

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**ALESSANDRA OLIVEIRA SILVA**

**EFEITO DO QUEFIR SOBRE OS SISTEMAS CARDIOVASCULAR E RENAL EM  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO.**

ALFENAS/MG

2020

**ALESSANDRA OLIVEIRA SILVA**

**EFEITO DO QUEFIR SOBRE OS SISTEMAS CARDIOVASCULAR E RENAL EM  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO.**

Dissertação de mestrado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.  
Orientador (a): Profa. Dra. Carla Speroni Ceron.  
Coorientador (a): Prof. Dr. Marcos Vinicius Salles Dias

ALFENAS/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação  
(CIP) Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal  
de Alfenas

Silva, Alessandra Oliveira.

S586e Efeito do quefir sobre os sistemas cardiovascular e renal em camundongos submetidos ao modelo de estresse crônico / Alessandra Oliveira Silva -- Alfenas/MG, 2020.  
76 f. : il. --

Orientadora: Carla Speroni Ceron  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal de Alfenas, 2020.  
Bibliografia.

1. Kefir. 2. Estresse Oxidativo. 3. Estresse Fisiológico. I.  
Ceron, Carla Speroni. II. Título.

Ficha Catalográfica elaborada por Fátima dos Reis  
Goiatá Bibliotecária-Documentalista CRB/6-425

**ALESSANDRA OLIVEIRA SILVA**

**EFEITO DO QUEFIR SOBRE OS SISTEMAS  
CARDIOVASCULAR E RENAL EM CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS AO MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 29 de julho de 2020

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

Profa. Dra. Janaina Aparecida Simplicio

Instituição: Faculdade Anhanguera de Campinas, FAC

Profa. Dra. Silvia Graciela Runginsk Leitão

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **JANAINA APARECIDA SIMPLICIO, Usuário Externo**, em 29/07/2020, às 15:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla Speroni Ceron, Professor do Magistério Superior**, em 29/07/2020, às 15:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Graciela Runginsk Leitão, Professor do Magistério Superior**, em 29/07/2020, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal- mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0350847** e o código CRC **3D9B38D0**.

Folha de Aprovação PPGCF 0350847 SEI 23087.009655/2020-98 /

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que está sempre presente me fortalecendo e capacitando em cada momento.

Ao meu pai João, minha mãe Lucinéia e minha irmã Débora pelo apoio e amor incondicional. Sem vocês nada disso seria realidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me fortalecer ao longo dessa caminhada.

À minha família por estar presente em cada momento me dando força e me amando incondicionalmente.

Aos meus amigos da Igreja Batista Ágape pelo carinho e por cada oração.

Aos meus padrinhos Marcos e Dani pelo apoio e a linda Sophia por todo carinho.

À minha querida amiga Bianca por sempre me ouvir e estar comigo em todos os momentos, torcendo sempre por mim.

As minhas amigas Ananda e Jéssica, companheiras de graduação e que continuaram comigo no mestrado. Ao qual trilhamos juntos esse caminho da pesquisa, enfrentando cada obstáculo. Com vocês, tudo se torna mais fácil.

À minha amiga Marília, por sempre estar perto, mesmo distante.

À Marilene e Sônia por torcerem e me apoiarem sempre, vocês foram um presente que a pós me deu.

Aos meus companheiros Antônio, Bruna, Carol, Gabriel, Jéssyca, Karina, Renata e Talita (LAFEC) por estarem comigo todos os dias me permitindo aprender sempre mais, auxiliando e dando suporte para que tudo isso fosse realizado. E pelas boas risadas entre um café e outro.

À Universidade Federal de Alfenas, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por me proporcionar as ferramentas necessárias para que essa etapa fosse concluída.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (Capes -001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para a realização da pesquisa.

À minha orientadora Prof. Dr. Carla Speroni Ceron que me ensinou o que é ser mestre e a amar cada dia mais a pesquisa. Por ser meu suporte e por toda confiança depositada ao longo dessa caminhada.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Marcos Vinicius Salles Dias por cada ensinamento e por acreditar em mim.

À Prof. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula, pelo companheirismo sempre e ajuda nos ensaios bioquímicos.

À Profa. Dra. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira, ao Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza e ao Prof. Dr. Alexandre Guisti-Paiva por toda colaboração.

À Prof. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão, pela colaboração e ajuda nos ensaios de corticosterona.

À Prof. Dra. Larissa Helena Torres por toda ajuda e por estar sempre pronta a auxiliar em cada etapa desse projeto.

À Profa. Nelma de Mello Silva Oliveira (UNIFENAS-MG) que gentilmente nos doou os grãos de quefir.

À Prof. Dr. Marcia Helena Cardoso por ter despertado o meu amor pela farmacologia.

E a todos aqueles que aqui não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para que este projeto fosse concretizado, meu muito obrigada.

“Grandes coisas fez o Senhor por nós, e por isso estamos alegres”

(Salmos 126:3)

## RESUMO

O estresse crônico afeta milhares de pessoas no mundo e traz consigo alterações que podem desencadear uma série de doenças, diminuindo a qualidade de vida. Em situações de estresse ocorre a ativação direta do eixo hipotálamo-hipófise, que libera os glicocorticoides, responsável pelo aumento de estresse oxidativo e desenvolvimento de doenças crônicas. Por outro lado, vários estudos têm demonstrado o quefir como um produto promissor na prevenção de danos oxidativos e redução da ansiedade. O objetivo desse trabalho foi avaliar os danos oxidativos causados pelo estresse crônico imprevisível e verificar se o tratamento com quefir iria prevenir os mesmos. Para isso, camundongos Swiss foram divididos em 4 grupos (controle leite, controle quefir, estresse leite e estresse quefir). Os animais dos grupos estresse, foram submetidos a indução de estresse crônico imprevisível por 20 dias. Tanto animais controle quanto estresse foram tratados com quefir por 30 dias (10 antes do início da indução do estresse e durante o protocolo de indução). O peso dos animais foi monitorado durante todo o protocolo. Ao final do protocolo experimental, foram realizado o teste comportamental de labirinto em cruz elevado. Após a eutanásia dos animais, o sangue, o coração e os rins foram coletados para as seguintes análises bioquímicas: níveis de corticosterona, avaliação da função renal, níveis renais e cardíacos de estresse oxidativo (atividade de superóxido dismutase (SOD), catalase e níveis de glutathiona (GSH), determinação de peroxidação lipídica (TBARS) e imunistoquímica para 3-nitrotirosina e determinação de metaloproteinase-2 (MMP-2) por zimografia e imunistoquímica). Os procedimentos foram aprovados pelo CEUA/UNIFAL (61/2018). Análise estatística: ANOVA *two way*, seguido por teste *post-hoc Sidak's* ( $p < 0.05$ ). Observou-se alteração do peso corporal dos animais submetidos ao estresse ( $p < 0.05$ ) com 10 dias de protocolo, porém não houve diferenças significativas com 20 dias de protocolo ( $p > 0.05$ ). Além disso, houveram alterações nos testes comportamentais no sentido de um aumento do comportamento do tipo ansioso, bem como dos níveis de corticosterona ( $p < 0.05$ ) nos animais submetidos ao estresse crônico e o quefir foi capaz de atenuar esse comportamento ( $p < 0.05$ ). Não foram observadas diferenças significativas na avaliação renal entre os grupos ( $p > 0.05$ ). Porém o quefir por si só levou a uma diminuição significativa dos níveis de creatinina ( $p < 0.05$ ). Além disso, não foram

observadas alterações nos níveis renais e cardíacos de GSH e TBARS, nem na atividade de SOD e CAT ( $p>0.05$ ). No entanto, houve aumento da atividade das enzimas SOD e CAT nos animais que consumiram quefir e foram submetidos ao estresse em ambos os tecidos ( $p<0.05$ ). Não foram observadas alterações nos níveis de 3 nitrotirosina e MMP-2, no tecido cardíaco ( $p>0.05$ ). Já no tecido renal foi demonstrado um aumento nos níveis de 3-nitrotirosina e MMP-2 nos animais que foram submetidos ao estresse em relação aos grupos controles ( $p<0.05$ ) e o tratamento com o quefir foi capaz de reverter apenas os níveis de MMP-2 ( $p<0.05$ ). Portanto, nosso estudo sugere que o quefir tem propriedades ansiolíticas capazes de reverter os efeitos do estresse crônico imprevisível, além de atuar em enzimas antioxidantes regulando seus níveis ou diminuindo a produção de radicais livres.

Palavras chaves: Quefir. Estresse oxidativo. Estresse fisiológico

## ABSTRACT

Chronic stress affects thousands of people worldwide and brings with it changes that can trigger a series of diseases, reducing the quality of life. In stressful situations there is a direct activation of the hypothalamus-pituitary axis, which releases glucocorticoids, responsible for the increase in oxidative stress and the development of chronic diseases. On the other hand, several studies have shown kefir as a promising product in preventing oxidative damage and reducing anxiety. The aim of this study was to assess oxidative damage caused by unpredictable chronic stress and to verify whether treatment with kefir would prevent them. For this, Swiss mice were divided into 4 groups (milk control, kefir control, milk stress and kefir stress). The animals in the stress groups were subjected to unpredictable chronic stress induction for 20 days. Both control and stress animals were treated with kefir for 30 days (10 before the start of stress induction and during the induction protocol). The animals' weight was monitored throughout the protocol. At the end of the experimental protocol, the elevated plus-maze behavioral test was performed. After euthanizing the animals, blood, heart and kidneys were collected for the following biochemical analyzes: corticosterone levels, renal function assessment, renal and cardiac oxidative stress levels (superoxide dismutase (SOD) activity, catalase and levels glutathione (GSH), determination of lipid peroxidation (TBARS) and immunohistochemistry for 3-nitrotyrosine and determination of metalloproteinase-2 (MMP-2) by zymography and immunohistochemistry). The procedures were approved by CEUA / UNIFAL (61/2018). Statistical analysis: ANOVA two way, followed by Sidak's post-hoc test ( $p < 0.05$ ). There was a change in body weight of animals submitted to stress ( $p < 0.05$ ) with 10 days of protocol, but there were no significant differences with 20 days of protocol ( $p > 0.05$ ). In addition, there were changes in behavioral tests towards an increase in anxious behavior, as well as in corticosterone levels ( $p < 0.05$ ) in animals subjected to chronic stress and kefir was able to attenuate this behavior ( $p < 0.05$ ). There were no significant differences in renal assessment between groups ( $p > 0.05$ ). However, kefir alone led to a significant decrease in creatinine levels ( $p < 0.05$ ). In addition, there were no changes in the renal and cardiac levels of GSH and TBARS, nor in the activity of SOD and CAT ( $p > 0.05$ ). However, there was an increase in the activity of the SOD

and CAT enzymes in animals that consumed kefir and were subjected to stress in both tissues ( $p < 0.05$ ). There were no changes in the levels of nitrotyrosine and MMP-2 in the cardiac tissue ( $p > 0.05$ ). In the renal tissue, an increase in the levels of 3-nitrotyrosine and MMP-2 was demonstrated in the animals that were submitted to stress in relation to the control groups ( $p < 0.05$ ) and the treatment with the kefir was able to revert only the levels of MMP -2 ( $p < 0.05$ ). Therefore, our study suggests that kefir has anxiolytic properties capable of reversing the effects of unpredictable chronic stress, in addition to acting on antioxidant enzymes regulating its levels or decreasing the production of free radicals.

