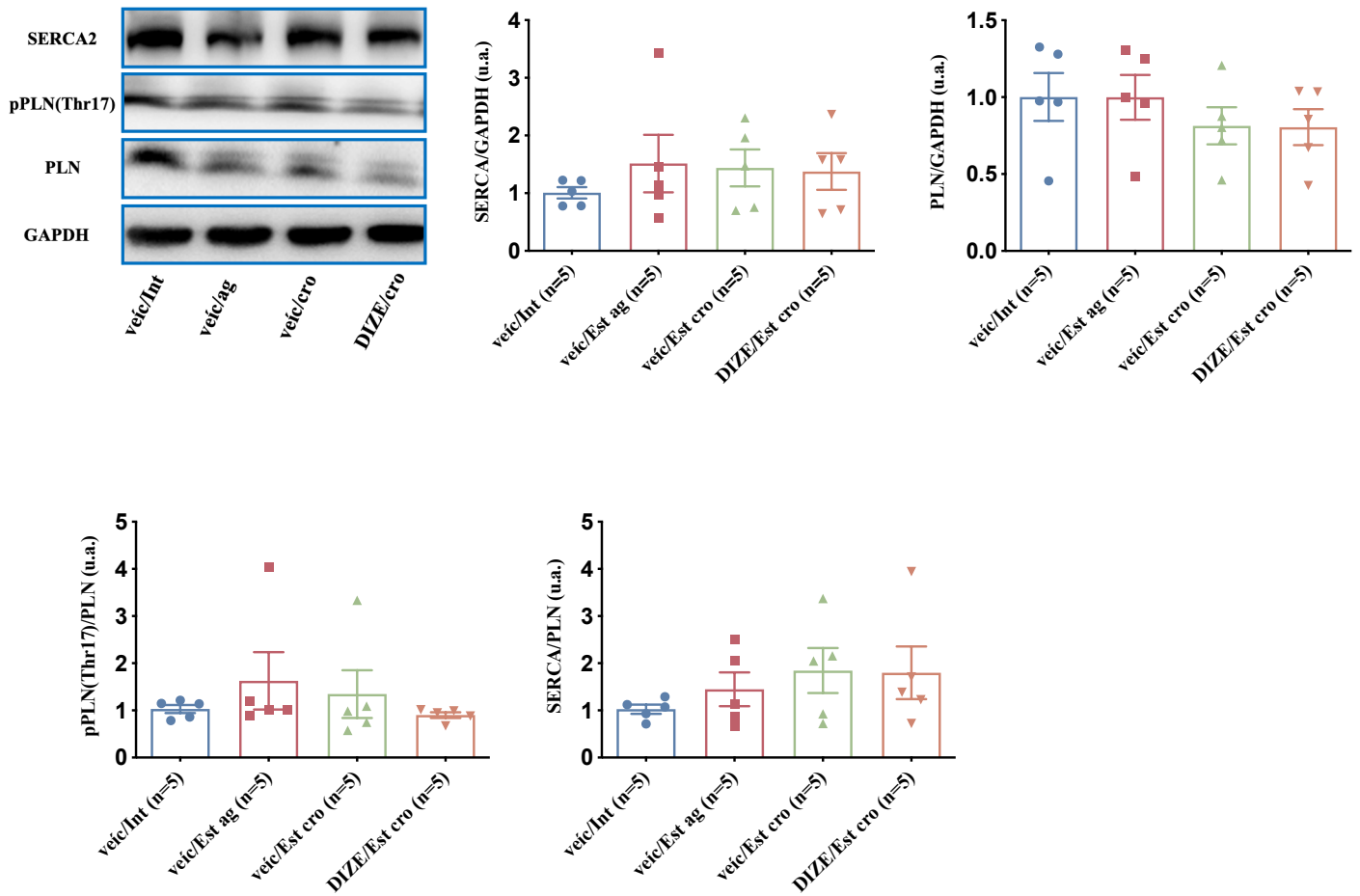


Figura 13. Análise densitométrica do Western Blot para a expressão proteica de SERCA2, PLN, relação pPLN (Thr17)/PLN e relação SERCA2/PLN após o estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico. ANOVA One Way com pós teste Bonferroni.

5.5 – Efeitos do estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico na atividade da ECA2 e expressão proteica do receptor Mas no ventrículo esquerdo

A atividade da ECA2 foi maior nos dois grupos tratados com o DIZE comparados aos demais grupos. Não houve diferença na atividade de ECA2 entre os grupos DIZE/Int e DIZE/ Est cro (atividade da ECA2, u.a./min/mg de proteína: veíc/Int = 307 ± 15 ; DIZE/Int = 390 ± 8 ; veíc/Est ag = 311 ± 14 ; veíc/Est cro = 287 ± 16 e DIZE/Est cro = 408 ± 16 $p < 0,0001$).

A expressão proteica do receptor Mas não diferiu entre os grupos (Expressão do receptor Mas(u.a.): veíc/Int = $1 \pm 0,139$; DIZE/Int = $0,621 \pm 0,089$; veíc/Est ag = $0,75 \pm 0,077$; veíc/Est cro = $0,987 \pm 0,204$ e DIZE/Est cro = $0,516 \pm 0,087$ $p = 0,0576$). Os dados agrupados estão representados na figura 14.