Key words: Kefir. Oxidative stress. Physiological stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental.....	30
Figura 2 - Fórmula para determinação da Atividade de SOD.....	35
Figura 3 - Delta do peso corporal (em gramas).....	39
Figura 4 - Porcentagem de permanência dos animais nos braços abertos.....	40
Figura 5 - Porcentagem de <i>grooming</i> .....	41
Figura 6 - Porcentagem de <i>head dipping</i> .....	42
Figura 7- Níveis de corticosterona.....	43
Figura 8 - Níveis de ureia no plasma (mg/dL).....	44
Figura 9 - Níveis de creatinina no plasma (mg/dL).....	45
Figura 10 - Efeito do estresse sobre a produção de TBARS em tecido cardíaco e renal.....	46
Figura 11 - Atividade da SOD no tecido cardíaco e renal.....	47
Figura 12 - Atividade da CAT no tecido cardíaco e renal.....	48
Figura 13 - Níveis de GSH no tecido cardíaco e renal.....	49
Figura 14 - Expressão de MMP-2 no tecido cardíaco.....	50
Figura 15 - Expressão de MMP-2 no tecido renal.....	51
Figura 16 - Imuno-histoquímica dos níveis de MMP-2 no coração.....	53
Figura 17 - Imuno-histoquímica dos níveis de MMP-2 no rim.....	54
Figura 18 - Imuno-histoquímica dos níveis de 3-nitrotirosina no coração.....	55
Figura 19 - Imuno-histoquímica dos níveis de 3-nitrotirosina no coração.....	56

## LISTA DE TABELAS

Quadro 1- Sequência do procedimento de estresse variável crônico. Adaptado de <i>LEPSCH et al.</i> , 2005 e <i>SIMAS et al.</i> , 2018.....	30
Tabela 2 - Análise de variância de duas vias do delta do peso corporal com 10 dias de estresse.....	39
Tabela 3 - Análise de variância de duas vias do delta do peso corporal com 20 dias de estresse.....	40
Tabela 4 - Análise de variância de duas vias de permanência nos braços abertos.....	40
Tabela 5 - Análise de variância de duas vias da porcentagem de <i>grooming</i> .....	41
Tabela 6 - Análise de variância de duas vias da porcentagem de <i>head dipping</i> .....	42
Tabela 7- Análise de variância de duas vias dos níveis de corticosterona.....	43
Tabela 8 - Análise de variância de duas vias dos níveis de ureia no plasma de camundongos .....	44
Tabela 9 - Análise de variância de duas vias dos níveis de creatinina de no plasma de camundongos.....	45
Tabela 10 - Análise de variância de duas vias da peroxidação lipídica pela determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido cardíaco.....	46
Tabela 11 - Análise de variância de duas vias da peroxidação lipídica pela de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido renal.....	46
Tabela 12 - Análise de variância de duas vias da atividade de SOD no tecido cardíaco.....	47
Tabela 13 - Análise de variância de duas vias da atividade de SOD no tecido Renal.....	47

Tabela 14 - Análise de variância de duas vias da atividade de CAT no tecido cardíaco.....	48
Tabela 15 - Análise de variância de duas vias da atividade de CAT no tecido renal.....	48
Tabela 16 - Análise de variância de duas vias dos níveis de GSH no tecido cardíaco.....	49
Tabela 17 - Análise de variância de duas vias dos níveis de GSH no tecido renal.....	49
Tabela 18 - Análise de variância de duas vias da banda pertencente a MMP-2 no coração.....	50
Tabela 19 - Análise de variância de duas vias da banda pertencente a MMP-2 no rim.....	51
Tabela 20 - Análise de variância de duas vias da imunistoquímica de MMP-2 no coração.....	57
Tabela 21 - Análise de variância de duas vias da imunistoquímica de MMP-2 no rim.....	57
Tabela 22 - Análise de variância de duas vias da imunistoquímica de 3-nitrotirosina no coração.....	57
Tabela 23 - Análise de variância de duas vias da imunistoquímica de 3-nitrotirosina no rim.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Adrenocorticotrófico
CAT	Catalase
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de carbono
CL	Controle leite
CQ	Controle quefir
CRH	Corticotrofina
DAB	Diaminobenzidina
EL	Estresse leite
EQ	Estresse quefir
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathiona peroxidase
GSSG	Dímero dissulfido oxidado
GSH	Glutathiona
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
MDA	Malonaldeído
MMPs	Metaloproteinases
MMP2	Metaloproteinase-2
NO -	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Radical peroxinitrito
PVN	Núcleo paraventricular hipotalâmico
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b> .....	18
2.1	EPIDEMIOLOGIA .....	18
2.2	ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS.....	19
2.3	ESTRESSE NO SISTEMA CARDIOVASCULAR E RENAL.....	20
2.4	ESTRESSE E DANO OXIDATIVO.....	22
2.5	QUEFIR .....	23
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	26
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
4.1	OBJETIVO GERAL.....	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
5.1	PREPARO DO QUEFIR.....	28
5.2	ANIMAIS .....	28
5.3	INDUÇÃO DO ESTRESSE CRÔNICO .....	29
5.4	EVOLUÇÃO PONDERAL DOS CAMUNDONGOS .....	31
5.5	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	31
5.6	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CORTICOSTERONA.....	32
5.7	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL .....	32
5.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA .....	33
5.9	AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	33
5.10	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TECIDUAL SOD.....	34
5.11	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TECIDUAL DE CAT .....	35
5.12	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GSH.....	35
5.13	ZIMOGRAFIA.....	36
5.14	IMUNOISTOQUÍMICA PARA MMP-2 E 3-NITROTIROSINA.....	37
5.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	39
6.1	EVOLUÇÃO PONDERAL DOS CAMUNDONGOS.....	39
6.2	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL .....	40

6.3	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CORTICOSTERONA .....	42
6.4	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL .....	43
<b>6.4.1</b>	<b>Ureia.....</b>	<b>43</b>
<b>6.4.2</b>	<b>Creatinina.....</b>	<b>44</b>
6.5	AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	45
6.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TECIDUAL DE SOD .....	46
6.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TECIDUAL DE CAT .....	47
6.8	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS TECIDUAIS DE GSH .....	49
6.9	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MMP-2 NO CORAÇÃO .....	49
6.10	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MMP-2 NO RIM .....	50
6.11	IMUNOISTOQUÍMICA PARA MMP-2 E 3-NITROTIROSINA .....	51
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>76</b>

## 1 Introdução

O estresse é caracterizado pela reação do organismo frente a uma situação ameaçadora e tem seus efeitos relacionados ao aparecimento de doenças, pois altera a homeostasia (SANTOS, 2013; ATWOLI et al., 2015; LAGRAAUW, 2015; OSMONOVIC-THUNSTRÖM et al., 2015). A resposta do estresse é ativada principalmente pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), que, por uma cascata de reações, libera os glicocorticoides, os principais hormônios do estresse. A exposição constante a situações estressantes leva a uma não adaptação do organismo, desenvolvendo assim danos à saúde (MARIN et al., 2007; SANTOS, 2013; HERMAN et al., 2016).

Além disso, estudos associam o estresse crônico com o surgimento de alterações cardiovasculares. Isso decorre principalmente das alterações causadas nos vasos pela ativação do sistema nervoso simpático, como aumento da frequência cardíaca, vasoconstrição periférica, aumento do estresse oxidativo e consequente aceleração dos processos de formação de placas ateroscleróticas (LOGAN, 2008; CRUZ et al., 2012; STEPTOE, 2012; LAGRAAUW, 2015;).

O quefir é uma mistura probiótica que apresenta vários benefícios a saúde. Essa substância possui altos níveis de triptofano, que é o precursor de serotonina, e, por isso, pode estar intimamente ligado a melhoras dos sintomas do estresse. (NOORI et al., 2014; PUNARO et al., 2014; RODRIGUES, 2016; ROSA et al., 2017). Alimentos funcionais como o quefir podem contribuir de forma significativa em diferentes doenças, e sua ação tem sido associada a diminuição de estresse oxidativo (LEITE et al., 2013; BRASIL et al., 2018; PIMENTA et al., 2018).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os possíveis danos oxidativos e comportamentais causados pelo estresse crônico imprevisível, e se o tratamento com o quefir iria prevenir os mesmos. Para isso, foi avaliado o comportamento ansioso dos animais, as concentrações de corticosterona, a avaliação da função renal, bem como do estresse oxidativo.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Epidemiologia

O estresse pode ser definido como processo pelo qual o organismo reage à ameaça ou estressor por mudanças fisiológicas e comportamentais, tentando retornar a homeostasia, sendo uma resposta necessária para a manutenção da vida. Para tal, ele provoca uma série de alterações comportamentais e metabólicas, reguladas principalmente pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (SANTOS, 2013; RAMBO et al., 2017). Os efeitos do estresse na sociedade atual têm sido de grande relevância, visto que as alterações causadas por ele estão envolvidas no aparecimento de doenças relacionadas ao sistema nervoso central (SNC) e ao sistema cardiovascular; afetando assim uma série de funções fisiológicas (MARCON et al., 2016; RAMBO et al., 2017). Além disso, as doenças cardiovasculares decorrentes de estresse crônico e agudo são uma das principais causas de morte no mundo, caracterizando um importante problema de saúde pública (LAGRAAUW, 2015).

Estudos mostram que pessoas idosas estão mais susceptíveis a condições estressantes, bem como aos problemas gerados por essas situações. Isso decorre de vários fatores, como solidão, luto, problemas financeiros e deterioração da própria saúde. Além disso, o declínio cognitivo que se inicia por volta da meia idade leva a uma queda de neurotransmissores como dopamina e serotonina, que estão intimamente associados a sensação de bem-estar (SALTHOUSE, 2009; OSMONOVIC-THUNSTRÖM et al., 2015).

Além disso, observa-se o crescimento do estresse pós-traumático, que antigamente tinha uma maior prevalência nos países de alta renda, mas que hoje está presente nos países de baixa e média renda. Esses traumas são causados, principalmente, por uma morte inesperada ou algum ato de atrocidade, e também estão relacionados com as condições sociodemográficas de cada região. O país com maior prevalência do evento traumático é o Sul Africano e o de menor prevalência é a Espanha (CARMASSI et al., 2014; ATWOLI et al., 2015).

Situações de estresse recorrentes levam a uma baixa qualidade de vida e ao aumento do uso de serviços de saúde, devido agravamento e/ou surgimento de doenças secundárias (CARMASSI et al., 2014; ATWOLI et al., 2015).

## 2.2 Alterações fisiológicas

As alterações causadas pelo estresse podem alcançar a estabilidade por uma resposta de adaptação da produção de vários mediadores, como esteroides adrenais, catecolaminas e citocinas, resposta está conhecida como alostase. Quando a resposta é eficiente, o organismo protege-se contra danos. Porém, em casos de respostas prolongadas, inadequadas ou superestimuladas, a carga alostática resulta em um erro na adaptação e danos em vários órgãos, desenvolvendo-se o processo patológico (PACÁK et al., 2001; HERMAN et al., 2016).

A resposta ao estresse é modulada por um mecanismo neuroimunoendócrino, tendo como seus centros de controle o sistema límbico, componentes endócrinos como o eixo HPA e catecolaminas. Dessa maneira, há aumento da oferta de energia ao organismo, obtido principalmente pelo aumento da gliconeogênese e glicogenólise. Como conseguinte, temos a mobilização da glicose para uso nos locais estratégicos de resposta, como o sistema músculo-esquelético (PACÁK et al., 2001; LIMA, 2014).

Quando o eixo HPA é ativado, há secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que por sua vez, induz a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela adeno-hipófise. Na adrenal, o ACTH atua nos receptores de melanocortina-2, produzindo um aumento de adenilato ciclase, o que provoca uma amplificação na biossíntese de colesterol, o precursor dos glicocorticoides (PACÁK et al., 2001; LIMA, 2014).

Os glicocorticoides têm ação ampla, influenciando o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, promovendo vasoconstrição e atuando como anti-inflamatórios. Desta maneira, preparam o organismo para possíveis situações de enfrentamento, sendo considerados como os principais hormônios do estresse (PACÁK et al., 2001; MARIN et al., 2007; CRUZ et al., 2012; SANTOS, 2013; LIMA,

2014; HERMAN et al., 2016). Entretanto, é importante salientar que, no estresse agudo ou de curto prazo, têm-se uma resposta mais intensa com grande quantidade de catecolaminas e citocinas. O estresse crônico, por sua vez, apresenta uma supressão da hipersensibilidade do tipo retardado, suprimindo a resposta inicial do estresse. Assim, observa-se uma habituação da resposta e atuação principalmente dos glicocorticoides (MCEWEN, 2000; LIMA, 2014).

São os glicocorticoides que também estimulam o sistema nervoso simpático a secretar uma maior quantidade de catecolaminas da medula adrenal. Essa liberação acentuada é responsável pelo aumento do metabolismo, alteração da função cardiovascular (aumentando o débito e frequência cardíaca e vasoconstrição periférica), aumento da frequência respiratória e dilatação das vias aéreas, regulação da temperatura corporal e migração de linfócitos (CRUZ, 2008; LIMA, 2014).

As respostas ao estresse são reguladas de acordo com o agente estressante e o tempo de duração do estímulo, gerando assim diferentes níveis de respostas. Geralmente, estressores relacionados a homeostasia agem diretamente no Núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN), enquanto, aqueles provocados por estímulos psicológicos envolvem uma ou mais estruturas límbicas. Em situações crônicas, tem-se a alteração de vários parâmetros no hipocampo, como volume e excitabilidade celular, que podem gerar ansiedade e comportamentos depressivos (HERMAN et al., 2016; MEHTA et al., 2017).

### 2.3 Estresse no sistema cardiovascular e renal

Exposições constantes a situações estressantes podem gerar distúrbios metabólicos relacionados ao sistema cardiovascular e renal, ocasionados, principalmente, pelos glicocorticoides. Estudos recentes mostram o estresse como fator de riscos para desenvolvimento e agravamento dessas doenças (MARIN et al., 2007; CRUZ et al., 2012; RODRIGUEZ et al., 2012; STEPTOE et al., 2012; MILIK et al., 2016).

Segundo Lagrauw et al. (2015), a exposição ao estresse ativa regiões específicas do SNC que levam a ativação do eixo HPA e do sistema simpático, o que pode ocasionar disfunção endotelial, que é considerada o primeiro gatilho para o desenvolvimento de arteriosclerose. Isso se dá pelo aumento de moléculas de adesão que medeiam o recrutamento de células inflamatórias, formando, assim, a placa aterosclerótica, ou acelerando esse processo. Ocorre, também, em decorrência da ativação do sistema nervoso simpático, a elevação dos níveis de adrenalina e noradrenalina, o aumento da frequência cardíaca e vasoconstrição periférica, levando a um aumento da pressão arterial e redução da sensibilidade a insulina, fatores que também favorecem o aumento de placas ateroscleróticas e a rigidez de grandes artérias (LOGAN, 2008; STEPTOE et al., 2012).

Salienta-se ainda que o estresse afeta a regulação dos receptores da angiotensina II, principalmente o receptor AT1, aumentando sua expressão. O sistema renina-angiotensina atua principalmente no controle da pressão arterial, bem como nos túbulos e glomérulos renais, promovendo vasoconstrição renal e retenção de sódio. A regulação positiva desse receptor pode potencializar efeitos negativos da angiotensina II e, com isso, alterações significativas nas regulações neuroendócrinas e cardiovasculares, o que também auxilia no desenvolvimento de placas ateroscleróticas, hipertensão e resistência à insulina (RODRIGUEZ et al., 2012; MILIK et al., 2016).

Em situações de estresse, as células do corpo precisam utilizar muita energia para tentar restabelecer as condições fisiológicas, e o aumento da taxa metabólica causa superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO causam danos oxidativos em vários tecidos (SAHIN et al., 2007; VALKO et al., 2007) e têm sido associadas ao desenvolvimento de distúrbios como a doença renal crônica, a hipercolesterolemia, o diabetes e a hipertensão (DHALLA et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2010; RAVAROTTO et al., 2018).

Além disso, as ERO ativam enzimas conhecidas como metaloproteinases (MMPs). As MMPs, são um conjunto de endopeptidases dependentes de cálcio e que contém zinco, que degradam vários componentes da matriz extracelular (HU et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2010). Elas contêm um pró-peptídeo inibitório, que se liga ao sítio catalítico por uma ligação sulfidrila. Para que ocorra sua ação é necessário a remoção do domínio pró-peptídeo por outras proteases, como plasmina ou outras

MMPs, ou por ERO, como o radical peroxinitrito (HU et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2010).

As MMPs são classificadas de acordo com seu domínio e organização estrutural. Entre essas classes, podemos citar, as collagenases, as gelatinases, as estromelisinases, as matrilisinas e as MMP ligadas à membrana. As MMPs de maior interesse nas doenças cardiovasculares e renais são a MMP-2 e a MMP-9 (gelatinases). A MMP-2 é considerada constitutiva enquanto a MMP-9 é induzida, principalmente, por processos inflamatórios. Elas degradam em grande parte o colágeno desnaturado e o colágeno tipo IV. Os níveis dessas MMPs, são baixos em tecidos saudáveis, entretanto sua expressão aumenta em diversas doenças, tendo assim, um papel crucial no desenvolvimento e agravamento das doenças relacionadas ao sistema cardiovascular e renal (PEREIRA et al., 2006; HU et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2010).

#### 2.4 Estresse e dano oxidativo

O dano oxidativo desempenha papel crucial nas complicações decorrentes do estresse. Ele é caracterizado por uma diminuição da defesa antioxidante e/ou aumento dos níveis de ERO. Esse desequilíbrio ocorre devido ao aumento da taxa metabólica, o que leva a um aumento da produção de radicais livres. A alteração da taxa metabólica pode gerar também o desenvolvimento da síndrome metabólica, sendo que, o estresse oxidativo pode provocar tanto alterações da função renal, como também alterações da morfometria do tecido (MEHTE et al., 2017, SAMARGHANDIAN et al., 2017; SÁNCHEZ-SOLÍS et al., 2018).