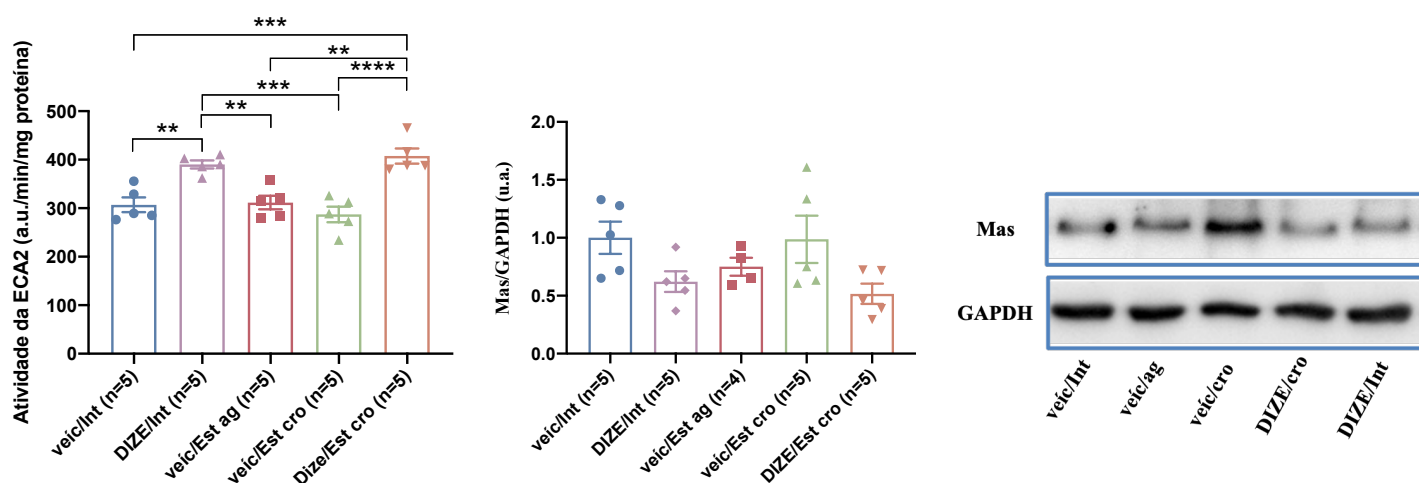


Figura 14. Atividade da ECA2 e expressão do receptor Mas no ventrículo esquerdo após o estresse agudo, estresse crônico e tratamento associado ao estresse crônico. ANOVA One Way com pós teste Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

6. Discussão

No presente estudo avaliamos os efeitos cardiovasculares e ansiolíticos do ativador de ECA2, o DIZE, em modelo de estresse crônico. Os principais resultados mostraram que o estresse crônico por 14 dias causou alterações significativas no ganho de peso corporal, níveis de ansiedade, função e morfologia cardíaca comparado ao estresse agudo. O DIZE preveniu de forma significativa os efeitos deletérios causados pelo estresse crônico reduzindo os níveis de ansiedade, a reatividade cardíaca ao estresse, o peso do coração, a hipertrofia de cardiomiócitos e aumentou a eficiência cardíaca. Adicionalmente, os resultados deste estudo, mostraram que o DIZE aumentou a atividade de ECA2 no coração, indicando que, pelo menos parte destes efeitos, podem estar relacionados com a ativação do eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas.

O modelo de estresse crônico imprevisível de intensidade moderada usado em nosso estudo, possui grande relevância translacional por mimetizar o estresse cotidiano. A utilização deste modelo permite avaliar os impactos causados pelo estresse crônico na saúde mental e seus impactos na saúde geral. Diversos estudos demonstram os efeitos deletérios da exposição contínua ao estresse emocional que estão relacionados a sua capacidade de ativar de forma prolongada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, resultando em aumento do tônus simpático e alterações neuroendócrinas (DE JONG *et al.*, 2013; FRISBEE *et al.*, 2015; MARIN; CRUZ; PLANETA, 2007; ULRICH-LAI *et al.*, 2006). Dentre as alterações causadas pelo estresse crônico, estão o desenvolvimento de comportamento ansioso e depressivo, aumento dos níveis de marcadores pró-inflamatórios, redução da resposta vasodilatadora arterial (FRISBEE *et al.*, 2015), aumento do risco de isquemia do miocárdio (GOLBIDI; FRISBEE; LAHER, 2015; GULLETTE *et al.*, 1997), taquicardia, hipertensão, redução da variabilidade da frequência cardíaca (BARTON *et al.*, 2007; GOLBIDI; FRISBEE; LAHER, 2015), hipertrofia da glândula adrenal decorrente da prolongada estimulação pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)

(ULRICH-LAI *et al.*, 2006), redução do peso corporal, aumento dos níveis plasmáticos de cortisol (DE JONG *et al.*, 2013; FRISBEE *et al.*, 2015; MARIN; CRUZ; PLANETA, 2007), e remodelamento de células de regiões envolvidas na resposta de estresse como hipocampo e núcleos da amígdala, o que pode estar associado ao comportamento mais ansioso (VYAS *et al.*, 2002).

O tratamento com o DIZE foi feito por via oral através de gavagem, tendo em vista que esta via de administração possui maior relevância translacional, por ser mais comumente usada no tratamento convencional clínico. As escolhas da dose e via de administração foram baseadas em estudos que já demonstraram que o DIZE por gavagem na dose de 1 mg/kg foi efetivo em produzir efeitos mediados pela ativação da ECA2 (MARIA *et al.*, 2016). Além disso, vale ressaltar que estudos anteriores demonstraram que o DIZE administrado por via periférica é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (ALIU; MAMMAN; PEREGRINE, 1993) e produzir efeitos centrais (BENNION; HALTIGAN; IRWIN; *et al.*, 2015; SILVA, C. C. *et al.*, 2020). Neste contexto, em nosso trabalho é possível que o DIZE tenha agido centralmente e periféricamente, produzindo seus efeitos ansiolíticos e cardioprotetores.

Nossos resultados mostraram que o estresse crônico resultou em menor ganho de peso quando comparado ao grupo intacto e esse efeito não foi observado no grupo tratado com o DIZE e submetido ao estresse crônico. A redução do ganho de peso pode estar relacionada a maior demanda energética, redução da ingestão de alimento e processos metabólicos mediados pelos glicocorticoides em condições de estresse (DAL-ZOTTO; MARTÍ; ARMARIO, 2000; MARIN; CRUZ; PLANETA, 2007; MARTÍ; MARTÍ; ARMARIO, 1994).

O grupo tratado com veículo e submetido ao estresse crônico demonstrou maiores níveis de ansiedade e o tratamento com o DIZE preveniu essa alteração. Em um estudo anterior, nós já mostramos que em ratos, o DIZE reduziu a ansiedade quando administrado na amígdala basolateral (SILVA, C. C.; FONTES, 2016). Resultados semelhantes foram obtidos por Wang

e cols. onde a infusão contínua intracerebroventricular de DIZE aumentou a ativação de ECA2 e reduziu os níveis de ansiedade (WANG, L. *et al.*, 2016). Outros estudos também mostraram os efeitos ansiolíticos da Ang-(1-7) quando administrada por via intracerebroventricular (KANGUSSU *et al.*, 2013) e em camundongos transgênicos que superexpressam esse peptídeo (KANGUSSU *et al.*, 2017; SANTOS, D. M. *et al.*, 2017) e ECA2 (KLOET *et al.*, 2020). Por outro lado, um estudo mostrou que camundongos com deleção genética do receptor Mas apresentaram comportamento mais ansioso (WALTHER *et al.*, 1998). O comportamento mais ansioso observado no grupo tratado com veículo e submetido ao estresse crônico, pode ser a causa de menor ingestão de alimento, o que justificaria o menor ganho de peso corporal observado nesse grupo.