As principais ERO são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $-OH$ ). O radical peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) é o produto da reação do  $O_2^-$  com o óxido nítrico (NO) e o aumento da sua produção gera peroxidação lipídica e nitração de proteínas (GRIENGLING et al., 2000). Dentre os marcadores usados para avaliar as lesões oxidativas temos o malonaldeído (MDA), que é um dos principais compostos produzidos durante a peroxidação lipídica (CARVALHO, 2012),

e a 3-nitrotirosina, que é originada através da reação do peroxinitrito com os resíduos de tirosina das proteínas (LIU, 2010).

Em modelos de estresse crônico, o aumento de estresse oxidativo também pode decorrer da diminuição da ação das enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona (GSH) (SAHIN et al., 2007; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2016).

A GSH é um tripeptídeo e representa o mais proeminente tiol de baixo peso molecular presente nas células. Ela participa na detoxificação celular de ERO por mecanismo catalisado pela glutathiona peroxidase (GPx). A GPx atua reduzindo o  $H_2O_2$  pela oxidação de GSH ao dímero dissulfido oxidado (GSSG). A enzima glutathiona redutase, recicla GSSG a GSH, complementando esse processo. Em condições de estresse oxidativo, a GSSG é exportada da célula por proteínas transportadoras dependentes de trifosfato de adenosina, para manter o balanço redox, o que implica que em condições severas de estresse oxidativo ocorre a depleção dos níveis de GSH (CNUBBEN et al., 2001).

A enzima SOD age sobre o  $O_2^-$ , realizando a reação de dismutação, no qual ele é convertido em  $H_2O_2$  e oxigênio. É considerada, a primeira linha de defesa do organismo e se apresenta em três isoformas, sendo todas ligadas a um metal de transição. A CAT, por sua vez, é uma enzima que decompõe o  $H_2O_2$  em água, agindo diretamente nos radicais peróxidos que são formados pela ação da SOD. Ela é uma enzima intracelular (heme proteína) e está localizada principalmente nos peroxissomas celulares (JASCOLKA, 2010).

## 2.5 Quefir

O quefir é uma mistura probiótica originada das montanhas caucasianas da Rússia. Os compostos probióticos são biomoduladores constituídos de bactérias vivas e outros microrganismos, ou seja, substâncias fermentadas e que, quando administradas regularmente, podem auxiliar no tratamento e prevenção de diversas doenças. O quefir é levemente ácido e alcoólico e pode ser cultivado em açúcar mascavo, leite ou suco de frutas (MOREIRA et al., 2008; RODRIGUES, 2016; PIMENTA et al., 2018). Sua atividade está relacionada ao composto bioativo “kefirano”

ou “quefirano”. Esse composto bioativo é produzido por diversas bactérias presentes no quefir como *Lactobacillus Kefirano faciens*, *L. Kefirgranum*, *L. parakefir*, *L. Kefir* e *L. delbrueckii* (RODRIGUES, 2016; ROSA et al., 2017; PIMENTA et al., 2018).

Sabe-se que, o quefir apresenta um alto nível de triptofano, e que o triptofano pode ser convertido em serotonina e melatonina, o que pode melhorar os quadros de ansiedade e depressão, visto que a maioria dos tratamentos usuais tem sua ação na regulação da produção ou no aumento da recaptação de serotonina (NEUMEISTER, 2002; MOREIRA et al., 2008; NOORI et al., 2014). Noori et al. (2014) observaram que o Quefir foi capaz de reduzir a depressão, ansiedade e melhorar o déficit cognitivo em modelo experimental de ratos com crise de abstinência por nicotina, sugerindo que esse probiótico pode ser usado como terapia adjuvante da dependência a nicotina.

Além disso, estudos vêm demonstrando uma íntima ligação entre cérebro e o intestino, sendo conhecido como eixo cérebro-intestino. Esse eixo é responsável por integrar os centros cerebrais de controle cognitivo e emocional com os gânglios do sistema nervoso entérico. Assim, o microbioma intestinal pode exercer influência no trato gastrointestinal, bem como na modulação da resposta imune, nos circuitos de inflamação e na sinalização neuroendócrina (MÖRKL et al., 2018; ZORZO, 2020).

Estudos mostram que o estresse pode ser associado a alterações populacionais da microbiota intestinal, sendo essa alteração decorrente da resposta do sistema nervoso simpático e adrenérgico durante a exposição ao estresse (FOSTER et al., 2013; LIU et al., 2015). A desregulação do ecossistema normal do intestino causada por um agente estressor ou por má alimentação pode acarretar várias doenças, como depressão e ansiedade. A microbiota intestinal desregulada gera um aumento da permeabilidade da mucosa intestinal e, com isso, o aumento da resposta imune e neuroinflamação crônica, que está associada ao desenvolvimento de doenças mentais. Isso acontece devido a produção de citocinas nas regiões cerebrais, influenciando a síntese, liberação e recaptação de neurotransmissores (MÖRKL et al., 2018; ZORZO, 2020).

Diante disso, estudos utilizando probióticos têm sido promissores no tratamento de distúrbios como depressão e ansiedade, pois os mesmos, agem melhorando o microbioma intestinal alterado e causam uma diminuição da neuroinflamação (LIU et al., 2015). Ainda, a melhora dessas doenças decorre dos subprodutos originados

pelos microrganismos presentes e que têm atuação no metabolismo da serotonina (FOSTER et al., 2013; VEDOVATO et al., 2014; LIU et al., 2015; LUNA et al., 2015; O'MAHONY et al., 2015; MÖRKL et al., 2018; ZORZO, 2020).

Pacientes com doenças cardiovasculares e cardiometabólicas, como hipertensão, disfunção endotelial e resistência à insulina, que consumiram quefir, mostraram melhora no recrutamento de células progenitoras endoteliais, equilíbrio do sistema nervoso simpático e diminuição de ERO. Isso acarreta numa diminuição da pressão arterial, bem como um aumento da vasodilatação e da oxidação de ácidos graxos (PIMENTA et al., 2018).

Punaro et al. (2014) observaram uma redução de lesões renais em ratos diabéticos que tiveram o quefir incorporado na sua dieta. Houve melhora no controle glicêmico, redução de poliúria, polidipsia e polifagia, melhora parcial da função renal, aumento da excreção de NO e redução de  $O_2^-$  e inflamação. Trabalhos anteriores também mostram que o tratamento com o probiótico reduziu o estresse oxidativo e o número de complicações associadas ao diabetes (TABUCHI et al., 2003; MAEDA et al., 2004; YADAV et al., 2008). Ainda, em modelo de úlcera gástrica induzida em ratos, o tratamento com quefir foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica e os níveis de MMP-2 e MMP-9, com melhora da lesão ulcerosa nesses animais (FAHMY et al., 2015). Em outro estudo, Rodrigues et al. (2016) encontraram efeito anti-inflamatório e antiulcerogênico de produtos de fermentação do quefir.

### **3 Justificativa**

Sabe-se que o estresse pode levar a aumento de danos oxidativos em diversos órgãos, como coração e rins. O consumo de quefir tem sido associado a efeitos ansiolítico e antidepressivo, devido aos elevados níveis de triptofano presentes na sua composição. Além disso, o uso de quefir pode promover uma melhora no desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes em diferentes doenças. No entanto, faltam estudos que avaliem se o quefir pode melhorar as alterações cardiovasculares e renais observadas em modelos de estresse crônico.

Com base nas informações acima, a hipótese desse projeto é que o tratamento de animais com quefir possa prevenir as alterações cardiovasculares e renais e a ansiedade causadas por modelo de estresse crônico imprevisível em camundongos.

## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar os possíveis danos oxidativos causados pelo estresse crônico imprevisível em órgãos como coração e rim, e verificar se o tratamento com quefir pode prevenir os mesmos.

### 4.2 Objetivos específicos

Avaliar, em camundongos submetidos a modelo de estresse crônico, os efeitos do tratamento com quefir sobre:

- a) o comportamento ansioso;
- b) as concentrações plasmáticas de corticosterona;
- c) a função renal;
- d) o estresse oxidativo tecidual e atividade da SOD e CAT
- e) o estresse oxidativo tecidual e níveis de GSH;
- f) os níveis de MMP-2 e 3-nitrotirosina.

## 5 Materiais e métodos

### 5.1 Preparo do quefir

Para o preparo do quefir, foram utilizados grãos de quefir gentilmente doados pela Universidade José do Rosário Velano (UNIFENAS-MG). A composição microbiológica desses grãos foi previamente determinada (BERGMANN et al., 2010). Ele apresenta o seguinte perfil microbiano: *Leuconostocs* sp., *Lactobacillus lactiscremoris*, *Chyseomonas luteola*, *Acetobacter*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida colliculosa*, *Toruspoladel bruechii*, *Candida inconspicua*, *Candida magnoliae*, *Kloekera* sp., *Candida famata*, *Kluyveromices lactis*, and *Kluyveromices marxianus*, *Candida kefir*. A contagem total de *Lactobacillus* do grão do quefir foi de  $8,5 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>, enquanto na suspensão de quefir foi de  $4,5 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>.

O quefir foi obtido pela fermentação dos grãos em leite tipo C na concentração de 4% p/v em um recipiente de vidro limpo. A mistura ficou em repouso por 24 horas à temperatura ambiente para fermentação dos grãos em recipiente não hermeticamente fechado. O líquido fermentado foi administrado por gavagem na dose de 0,3 mL/100g/dia, sempre no mesmo horário (BRASIL et al., 2018; BARBOZA, 2018). Os controles receberam apenas leite tipo C, em mesmo volume/dose.

### 5.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss (40g), provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em biotério setorial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em caixas de polietileno, onde receberam água e ração comercial *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram submetidos à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFAL (registro nº 61/2018) (Anexo).