A reatividade cardiovascular ao estresse não diferiu entre os grupos de estresse agudo e crônico, no entanto, a reatividade cardíaca foi menor no grupo tratado com DIZE e submetido ao estresse crônico. Recentemente, nós mostramos que a administração de DIZE na amígdala atenuou a resposta cardíaca ao estresse agudo. Esse efeito produzido pelo DIZE foi revertido pela injeção prévia do antagonista A-779 na amígdala, sugerindo o envolvimento do receptor Mas e da Ang-(1-7). Esse efeito foi também relacionado a capacidade do DIZE em reduzir a frequência da atividade pós-sináptica excitatória nessa região, que desempenha importante controle cardiovascular durante condições de estresse (SILVA, C. C. *et al.*, 2020). A redução da excitação da amígdala pode estar relacionada a menor ativação do hipotálamo dorsomedial e conseqüentemente menor efeito simpatoexcitatório sobre o coração. Essa hipótese pode ser fundamentada em estudo que comprova que o DIZE, através da ativação da ECA2, atua modulando o tônus autonômico, reduzindo o tônus simpático e aumentando o tônus parassimpático (RIGATTO *et al.*, 2013). Lima e cols. também mostraram que a Ang-(1-7) poderia interferir no efeito cronotrópico positivo mediado pelos receptores β_1 adrenérgicos, atenuando a taquicardia induzida pelo estresse (LIMA *et al.*, 2013). A ausência de efeito do

DIZE na resposta pressórica, possivelmente se deve a sua ação exclusivamente na modulação do tônus simpático cardíaco, tendo em vista, que vias distintas são responsáveis pelo controle da pressão arterial e frequência cardíaca (FONTES *et al.*, 2014).

Não houve diferença nos níveis de troponina cardíaca e glicemia entre os grupos, sugerindo, portanto, que o estresse não foi intenso e prolongado o suficiente para comprometer a integridade do miocárdio e aumentar os níveis de glicorticoides a ponto de causar significativo aumento da glicemia. A mesma hipótese é válida para justificar a ausência de diferença de peso das adrenais entre os grupos, tendo em vista que estímulos estressante mais intensos e/ou duradouros promoveram hipertrofia da glândula adrenal (ULRICH-LAI *et al.*, 2006).

O grupo tratado com veículo e submetido ao estresse crônico também apresentou maior peso do coração e diâmetro de cardiomiócitos, os quais podem estar relacionados ao aumento dos níveis de Ang II durante condições de estresse (YANG *et al.*, 1993). Os efeitos tróficos da Ang II em células cardíacas já foi demonstrado em trabalhos anteriores e está relacionado aos níveis do fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) (MLINAREVIC *et al.*, 2017; SADOSHIMA; IZUMO, 1993; SCHULTZ *et al.*, 2002). O tratamento com o DIZE preveniu o aumento do peso do coração e a hipertrofia de cardiomiócitos. Nossos resultados corroboram os achados de Macedo e cols., onde o DIZE preveniu a hipertrofia de cardiomiócitos em modelos de sobrecarga pressórica cardíaca. Esse efeito foi mediado pelos receptores Mas e associado a capacidade de prevenir o aumento da expressão de TGF $\beta 1$ (MACEDO *et al.*, 2016). A via de sinalização protetora induzida pelo eixo ECA2/Ang-(1-7)/Mas em cardiomiócitos tem sido reportada há alguns anos e inclui efeitos anti-hipertrófico, anti-inflamatório e antioxidante (GOMES; SANTOS; GUATIMOSIM, 2012). Os efeitos anti-hipertróficos da Ang-(1-7) no coração e cardiomiócitos são mediados pelos receptores Mas (TALLANT; FERRARIO; GALLAGHER, 2005) e decorrem da sua capacidade de prevenir o

remodelamento patológico induzido pela ação da Ang II através da modulação da atividade de duas proteínas, NFAT (Fator nuclear de ativação das células T) e GSK3 β (Glicogênio sintase quinase). A Ang-(1-7) age prevenindo a translocação da NFAT para o núcleo e a ativação do programa de gene hipertrófico. Além disso, a Ang-(1-7) previne a inativação da GSK3 β que está envolvida na regulação do desenvolvimento da hipertrofia (GOMES; SANTOS; GUATIMOSIM, 2012).

Na avaliação da função cardíaca intrínseca, nós observamos que o grupo tratado com veículo e submetido ao estresse crônico demonstrou menor pressão de perfusão coronariana e maior FC cardíaca e esse efeito foi prevenido em animais tratados com o DIZE. A menor pressão de perfusão coronariana pode estar relacionada ao fato de que o grupo veículo submetido ao estresse crônico, possuía corações maiores comparado aos demais e eram mantidos no mesmo fluxo na preparação de Langendorff. A maior FC no coração de animais estressados, possivelmente se deve a ação de catecolaminas nos receptores β presentes no coração tendo em vista que a modulação autonômica é ausente neste tipo de modelo. O grupo estressado tratado com o DIZE demonstrou maior pressão ventricular sistólica, dP/dt máxima (derivada que reflete na velocidade de contração ventricular) e dP/dt mínima (derivada que reflete na velocidade de relaxamento ventricular), caracterizando maior eficiência cardíaca. Em um estudo anterior, nós também observamos que o DIZE aumentou dP/dt máxima e mínima melhorando a eficiência cardíaca de corações isolados (SILVA, C. C.; FONTES, 2016). Em concordância com esses achados, Macedo e cols., mostraram que o DIZE teve efeito cardioprotetor em corações isolados com sobrecarga de pressão, induzida pela coarctação de aorta. Esses efeitos foram relacionados à maior ativação da ECA2 e aumento dos níveis de Ang-(1-7), visto que foram abolidos com o antagonista de receptor Mas (MACEDO *et al.*, 2016). Ferreira e cols. obtiveram resultados semelhantes, onde a Ang-(1-7) preveniu a redução da dP/dt máxima e mínima, melhorando a função contrátil em modelos de isquemia e

reperfusão (FERREIRA; SANTOS; ALMEIDA, 2002). Adicionalmente, foi demonstrado que em ratos com infarto do miocárdio o DIZE também teve efeito positivo sobre essas variáveis, melhorando a contratilidade e relaxamento do miocárdio (CASTARDELI *et al.*, 2018).

O excesso de catecolaminas em condições de estresse recorrente também pode causar alterações na expressão de proteínas contráteis do miocárdio e concentrações de proteínas reguladoras de cálcio (KANG *et al.*, 2017; NEF *et al.*, 2007). A sarco/retículo endoplasmático Ca^{2+} ATPase (SERCA2) é uma das principais proteínas envolvidas no transporte de cálcio para o retículo sarcoplasmático, processo essencial para a fase de contração cardíaca (ANDERSSON *et al.*, 2009; ARONSEN; SWIFT; SEJERSTED, 2013; MEYER *et al.*, 1999). A atividade dessa proteína é regulada pela fosfolambam (PLN) e ausência dessa proteína nos cardiomiócitos de camundongos KO está associada a disfunção cardíaca (ANDERSSON *et al.*, 2009). Nesse trabalho, nós avaliamos a expressão da SERCA2, PLN, a relação pPLN(Thr17)/PLN e relação SERCA2/PLN no ventrículo esquerdo. No nosso trabalho não houve diferenças na expressão de SERCA2 e PLN e nas suas relações entre os grupos, o que possivelmente pode estar relacionado a intensidade e duração modelo de estresse crônico utilizado, que não foi intenso e prolongado o suficiente para promover alterações.

Para investigar se os efeitos atribuídos ao DIZE eram em decorrência da ativação da ECA2 como proposto e demonstrado por muitos trabalhos, nós avaliamos a atividade da ECA2 no ventrículo esquerdo. Os animais tratados com DIZE (tanto submetidos ao estresse crônico quanto os não submetidos a nenhum tipo de estresse), demonstraram maior atividade dessa enzima comparado aos demais grupos. Esses achados vão ao encontro de inúmeros trabalhos que mostraram que os efeitos produzidos pelo DIZE estão associados a maior ativação da ECA2, aumento da degradação da Ang II em Ang-(1-7), que por sua vez interage com os receptores Mas (KULEMINA; OSTROV, 2011; MARIA *et al.*, 2016; QI *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2016; VELKOSKA *et al.*, 2016).

Recentemente, nós mostramos que em cultura de células o DIZE aumentou a expressão do receptor Mas (SILVA, C. C. *et al.*, 2020). Para investigar se seus efeitos também poderiam estar relacionados a alterações da expressão desse receptor *in vivo*, nós avaliamos a sua expressão no ventrículo esquerdo. No entanto, ao contrário do que demonstramos em culturas de células, não houve diferença na expressão desse receptor entre os grupos. A diferença entre os resultados de experimentos *in vitro* e *in vivo* possivelmente pode estar relacionada a ausência de mecanismos compensatórios no modelo *in vitro*, além de diferenças entre os modelos experimentais usados, tais como a dose, via de administração e tecido utilizado para a avaliação.

7. Conclusões

Em conjunto, nossos dados evidenciam os efeitos deletérios (morfológicos e funcionais) causados pelo estresse crônico, mesmo moderado, no sistema cardiovascular. Além disso, demonstram que DIZE foi eficaz na redução da reatividade cardiovascular ao estresse, redução da ansiedade, melhora da eficiência cardíaca e prevenção das alterações morfológicas cardíacas causadas pelo estresse crônico. Juntos, os dados mostram que a ativação do eixo não clássico do SRA por meio da ativação da ECA2 representa uma alternativa promissora para prevenir alterações cardiovasculares decorrentes de condições de estresse crônico.