### 5.3 Indução do estresse crônico

O estresse crônico imprevisível foi induzido seguindo modelo estabelecido na literatura (LEPSCH et al., 2005; CRUZ et al., 2008; CEZÁRIO, 2012). Esse modelo constitui em expor o animal a diferentes condições de estresse como imobilização, nado forçado, privação de água e comida e inversão do ciclo claro/escuro em horários variados por 10 dias, como pode ser observado na Tabela 1. Após esses 10 dias, uma nova rodada do protocolo foi realizada (dias 11 a 20) para que os animais fossem submetidos a 20 dias de estresse (Figura 1). Após 24h do final do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao ensaio comportamental de Labirinto em Cruz elevado. Após o teste, os animais foram eutanasiados, coletando-se o sangue, coração (ventrículos) e rins (córtex) dos mesmos. A repetição do protocolo de estresse crônico variável para aumentar o tempo de exposição ao estresse seguiu metodologia desenvolvida anteriormente para roedores (SIMAS et al., 2018).

Para o desenvolvimento dos experimentos, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, contendo 15 animais em cada grupo:

- a) CONTROLE+LEITE (CL): animais não submetidos ao estresse, tratados com leite;
- b) ESTRESSE+LEITE(EL): animais submetidos ao estresse, tratados com leite;
- c) CONTROLE+QUEFIR (CQ): animais não submetidos ao estresse, tratados com quefir;
- d) ESTRESSE+QUEFIR (EQ): animais submetidos ao estresse, tratados com quefir.

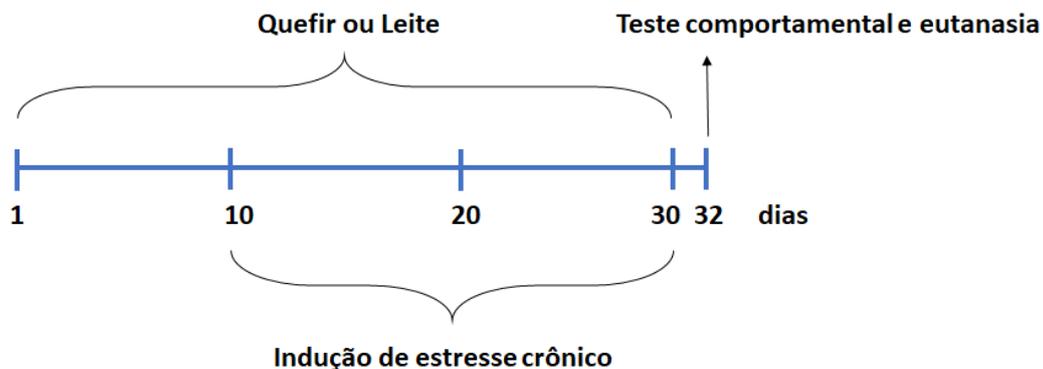
Quadro 1- Sequência do procedimento de estresse variável crônico

Dia	Horário	Procedimento	Duração	Horário	Procedimento	Duração
1	09h00	Imobilização	1h	19h00	Serragem úmida	overnight
2	14h00	Isolamento no frio	1h	19h00	Luzes acesas	overnight
3	12h00	Luzes apagadas	3h	15h00	Nado forçado	6 min
4	08h00	Serragem úmida	10h	19h00	Privação de água e comida	overnight
5	13h00	Nado forçado	6min	19h00	Isolamento	overnight
6	14h00	Isolamento no frio	15min	15h00	Luzes apagadas	2h
7	07h00	Serragem úmida	12h	19h00	Luzes acesas	overnight
8	19h00	Isolamento	overnight	19h00	Privação de água e comida	overnight
9	16h00	Imobilização	1h	19h00	Luzes acesas	overnight
10	9h00	Nado forçado	6min	21h00	Isolamento	overnight
11	09h00	Imobilização	1h	19h00	Serragem úmida	overnight
12	14h00	Isolamento no frio	1h	19h00	Luzes acesas	overnight
13	12h00	Luzes apagadas	3h	15h00	Nado forçado	6 min
14	08h00	Serragem úmida	10h	19h00	Privação de água e comida	overnight
15	13h00	Nado forçado	6min	19h00	Isolamento	overnight
16	14h00	Isolamento no frio	15min	15h00	Luzes apagadas	2h
17	7h00	Serragem úmida	12h	19h00	Luzes acesas	overnight
18	19h00	Isolamento	overnight	19h00	Privação de água e comida	overnight
19	16h00	Imobilização	1h	19h00	Luzes acesas	overnight
20	9h00	Nado forçado	6min	21h00	Isolamento	overnight

Fonte: Adaptado de LEPSCH *et al.*, 2005; SIMAS *et al.*, 2018.

O desenho experimental utilizado está representado esquematicamente na Figura 1.

Figura 1- Desenho experimental



Fonte: Da autora.

O tratamento com quefir (0,3 mL/100g/dia) ou leite tipo C foi realizado por gavagem, iniciando 10 dias antes da indução do estresse e sendo mantido durante os 20 dias do desenvolvimento do protocolo de estresse. Após 24h do final do protocolo experimental, os animais foram submetidos aos ensaios de comportamento e então eutanasiados, o sangue foi colhido em tubos contendo heparina para obtenção do plasma.

#### 5.4 Evolução ponderal dos camundongos

Os animais começaram a ser pesados no início do tratamento prévio com o quefir/leite, sendo esse procedimento mantido até o último dia do protocolo de indução de estresse crônico. As pesagens foram realizadas a cada 2 dias. Os resultados foram apresentados como variação ( $\Delta$ ) do peso corporal dos animais.

#### 5.5 Avaliação comportamental

Um dia após a finalização do protocolo de estresse crônico variável, foi realizada a avaliação comportamental pelo teste de Labirinto em Cruz Elevado. O labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados de mesmo tamanho, porém, com paredes de 20 cm de altura. Os braços similares são cruzados em ângulo reto, conectados por uma área central. O aparelho é elevado a 60 cm do chão. O registro da atividade foi registrado com uma câmera digital por 5 minutos. Posteriormente, foram analisado o tempo gasto na exploração dos braços abertos e fechados e a frequência de *grooming* (PACHECO, 2013) e *head dipping* (DALVI et al., 1999), utilizando o software *EthoVision*® (Noldus, The Netherlands).

## 5.6 Determinação dos níveis de corticosterona

A eutanásia foi realizada imediatamente após os testes comportamentais e o sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugados por 20 min a 4°C e 3000 rpm.

A extração da corticosterona foi realizada a partir de 25 µL de plasma utilizando 1 mL de etanol absoluto. Após agitação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm e 4°C. Os pellets foram desprezados e os sobrenadantes foram coletados em novos tubos, os quais foram submetidos à liofilização.

No dia do radioimunoensaio, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 2,5 mL de tampão gel e agitadas. As amostras foram ensaiadas em duplicatas de 500 µL e incubadas com o anticorpo anti-corticosterona (AB-cort-C9784-100TST) e com o antígeno marcado com trício (<sup>3</sup>H-corticosterona), para ensaio de competição. Para separação da fração livre da ligada, foi adicionada uma solução de carvão-dextran 0,5/0,05%, seguida por centrifugação a 2500 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi vertido em tubos apropriados contendo 2 mL de líquido de cintilação biodegradável (ScintiSafe Econo 1, Fisher Scientific SX20-5) e a leitura foi realizada em cintilador para radiação β (Beckman, USA). A concentração mínima detectável foi de 0,12 µg/dL (MARIN et al., 2007; CRUZ et al., 2012).

## 5.7 Avaliação da função renal

O plasma foi obtido através da centrifugação do sangue coletado em tubo heparinizado por 20 min, 4°C e 3000 rpm. Para a avaliação da função renal, utilizou-se o plasma a fresco.

Os níveis de creatinina foram determinados no plasma utilizando teste colorimétrico, pelo método de Jaffé modificado, de acordo com as instruções do Kit (Bioclin, Brasil, Referência K016). Para isso, 12,5 µL de amostra foram adicionadas a 100 µL do reagente alcalino e 25 µL de ácido Pícrico em placa de 96 poços. Essa mistura foi incubada a 37°C por 10 minutos, e logo após realizou-se a primeira leitura,

em aparelho de Elisa, a 510 nm. Uma segunda leitura foi feita 5 minutos após a adição de 5 µL de reagente ácido, também a 510 nm. Os resultados foram dados pela subtração da primeira leitura com a segunda leitura, multiplicados pelo fator de calibração e expressos em mg/dL.

Os níveis de ureia também foram determinados no plasma utilizando, entretanto, teste enzimático colorimétrico, de acordo com as instruções do Kit (Bioclin, Brasil, Referência K047). Para isso, 10 µL da amostra foram colocados em um tubo de ensaio e, logo depois, 1 mL de reagente de trabalho foi acrescentado (1 parte da Enzima em 20 partes do tampão de trabalho). Essa mistura foi homogeneizada e colocada em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Após esse processo, adicionou-se 1 mL do oxidante de trabalho, levando ao banho maria por mais 5 minutos. Por fim, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 600 nm. Os resultados foram calculados através da multiplicação da absorbância da amostra pelo o fator de calibração e expressos em mg/dL

## 5.8 Determinação da concentração de proteína

Em todos os ensaios descritos a seguir, foi realizada a normalização da concentração de proteína de cada amostra. O conteúdo proteico das amostras foi analisado utilizando o reagente de *Bradford (Sigma-Science)*, que consiste em um ensaio colorimétrico. Foram aplicados 5 µL de amostra e 200 µL de reagente em uma placa de Elisa. Uma curva padrão de albumina de soro bovino foi preparada nas seguintes concentrações: 0,0625 mg/dL, 0,0125 mg/dL, 0,250 mg/dL, 0,5 mg/dL, 1,0 mg/dL e 2,0 mg/dL. A determinação da diluição de cada amostra foi realizada testando-se várias diluições e escolhendo aquela cuja absorbância se encontrava aproximadamente no meio da curva. (Adaptado- XV Curso de Verão, Instituto de química, Universidade Federal de São Paulo, 2020).

## 5.9 Avaliação da peroxidação lipídica

Foi avaliada através da determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O MDA é um produto natural formado pela peroxidação lipídica. Em altas temperaturas, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando o aducto MDA-TBA que pode ser medido por métodos colorimétricos (530-540 nm) ou fluorométricos (530-540 nm).