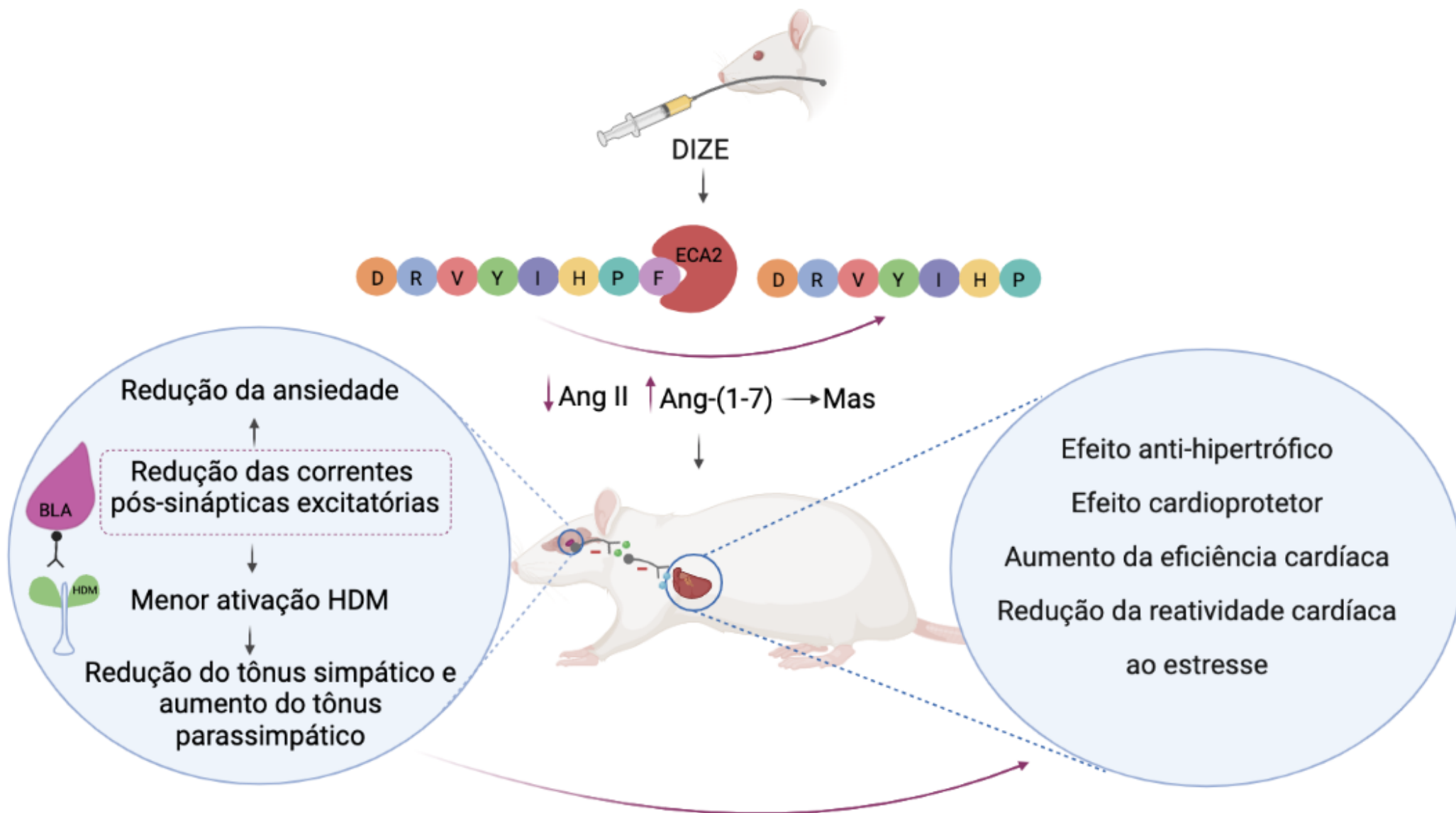


Figura 15. Esquema representativo dos efeitos provocados pela administração periférica do DIZE e possíveis alvos de ação (cérebro e coração).

8. Referências

AKASHI, Y. J.; NEF, H. M.; LYON, A. R. Epidemiology and pathophysiology of Takotsubo syndrome. *Nature Reviews Cardiology*, v. 12, n. 7, p. 387–397, jul. 2015.

ALIU, Y. O.; MAMMAN, M.; PEREGRINE, A. S. Pharmacokinetics of diminazene in female Boran (*Bos indicus*) cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, container-title: Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, v. 16, n. 3, p. 291–300, set. 1993.

ANDERSSON, K. B. *et al.* Moderate heart dysfunction in mice with inducible cardiomyocyte-specific excision of the *Serca2* gene. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 47, n. 2, p. 180–187, 1 ago. 2009.

ARONSEN, J. M.; SWIFT, F.; SEJERSTED, O. M. Cardiac sodium transport and excitation–contraction coupling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Na⁺ Regulation in Cardiac Myocytes. v. 61, p. 11–19, 1 ago. 2013.

AVERILL, D. B.; DIZ, D. I. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Research Bulletin*, v. 51, n. 2, p. 119–128, jan. 2000.

BARTON, D. A. *et al.* Sympathetic activity in major depressive disorder: identifying those at increased cardiac risk? *Journal of Hypertension*, v. 25, n. 10, p. 2117–2124, out. 2007.

BASTOS, L. F. C. S. *OPAS/OMS Brasil - Doenças cardiovasculares | OPAS/OMS*. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096>. Acesso em: 9 set. 2020.

BECKER, L. K. *et al.* Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 2007.

BENNION, D. M.; HALTIGAN, E. A.; IRWIN, A. J.; *et al.* Activation of the Neuroprotective Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Rat Ischemic Stroke. *Hypertension*, v. 66, n. 1, p. 141–148, jul. 2015.

BENNION, D. M.; HALTIGAN, E.; REGENHARDT, R. W.; *et al.* Neuroprotective Mechanisms of the ACE2–Angiotensin-(1-7)–Mas Axis in Stroke. *Current Hypertension Reports*, v. 17, n. 2, 2015.

BESSA, A. DE S. M. DE. *Tratamento com aceturato de diminazeno ou angiotensina-(1-7) em ratas hipertensas gestantes atenua disfunções cardiovasculares na prole*. 2019. Universidade Federal de Goiás, 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1, p. 248–254, 7 maio 1976.

- CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. *et al.* Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 263, n. 1, p. R89–R94, 1 jul. 1992.
- CASTARDELI, C. *et al.* The ACE 2 activator diminazene acetate (DIZE) improves left ventricular diastolic dysfunction following myocardial infarction in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 107, p. 212–218, 2018.
- CASTREN, E.; SAAVEDRA, J. M. Repeated stress increases the density of angiotensin II binding sites in rat paraventricular nucleus and subfornical organ. *Endocrinology*, v. 122, n. 1, p. 370–372, 1988.
- DAL-ZOTTO, S.; MARTÍ, O.; ARMARIO, A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behavioural brain research*, v. 114, n. 1–2, p. 175–181, 2000.
- DAMPNEY, R. *et al.* Central Mechanisms Underlying Short- And Long-Term Regulation Of The Cardiovascular System. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 29, n. 4, p. 261–268, 2002.
- DARTORA, D. R. *et al.* Improved cardiovascular autonomic modulation in transgenic rats expressing an Ang-(1-7)-producing fusion protein. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, v. 95, n. 9, p. 993–998, 2017.
- DE JONG, T. R. *et al.* Physiological and neuroendocrine responses to chronic variable stress in male California mice (*Peromyscus californicus*): Influence of social environment and paternal state. *Psychoneuroendocrinology*, v. 38, n. 10, p. 2023–2033, out. 2013.
- DI MARINO, V.; ETIENNE, Y.; NIDDAM, M. *The Amygdaloid Nuclear Complex*. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- DIMICCO, J. A. *et al.* The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: Part renaissance, part revolution. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Functional role of specific systems within the extended amygdala and hypothalamus. v. 71, n. 3, p. 469–480, 1 mar. 2002.
- DUAN, R. *et al.* ACE2 activator diminazene acetate ameliorates Alzheimer’s disease-like neuropathology and rescues cognitive impairment in SAMP8 mice. *Aging (Albany NY)*, v. 12, n. 14, p. 14819–14829, 23 jul. 2020.
- ESLER, M. *et al.* Chronic mental stress is a cause of essential hypertension: Presence of biological markers of stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 35, n. 4, p. 498–502, 2008.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. S.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. *Braz J Med Biol Res*, p. 8, 2002.
- FILHO, M. L.; FONTES, M. A. P. *Investigação das alterações autonômicas e cardiovasculares produzidas pelo estresse crônico: contribuição do hipotálamo dorsomedial*. Universidade Federal de Minas Gerais, 2016

- FIROOZMAND, L. T. *et al.* Blockade of AT1 type receptors for angiotensin II prevents cardiac microvascular fibrosis induced by chronic stress in Sprague–Dawley rats. *Stress*, v. 21, n. 6, p. 484–493, 2 nov. 2018.
- FONTES, M. A. P. *et al.* Emotional stress and sympathetic activity: Contribution of dorsomedial hypothalamus to cardiac arrhythmias. *Brain Research*, v. 1554, p. 49–58, 2014.
- FONTES, M. A. P. *et al.* The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience*, v. 184, p. 64–74, 16 jun. 2011.
- FONTES, M. A. P.; LIMA, A. M.; SANTOS, R. A. S. Brain angiotensin-(1–7)/Mas axis: A new target to reduce the cardiovascular risk to emotional stress. *Neuropeptides*, v. 56, p. 9–17, 2015.
- FRAGA-SILVA, R., A. *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activation Improves Endothelial Function. *Hypertension*, v. 61, n. 6, p. 1233–1238, 1 jun. 2013.
- FRAGA-SILVA, R., A. *et al.* Diminazene enhances stability of atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *Vascular pharmacology*, v. 74, p. 103–113, 2015.
- FRISBEE, J. C. *et al.* An Unpredictable Chronic Mild Stress Protocol for Instigating Depressive Symptoms, Behavioral Changes and Negative Health Outcomes in Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, n. 106, 2 dez. 2015. Acesso em: 17 ago. 2020.
- GARD, P. R. Angiotensin as a target for the treatment of Alzheimer’s disease, anxiety and depression. *Expert opinion on therapeutic targets*, v. 8, n. 1, p. 7–14, 2004.
- GARD, P. R. *et al.* Strain differences in the anxiolytic effects of losartan in the mouse. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 69, n. 1–2, p. 35–40, maio 2001.
- GAUDET, E.; GODWIN, S. J.; HEAD, G. A. Effects of central infusion of ANG II and losartan on the cardiac baroreflex in rabbits. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 278, n. 2, p. H558–H566, 1 fev. 2000.
- GJYMISHKA, A. *et al.* Diminazene aceturate is an ACE2 activator and a novel antihypertensive drug. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 24, n. 1, p. 1065.27, 2010.
- GOLBIDI, S.; FRISBEE, J. C.; LAHER, I. Chronic stress impacts the cardiovascular system: animal models and clinical outcomes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 308, n. 12, p. H1476–H1498, 17 abr. 2015.
- GOMES, E. R. M.; SANTOS, R. A. S.; GUATIMOSIM, S. Angiotensin-(1-7)-Mediated Signaling in Cardiomyocytes. *International Journal of Hypertension*, v. 2012, p. e493129, 4 mar. 2012.
- GULLETTE, E. C. *et al.* Effects of mental stress on myocardial ischemia during daily life. *Jama*, v. 277, n. 19, p. 1521–1526, 1997.
- HILTON, S. M. Ways of viewing the central nervous control of the circulation — old and new. *Brain Research*, v. 87, n. 2–3, p. 213–219, 1975.

- HUANG, L. *et al.* Novel Peptide Inhibitors of Angiotensin-converting Enzyme 2*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 18, p. 15532–15540, 2 maio 2003.
- HUENTELMAN, M. J. *et al.* Cloning and characterization of a secreted form of angiotensin-converting enzyme 2. *Regulatory Peptides*, v. 122, n. 2, p. 61–67, 15 out. 2004.
- JESUS, I. C. G. DE *et al.* Alamandine acts via MrgD to induce AMPK/NO activation against ANG II hypertrophy in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 314, n. 6, p. C702–C711, 14 fev. 2018.
- JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 10, n. 6, p. 459–466, jun. 2009.
- JOVIANO-SANTOS, J. V. *et al.* Diminazene aceturate (DIZE) has cellular and in vivo antiarrhythmic effects. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 47, n. 2, p. 213–219, 2020.
- KANG, M. G. *et al.* Conventional Coronary Angiography Induced Takotsubo Cardiomyopathy Complicated with Cardiac Tamponade. *Case Reports in Cardiology*, v. 2017, p. 1–4, 2017.
- KANGUSSU, L. M. *et al.* Activation of angiotensin-(1–7)/Mas axis in the brain lowers blood pressure and attenuates cardiac remodeling in hypertensive transgenic (mRen2)27 rats. *Neuropharmacology*, v. 97, p. 58–66, 2015.
- KANGUSSU, L. M. *et al.* Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. *Behavioural Brain Research*, v. 257, p. 25–30, 2013.
- KANGUSSU, L. M. *et al.* Reduced anxiety-like behavior in transgenic rats with chronically overproduction of angiotensin-(1–7): role of the Mas receptor. *Behavioural brain research*, v. 331, p. 193–198, 2017.
- KISHORE, S. P. *et al.* Modernizing the World Health Organization List of Essential Medicines for Preventing and Controlling Cardiovascular Diseases. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 71, n. 5, p. 564–574, 6 fev. 2018.
- KLOET, A. D. DE *et al.* Overexpression of angiotensin converting enzyme 2 reduces anxiety-like behavior in female mice. *Physiology & Behavior*, v. 224, p. 113002, 1 out. 2020.
- KULEMINA, L. V.; OSTROV, D. A. Prediction of Off-Target Effects on Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 16, n. 8, p. 878–885, 2011.
- LAGRAAUW, H. M.; KUIPER, J.; BOT, I. Acute and chronic psychological stress as risk factors for cardiovascular disease: Insights gained from epidemiological, clinical and experimental studies. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 50, p. 18–30, nov. 2015.
- LEDOUX, J. The amygdala. *Current Biology*, container-title: Current Biology, v. 17, n. 20, p. 866–874, 2007.