Portanto, para realizar o teste, amostras do córtex renal e do ventrículo foram homogeneizadas em tampão de LISE (1 ml de PBS 10x; 0,1 ml de igepal; 0,05 g de deoxicolato de sódio; 0,1 ml de SDS 10%; água destilada qsp 10 ml; 4 µL de PMSF e 5 µL do inibidor de protease) e centrifugadas em seguida a 1600 g por 10 minutos a 4°C. Para a realização o ensaio foram utilizados 25 µL de amostra. A dosagem de TBARS foi realizada utilizando o método colorimétrico (leitura em 540 nm), seguindo o protocolo do Kit TBARS assay Kit, Cayman Chemical Company EUA, Cat. N° 10009055. Os resultados foram expressos como nmol/mg proteína.

#### 5.10 Determinação da atividade tecidual SOD

As amostras de tecido coletadas e congeladas foram homogeneizadas com PBS pH 7,4 e levadas à centrífuga a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C e 20 µL do sobrenadante foi utilizado no ensaio. O ensaio (*Superóxido Dismutase Assay Kit, Cayman Chemical Company, EUA, Cat. n° 706002*) utiliza o sal de tetrazólio para a detecção de radicais superóxido gerados pela xantina oxidase e hipoxantina, sendo que a reação gera o produto cromogênico, corante de formazan, com absorvância monitorada a 440-460nm. Uma unidade de SOD (U/ml) é definida como a quantidade de enzima necessária para que ocorra 50% da dismutação do radical superóxido (SIMPLICIO et al., 2015).

A fórmula utilizada para a determinação da atividade de SOD está exibida abaixo (Figura 2). Na dosagem é adicionada a amostra uma solução enzimática e para cada amostra tem se um branco, denominado branco 2 que é constituído pela amostra, porém sem a solução enzimática. Depois, tem se mais dois brancos, o branco 1 contém somente a solução enzimática, o branco 3 que não tem amostra e

nem solução enzimática. As absorvâncias das amostras e dos brancos determina a taxa de inibição da enzima em porcentagem.

Figura 2- Fórmula para determinação da atividade de SOD

$$\text{Atividade SOD (taxa de inibição\%)} = \left( \frac{(\text{Abs1} - \text{Abs. Br3}) - (\text{Abs Am.} - \text{Abs Br2})}{(\text{Abs. Br 1} - \text{Abs Br 3})} \right) \times 100$$

Fonte: *Superoxide Dismutase Assay Kit, Cayman Chemical Company, EUA, Cat. nº 706002*

Legenda: Abs= Absorbância, Br=Branco.

#### 5.11 Determinação da atividade tecidual de CAT

As amostras de tecido coletadas e congeladas foram homogeneizadas com PBS pH 7,4 e levadas à centrífuga a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. O ensaio se deu pela adição de 1 µL do sobrenadante da amostra de tecido a 1699 µL de PBS e 300 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cubetas de quartzo e, imediatamente após a homogeneização, verificou-se a velocidade de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 segundos. Subtraiu-se o valor inicial de absorvância do valor final obtido e os resultados foram expressos como unidades CAT/mg proteína (AEBI, 1984).

#### 5.12 Determinação dos níveis de GSH

As amostras de tecido coletadas e congeladas foram homogeneizadas com PBS pH 7,4 e levadas à centrífuga a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, 100 µL do homogenato foi adicionado a 100 µL de ácido tricloroacético (0,0125%), permanecendo ao gelo por 30 minutos e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, adicionou-se 100 µL da amostra, 200 µL de Tampão Tris pH 8,0 e 5 µL de Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) em placas de 96 poços (DTNB; 3,96 mg de DTNB em 1 mL de metanol). Quando o ácido entra em contato com o grupo SH –

tiol dos grupos sulfidrílicos, produz então uma coloração amarela, a qual é lida por espectrofotômetro a 415 nm. Os valores foram expressos em  $\mu\text{g}$  GSH/mg de proteína (SIMPLICIO et al., 2015).

### 5.13 Zimografia

A quantidade de MMP-2 nos tecidos vasculares, foi determinada por meio da técnica de zimografia (CASTRO et al., 2008; MARTINEZ et al., 2008; CERON et al., 2010). Trata-se de uma técnica em que um gel de eletroforese é copolimerizado ao substrato para as enzimas em estudo. O substrato utilizado foi a gelatina, devido ao fato das MMPs-2 serem gelatinases. As amostras de rim e coração foram trituradas e homogeneizadas em tampão de extração (tampão  $\text{CaCl}_2$  10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; contendo os inibidores de proteases NaF 50 mM, OrtoV 50 mM, fenantrolina 20 mM; seguindo a seguinte proporção: 20  $\mu\text{L}$  NaF, 20  $\mu\text{L}$  OrtoV, 50  $\mu\text{L}$  fenantrolina para 910  $\mu\text{L}$  de tampão). Centrifugou-se a 4 °C a 6000 rpm por 60 minutos e retirou-se o sobrenadante.

Deste sobrenadante, quantificou-se proteína por meio do método de Bradford descrito anteriormente, e calculou-se um volume correspondente a 20  $\mu\text{g}$  de proteína para as amostras de rim e 25  $\mu\text{g}$  de proteína para cada amostras de coração. Em seguida, transferiu-se a quantidade de cada amostra para a concentração de proteína determinada para tubos de 0,5 mL e adicionou-se a cada um deles 5  $\mu\text{L}$  tampão de amostra não redutor 2X, congelou-se as amostras preparadas em -20°C.

Para preparar os géis, fez-se inicialmente o gel de separação 10% (7,308 mL água destilada; 3,75 mL da solução 40% acrilamida/bisacrilamida; 3,75 mL de tampão Tris Cl/SDS 4X pH 8,8; 0,188  $\mu\text{L}$  de gelatina; 100  $\mu\text{L}$  de APS; 20  $\mu\text{L}$  de TEMED), e após polimerização, aplicou-se em cima o gel de largada 3,9% (3,212 mL de água destilada; 0,488  $\mu\text{L}$  da solução 40% acrilamida/bisacrilamida; 1,25 mL de tampão Tris Cl/SDS 4X pH 6,8; 50  $\mu\text{L}$  de APS; 10  $\mu\text{L}$  de TEMED), inserindo junto a estes géis os pentes para a formação de poços. Antes de aplicar as amostras no gel, colocou-as em banho-maria por 15 minutos a 37 °C, aplicando-as em seguida.

O padrão utilizado na corrida foi soro fetal bovino. Após eletroforese, estes géis foram submetidos a 2 banhos de 30 minutos de Triton a 2%, para remover o SDS e foram colocados em solução Tris-HCl 50 mM para a renaturação das proteínas e ativação enzimática, por 24 horas. Posteriormente, foram fixados e corados com solução *Coomassie Blue* 0,05% por 1,5 horas, levando a uma coloração completa do gel. Para a visualização das bandas correspondentes às MMPs em estudo, utilizou-se descorante feito de metanol a 30% e ácido acético a 10%, trocando o descorante em três tempos: 15 minutos, 30 minutos, e 60 minutos. Observou-se a degradação da gelatina incorporada ao gel por meio da formação de bandas claras contra o fundo azul do corante. A quantificação das bandas das MMPs foi feita usando o programa de imagens ImageJ. A forma latente e ativa da MMP-2 foi identificada por meio do peso molecular: 72 kDa.

#### 5.14 Imunoistoquímica para MMP-2 e 3-nitrotirosina

Método utilizado para determinar os níveis e localização de MMP-2 e 3-nitrotirosina diretamente nos tecidos. Para isso foram utilizados os kits de imunoistoquímica: Mouse Anti-Human MMP-2 Monoclonal Antibody (Chemicon, USA) e Anti-Nitrotyrosine (rabbit immunoaffinity purified IgG) Polyclonal Antibody (Chemicon, USA).

Cortes histológicos com espessura de 5 µm foram realizados a partir dos blocos de parafina feitos para a histologia, utilizando um micrótomo. Os cortes foram posicionados sequencialmente em cinco lâminas para cada grupo experimental revestidas com poli-L-lisina e devidamente identificadas. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas com xilol e reidratada com álcool em três concentrações diferentes (70%, 90% e 95% respectivamente).

Após esse processo, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS e em seguida adicionado uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%, que permaneceu na lâmina por 20 minutos a fim de realizar o bloqueio de todas as peroxidases. Depois, lavou-se a lâmina novamente com PBS e adicionou a solução de bloqueio (Normal Serum) e deixou mais 20 minutos.

Em seguida, foram adicionados às lâminas os anticorpos primários anti-MMP-2 (MAB 3308, Chemicon, USA) ou anti-nitrotirosina (Cat. # 06-284, Chemicon, USA), ambos na concentração de 0,1 µg/mL, que foram incubados *overnight*, em câmara úmida a 4°C. Após a incubação, os cortes foram lavados com PBS e incubados com o respectivo anticorpo secundário do kit por 30 minutos em câmara úmida e escura. Transcorrido esse tempo, adicionou-se a solução de ABC, que foi incubada por 30 minutos.

Após a incubação, os cortes foram lavados com PBS. Por fim os cortes foram incubados com o substrato cromógeno 3,3' diaminobenzidina (DAB) (25 µL do cromógeno para cada 1,0 mL do tampão do DAB) por 1 minuto, e contracorados com hematoxilina. Com auxílio de um microscópio de luz branca (Leica ICC50 HD) acoplado a câmara fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas num aumento de 500x, com os seguintes parâmetros: saturação 170, gama 1,20 e brightness 57%, sendo realizado o balanço do branco. A MMP-2 e a 3-nitrotirosina foram visualizadas por uma cor marrom contra o fundo roxo da hematoxilina. Para análise da e quantificação da densidade de marrom foi utilizado o programa ImageJ, fazendo um retângulo de 120x50, sendo a imagem com 16 bit. Tinha-se 3 fotos por animal, sendo que cada foto era capturada 30 vezes por 3 vezes. Posteriormente, fazia-se a média de cada animal (PK6101-Rabbit IgG e PK-6102-Mouse IgG, Vectastain ABC KIT).