- LIAO, R.; PODESSER, B. K.; LIM, C. C. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 303, n. 2, p. H156–H167, 15 jul. 2012.
- LIMA, A. M. *et al.* Activation of angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis attenuates the cardiac reactivity to acute emotional stress. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, container-title: *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, v. 305, n. 7, p. H1057–H1067, 1 out. 2013.
- LYON, A. R. *et al.* Stress (Takotsubo) cardiomyopathy—a novel pathophysiological hypothesis to explain catecholamine-induced acute myocardial stunning. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, v. 5, n. 1, p. 22–29, jan. 2008.
- MACEDO, L. M. *et al.* Cardioprotective effects of diminazene aceturate in pressure-overloaded rat hearts. *Life Sciences*, v. 155, p. 63–69, 2016.
- MALEK, M.; NEMATBAKHSI, M. The preventive effects of diminazene aceturate in renal ischemia/reperfusion injury in male and female rats. *Advances in preventive medicine*, v. 2014, 2014.
- MARIA, M. L. A. *et al.* Anti-hypertensive Effects of Diminazene Aceturate: An Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activator in Rats. *Protein and peptide letters*, container-title: *Protein and peptide letters*, v. 23, n. 1, p. 9–16, 2016.
- MARIN, M. T.; CRUZ, F. C.; PLANETA, C. S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiology & Behavior*, v. 90, n. 1, p. 29–35, 30 jan. 2007.
- MARTÍ, O.; MARTÍ, J.; ARMARIO, A. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiology & behavior*, v. 55, n. 4, p. 747–753, 1994.
- MATTA, R. J.; LAWLER, J. E.; LOWN, B. Ventricular electrical instability in the conscious dog: effects of psychologic stress and beta-adrenergic blockade ventricular electrical instability. *The American Journal of Cardiology*, p. 594–598, 1976.
- MCEWEN, B. S. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European Journal of Pharmacology*, v. 583, n. 2–3, p. 174–185, 2008.
- MEYER, M. *et al.* Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 276, n. 3, p. H779–H785, 1 mar. 1999.
- MLINAREVIC, D. *et al.* Pathophysiological Mechanisms of Takotsubo Cardiomyopathy - a Systematic Review. v. 1, n. 1, p. 13, 2017.
- MORI, H. *et al.* Increased responsiveness of left ventricular apical myocardium to adrenergic stimuli. *Cardiovascular Research*, v. 27, n. 2, p. 192–198, 1 fev. 1993.

- MYERS, B. *et al.* Central stress-integrative circuits: forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Structure and Function*, v. 219, n. 4, p. 1287–1303, 2014.
- NEF, H. M. *et al.* Tako-Tsubo cardiomyopathy: intraindividual structural analysis in the acute phase and after functional recovery. *European Heart Journal*, v. 28, n. 20, p. 2456–2464, 7 set. 2007.
- NUNES, E. O.; FIGUEIREDO, A. M. A bioquímica clínica no diagnóstico e prognóstico de pacientes acometidos pelo Infarto Agudo do Miocárdio evidenciando a importância da Troponina T. v. 37, n. 2, p. 12, 2018.
- OCARANZA, M. P. *et al.* Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, v. 17, n. 2, p. 116–129, fev. 2020.
- OLIVEIRA, G. L. DA S.; FREITAS, R. M. Diminazene aceturate—An antiparasitic drug of antiquity: Advances in pharmacology & therapeutics. *Pharmacological Research*, v. 102, p. 138–157, 2015.
- OSCAR, C. G. *et al.* Angiotensin-(1–7) in the basolateral amygdala attenuates the cardiovascular response evoked by acute emotional stress. *Brain Research*, v. 1594, p. 183–189, 2015.
- PACAK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine reviews*, v. 22, n. 4, p. 502–548, 2001.
- PASSOS-SILVA, D.; BRAGA, T. V.; SANTOS, R. A. S. DOS. Angiotensin-(1–7): beyond the cardio-renal actions. *Clinical Science*, v. 124, n. 7, p. 443–456, 2013.
- PASSOS-SILVA, D.; BRANDAN, E.; SANTOS, R., A, S. Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 36, n. 5, p. 310–320, 2015.
- PAVEL, J. *et al.* Peripherally Administered Angiotensin II AT₁ Receptor Antagonists Are Anti-stress Compounds *in Vivo*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1148, n. 1, p. 360–366, 2008.
- QI, Y. *et al.* Diminazene aceturate enhances angiotensin-converting enzyme 2 activity and attenuates ischemia-induced cardiac pathophysiology. *Hypertension*, v. 62, n. 4, p. 746–752, 2013.
- RANDHAWA, M. S. *et al.* Diagnostic Utility of Cardiac Biomarkers in Discriminating Takotsubo Cardiomyopathy From Acute Myocardial Infarction. *Journal of Cardiac Failure*, v. 20, n. 1, p. 2–8, jan. 2014.
- RESSLER, K. J. Amygdala Activity, Fear, and Anxiety: Modulation by Stress. *Biological Psychiatry*, v. 67, n. 12, p. 1117–1119, jun. 2010.
- RICE, G. I. *et al.* Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. p. 7, 2004.

- RIGATTO, K. *et al.* Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension. *European Journal of Pharmacology*, container-title: European Journal of Pharmacology, v. 713, n. 1–3, p. 89–93, 2013.
- ROZANSKI, A.; BLUMENTHAL, J. A.; KAPLAN, J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation*, v. 99, n. 16, p. 2192–2217, 1999.
- SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circulation research*, v. 73, n. 3, p. 413–423, 1993.
- SANTOS, D. M. *et al.* Chronic overexpression of angiotensin-(1-7) in rats reduces cardiac reactivity to acute stress and dampens anxious behavior. *Stress*, container-title: Stress, v. 20, n. 2, p. 189–196, 2017.
- SANTOS, R. A. S. Angiotensin-(1–7). *Hypertension*, v. 63, n. 6, p. 1138–1147, 1 jun. 2014.
- SANTOS, R. A. S. *et al.* The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). *Physiological Reviews*, v. 98, n. 1, p. 505–553, 20 dez. 2017.
- SANTOS, R. A. S. *et al.* The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 316, n. 5, p. H958–H970, 1 fev. 2019.
- SARAIVA, R. S.; BARBOSA, E. C. D.; GUIMARÃES, J. I. A importância do bloqueio do Sistema Renina-Angiotensina na DAC crônica. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul*, v. 13, 2008.
- SCHNEIDER, T.; POPIK, P. Attenuation of estrous cycle-dependent marble burying in female rats by acute treatment with progesterone and antidepressants. *Psychoneuroendocrinology*, v. 32, n. 6, p. 651–659, jul. 2007.
- SCHULTZ, J. E. J. *et al.* TGF- β 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 109, n. 6, p. 787–796, 15 mar. 2002.
- SHEKHAR, A. Angiotensin-II Is a Putative Neurotransmitter in Lactate-Induced Panic-Like Responses in Rats with Disruption of GABAergic Inhibition in the Dorsomedial Hypothalamus. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 36, p. 9205–9215, 2006.
- SILVA, A. S. *et al.* Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. *Ciência Rural*, 2008.
- SILVA, C. C. *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activator, DIZE in the basolateral amygdala attenuates the tachycardic response to acute stress by modulating glutamatergic tone. *Neuropeptides*, 2020.

SILVA, C. C.; FONTES, M. A. P. Avaliação da resposta cardiovascular ao estresse em ratos após a ativação da enzima conversora de angiotensina 2 com aceturato de diminazeno. Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

SOUZA, L. K. M. *et al.* Diminazene aceturate, an angiotensin-converting enzyme II activator, prevents gastric mucosal damage in mice: Role of the angiotensin-(1–7)/Mas receptor axis. *Biochemical Pharmacology*, v. 112, p. 50–59, 2016.

SRINIVASAN, J.; SURESH, B.; RAMANATHAN, M. Differential anxiolytic effect of enalapril and losartan in normotensive and renal hypertensive rats. *Physiology & Behavior*, v. 78, n. 4–5, p. 585–591, abr. 2003.

STEPTOE, A.; KIVIMÄKI, M. Stress and cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, v. 9, n. 6, p. 360–370, jun. 2012.

SZARDIEN, S. *et al.* Molecular basis of disturbed extracellular matrix homeostasis in stress cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, v. 168, n. 2, p. 1685–1688, set. 2013.

TAGGART, P.; CRITCHLEY, H.; LAMBIASE, P. D. Heart-brain interactions in cardiac arrhythmia. *Heart*, v. 97, n. 9, p. 698–708, 1 maio 2011.

TALLANT, E. A.; FERRARIO, C. M.; GALLAGHER, P. E. Angiotensin-(1–7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 289, n. 4, p. H1560–H1566, 1 out. 2005.

UEYAMA, T. *et al.* Estrogen alters c-Fos response to immobilization stress in the brain of ovariectomized rats. *Brain Research*, v. 1084, n. 1, p. 67–79, abr. 2006.

ULRICH-LAI, Y. M. *et al.* Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 291, n. 5, p. E965–E973, nov. 2006.

UNGER, T.; PAULIS, L.; SICA, D. A. Therapeutic perspectives in hypertension: novel means for renin–angiotensin–aldosterone system modulation and emerging device-based approaches. *European heart journal*, v. 32, n. 22, p. 2739–2747, 2011.

VELKOSKA, E. *et al.* The ACE2 Activator Diminazene Improves Cardiac Structure and Function in an Experimental Model of Kidney Disease. *Heart, Lung and Circulation*, container-title: Heart, Lung and Circulation, v. 25, p. S82–S83, 2016.

VELKOSKA, E.; PATEL, S. K.; BURRELL, L. M. Angiotensin converting enzyme 2 and diminazene: role in cardiovascular and blood pressure regulation. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 25, n. 5, p. 384–395, 2016.

VERANO-BRAGA, T. *et al.* ACE2 in the renin–angiotensin system. *Clinical Science*, v. 134, n. 23, p. 3063–3078, 2 dez. 2020.

VICKERS, C. Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-converting Enzyme-related Carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 17, p. 14838–14843, 2002.

VYAS, A. *et al.* Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons. *The Journal of Neuroscience*, v. 22, n. 15, p. 6810–6818, 1 ago. 2002.

WALTHER, T. *et al.* Sustained Long Term Potentiation and Anxiety in Mice Lacking the Mas Protooncogene. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 19, p. 11867–11873, 1998.

WANG, H. *et al.* Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, v. 388, n. 10053, p. 1459–1544, 8 out. 2016.

WANG, L. *et al.* Increasing brain angiotensin converting enzyme 2 activity decreases anxiety-like behavior in male mice by activating central Mas receptors. *Neuropharmacology*, container-title: Neuropharmacology, v. 105, p. 114–123, 2016.

YANG, G. *et al.* Changes in Circulating and Tissue Angiotensin II during Acute and Chronic Stress. *Neurosignals*, v. 2, n. 3, p. 166–172, 1993.

YE, S. *et al.* Losartan Reduces Central and Peripheral Sympathetic Nerve Activity in a Rat Model of Neurogenic Hypertension. *Hypertension*, v. 39, n. 6, p. 1101–1106, jun. 2002.

ZELDETZ, V. *et al.* A New Method for Inducing a Depression-Like Behavior in Rats. *Journal of Visualized Experiments*, n. 132, 22 fev. 2018.

9. Anexos

Tabela 1. Protocolo de estresse crônico imprevisível de intensidade moderada.

Dia	Estresse 1	Tempo	Estresse 2	Tempo
1. QUI	Nado forçado	5 min	Plataforma	30 min
2. SEX	Contenção	30 min	Água na caixa	3 horas
3. SÁB	Shaker	40 min	–	–
4. DOM	Água na caixa	3 horas	–	–
5. SEG	Contenção	30 min	Shaker	40 min
6. TER	Caixa inclinada	4 horas	Nado forçado	5 min
7. QUA	Shaker	40 min	Plataforma	30 min
8. QUI	Nado forçado	5 min	Contenção	30 min
9. SEX	Plataforma	30 min	Caixa inclinada	4 horas
10. SÁB	Nado forçado	5 min	–	–
11. DOM	Contenção	30 min	–	–
12. SEG	Caixa inclinada	4 horas	Shaker	40 min
13. TER	Canulação	–	Isolamento	overnight
14. QUA	Água na caixa	10 min	Registro PAM/FC	–



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 274/2018

Título do projeto: Avaliação dos efeitos cardioprotetores de componentes do Sistema Renina Angiotensina no estresse crônico

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Marco Antonio Peliky Fontes

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Fisiologia e Biofísica

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 01/10/2018. Validade: 01/10/2018 à 30/09/2023 RECOMENDAÇÃO: 1 - Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados. O e-mail enviado pelo CONCEA se refere ao credenciamento da CEUA, e não dos biotérios. CIAEP é designado para a CEUA.

Belo Horizonte, 01/10/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br