#### 5.15 Análise estatística

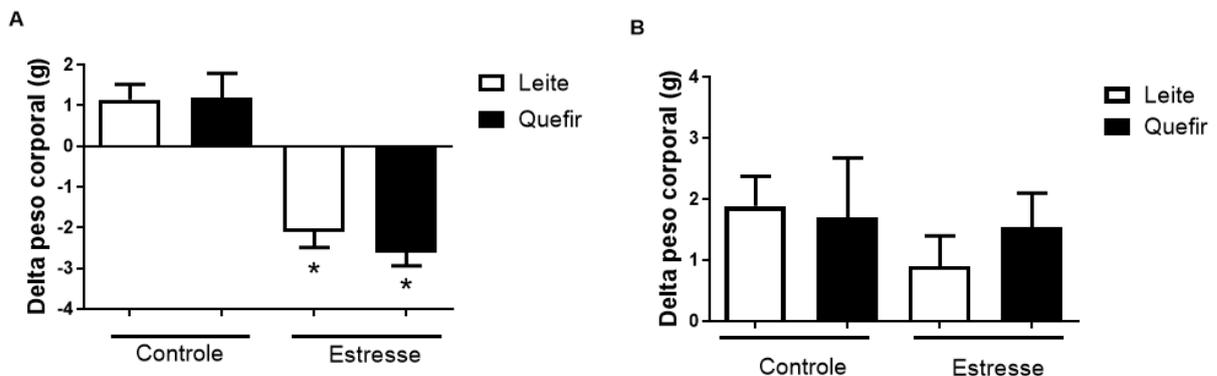
Os resultados obtidos no nosso estudo foram analisados com o programa *GraphPad Prism 8* e expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). A análise realizada foi Análise de Variância (ANOVA *two way*), seguida pelo pós-teste de *Sidak's*. Foram considerados significativos valores de  $p < 0.05$ .

## 6 Resultados

### 6.1 Evolução ponderal dos camundongos

Na Figura 3, observa-se a variação ( $\Delta$ ) do peso corporal dos animais (em gramas) de cada grupo do estudo no 10º dia (Figura 3A) e no 20º dia (Figura 3B) após o início da indução do estresse. É possível observar que, o peso corporal dos animais dos grupos estresse difere do peso dos animais dos grupos controle no 10º dia ( $p < 0,05$ ), porém essa diferença não é observada no último dia do protocolo ( $p > 0,05$ ). Ademais, não há efeito do tratamento com quefir sobre essa variável em nenhum dos tempos avaliados.

Figura 3 -Delta ( $\Delta$ ) do peso corporal (em gramas).



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. A: Delta do peso corporal com 10 dias de estresse (CL  $1.135 \pm 0.2751$ , CQ  $1.176 \pm 0.6072$ , EL  $-2.099 \pm 0.3954$ , EQ  $-2.618 \pm 0.3228$ ,  $n = 11$  a  $15$ / grupo). Delta do peso corporal com 20 dias de estresse (B: CL  $1.885 \pm 0.4886$ , CQ  $1.6995 \pm 0.9772$ , EL  $0.8957 \pm 0.5018$ , EQ  $1.542 \pm 0.5559$ ,  $n = 11$  a  $15$ / grupo). Dados expressos em gramas (g). Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*. \* $p < 0,05$  versus controle.

Tabela 2 - Análise de variância de duas vias do delta do peso corporal com 10 dias de estresse

Peso	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,49} = 68.92$ , $p < 0.0001$	$F_{1,49} = 0.3179$ , $p = 0.5754$	$F_{1,49} = 0.4366$ , $p = 0.5119$

Fonte: Da autora.

Tabela 3 - Análise de variância de duas vias do delta do peso corporal com 20 dias de estresse

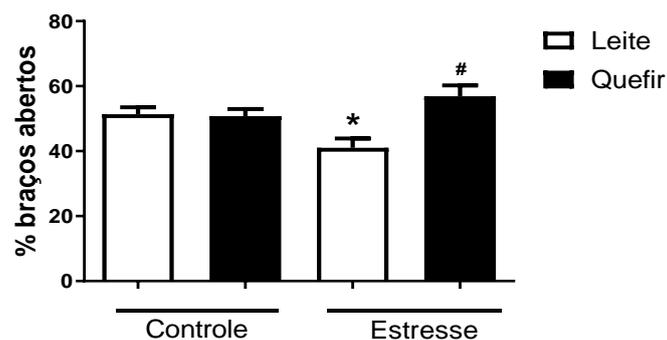
Peso	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,51}=0.7772, p= 0.3821$	$F_{1,51}=0.1238, p=0.7264$	$F_{1,51}=0.4164, p= 0.5216$

Fonte: Da autora.

## 6.2 Avaliação comportamental

No teste de labirinto em cruz elevado, foram avaliados a permanência dos camundongos nos braços abertos, a frequência de *grooming* a frequência de *head dipping*. A Figura 4 mostra que os animais submetidos ao estresse e tratados com leite apresentam menor permanência nos braços abertos em comparação ao grupo controle tratado com leite ( $p<0,05$ ). O tratamento com quefir aumentou a permanência dos animais que foram expostos ao estresse nos braços abertos, em relação ao grupo estresse não tratado ( $p<0,05$ ).

Figura 4 – Porcentagem da permanência dos animais nos braços abertos



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. CL  $51.35\pm 2.166$ , CQ  $50.77\pm 2.206$ , EL  $41.02\pm 2.896$ , EQ  $56.92\pm 3.294$ ,  $n=10$  a  $14$ /grupo. Dados expressos em porcentagem. Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*. \* $p<0,05$  versus controle, # $p<0,05$  versus estresse.

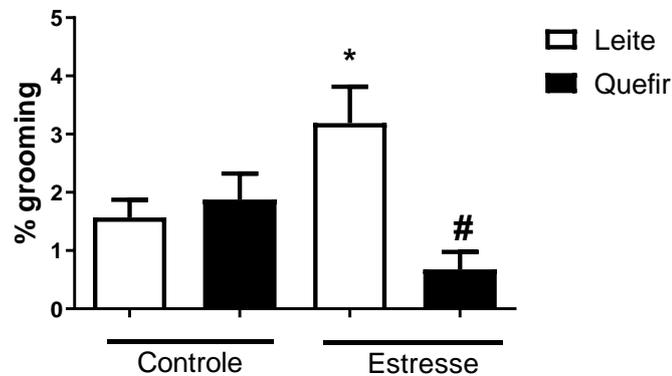
Tabela 4- Análise de variância de duas vias da porcentagem de permanência nos braços abertos

Braços abertos	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,44}=0.5919, p= 0.4458$	$F_{1,44}=7.960, p=0.0071$	$F_{1,44}=9.220, p= 0.0040$

Fonte: Da autora.

Na Figura 5, observa-se que o grupo submetido ao estresse e tratados com leite teve aumento do tempo de *grooming*, sendo que o tratamento com quefir reverteu esse efeito ( $p < 0,05$ ).

Figura 5 – Porcentagem de *grooming*



Fonte: Da autora

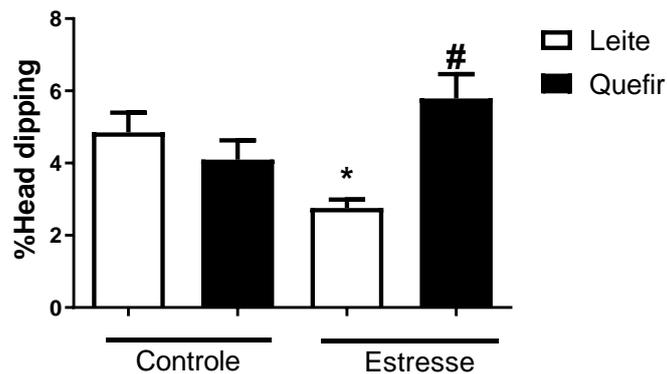
Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. CL  $1.567 \pm 0.3047$ , CQ  $1.876 \pm 0.4458$ , EL  $3.190 \pm 0.6332$ , EQ  $0.6764 \pm 0.2988$ ,  $n = 11$  a  $15$ /grupo. Dados expressos porcentagem. Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*. \* $p < 0,05$  versus controle, # $p < 0,05$  versus estresse.

Tabela 5 - Análise de variância de duas vias da porcentagem de *grooming*

<i>Grooming</i>	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,48} = 0.2409$ , $p = 0.6258$	$F_{1,48} = 6.552$ , $p = 0.0137$	$F_{1,48} = 10.74$ , $p = 0.0040$

Fonte: Da autora.

Na Figura 6, o grupo estresse leite (EL) diminuiu o tempo de *head dipping* ( $p < 0,05$ ), enquanto o tratamento com quefir reverteu esse efeito.

Figura 6– Porcentagem de *head dipping*

Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss machos*, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. CL 4,847±0.5526, CQ 4.099±0.5287, EL 2.755±0.2371, EQ 5.793±0.6688, n= 11 a 15/grupo. Dados expressos em porcentagem. Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*. \* $p < 0,05$  versus controle, # $p < 0,05$  versus estresse.

Tabela 6 - Análise de variância de duas vias da porcentagem de *head dipping*

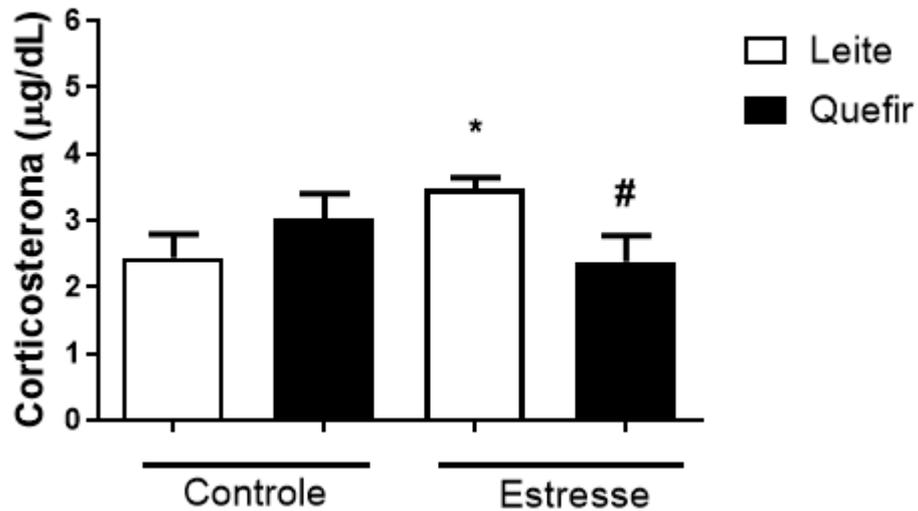
<i>Head dipping</i>	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,49}=0.1438, p=0.7064$	$F_{1,49}=4.757, p=0.0340$	$F_{1,49}=12.99, p= 0.0007$

Fonte: Da autora.

### 6.3 Determinação dos níveis de corticosterona

Na Figura 7, observaram-se os níveis de corticosterona dos animais controle e estresse tratados ou não com quefir. Os animais submetidos ao estresse apresentam um aumento dos níveis de corticosterona quando comparados ao grupo controle leite (CL) ( $p < 0.05$ ). O tratamento com o quefir levou a uma redução dos níveis de corticosterona dos animais submetidos ao estresse quando comparados com os animais EL ( $p < 0.05$ ).

Figura 7– Níveis de corticosterona



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos swiss machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. CL 2.444±0.3467, CQ 3.033±0.3697, EL 3.483±0.1551, EQ 2.379±0.3954, n= 8 a 10/grupo. Dados expressos em porcentagem. Teste ANOVA two way, seguido pelo teste Sidak's post-hoc. \* $p < 0,05$  versus controle, # $p < 0,05$  versus estresse.

Tabela 7 - Análise de variância de duas vias dos níveis de corticosterona

Corticosterona	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,32}=0.3593, p=0.5531$	$F_{1,32}=0.6407, p=0.4293$	$F_{1,32}=6.923, p= 0.0130$

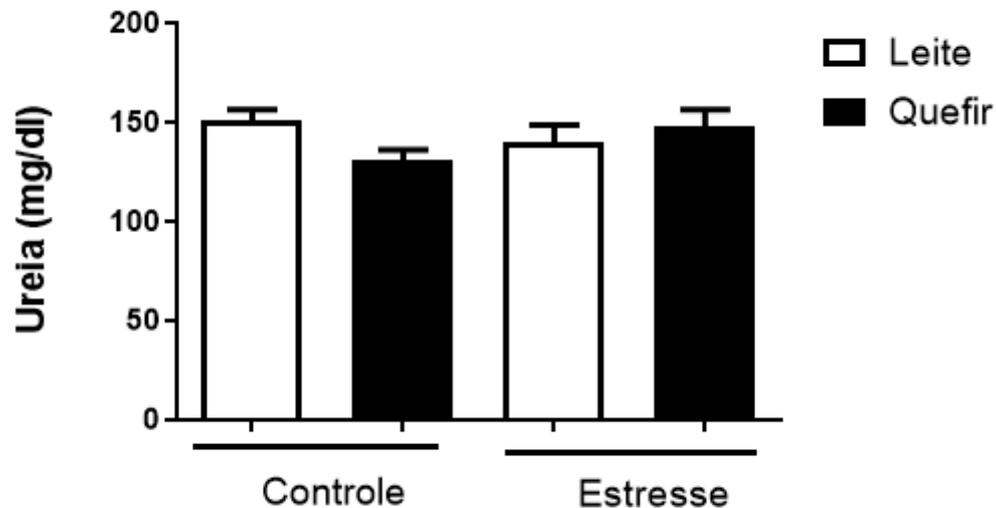
Fonte: Da autora.

## 6.4 Avaliação da função renal

### 6.4.1 Ureia

Conforme mostra a Figura 8, a indução do estresse e o tratamento não alteraram de maneira significativa os níveis de ureia plasmática ( $p > 0,05$ ).

Figura 8– Níveis de ureia no plasma (mg/dL) realizada após a eutanásia dos animais.



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. CL  $150.6 \pm 5.829$ , CQ  $130.7 \pm 5.309$ , EL  $139.5 \pm 9.016$ , EQ  $147.5 \pm 8.698$ ,  $n=10$  a  $14$ /grupo. Dados expressos em miligramas por decilitro(mg/dL). Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*.  $p>0,05$

Tabela 8 - Análise de variância de duas vias dos níveis de ureia no plasma de camundongos

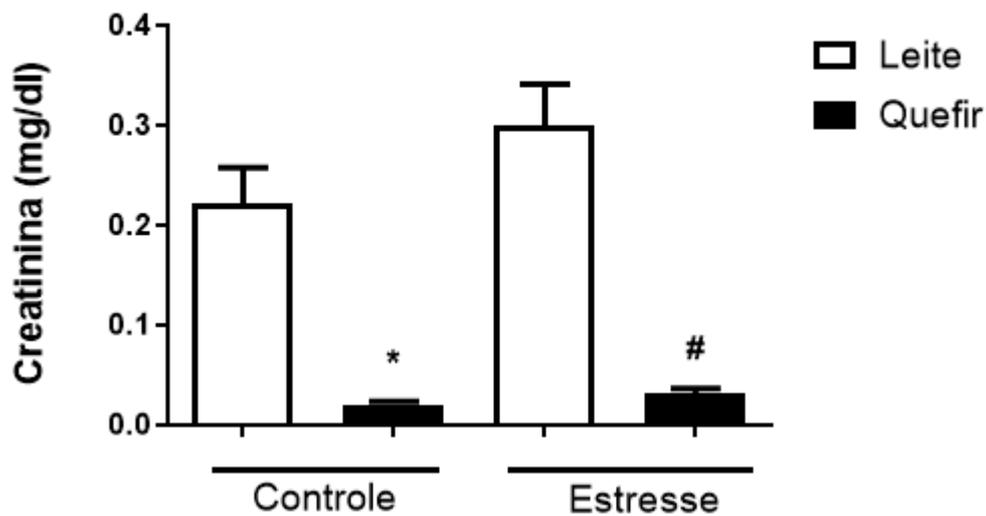
Ureia	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,43}=0.1481$ , $p=0.7022$	$F_{1,43}=0.6328$ , $p=0.4307$	$F_{1,43}=3.483$ , $p= 0.0688$

Fonte: Da autora.

#### 6.4.2 Creatinina

Conforme observado na Figura 9, percebeu-se que não houve diferença entre o grupo controle e estresse. ( $p>0.05$ ). Porém, o tratamento com o quefir, por si só, levou a uma diminuição significativa nos níveis de creatinina.

Figura 9– Níveis de creatinina no plasma (mg/dL)



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. CL 0,2213±0,03610, CQ 0,02079±0,002740, EL 0,3003±0,04083, EQ 0,03180±0,005193, n=9 a 11/grupo. Dados expressos em miligramas por decilitro(mg/dL). Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*. \* $p < 0,05$  versus controle, # $p < 0,05$  versus estresse.

Tabela 9 - Análise de variância de duas vias dos níveis de creatinina no plasma de camundongos.

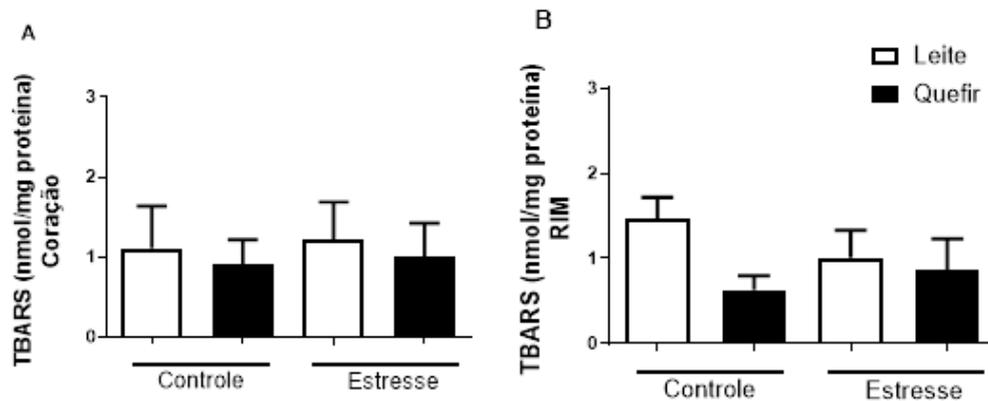
Creatinina	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,37}=2.514$ , $p=0.1214$	$F_{1,37}=68.27$ , $p < 0.0001$	$F_{1,37}=1.434$ , $p= 0.2387$

Fonte: Da autora.

## 6.5 Avaliação da peroxidação lipídica

Na Figura 10 encontram-se os resultados de TBARS. Não houve diferenças significativas nos grupos estudados, tanto no coração (Figura 10A), como no rim (Figura 10B) ( $p > 0,05$ ).

Figura 10– Efeito do estresse sobre a produção de TBARS



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. A: Tecido cardíaco (CL 1.1320±0.3904, CQ 0.9141±0.2751, EL 1.218±0.3961, EQ 0.9966±0.4268, n= 6 a 8/grupo). B: Tecido renal (CL 1.105±0.1707, CQ 0.6870±0.1482, EL 1.311±0.3227, EQ 0.9885±0.2685, n=10 a 14/grupo). Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*.  $p > 0,05$ .

Tabela 10 - Análise de variância de duas vias da peroxidação lipídica pela determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido cardíaco

TBARS	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,18}=0.04133, p=0.8412$	$F_{1,18}=0.1988, p=0.6610$	$F_{1,18}=0.0008, p= 0.9777$

Fonte: Da autora.

Tabela 11 - Análise de variância de duas vias da peroxidação lipídica pela determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido renal

TBARS	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,33}=0.1557, p=0.6956$	$F_{1,33}=2.851, p=0.1008$	$F_{1,33}=1.386, p= 0.2474$

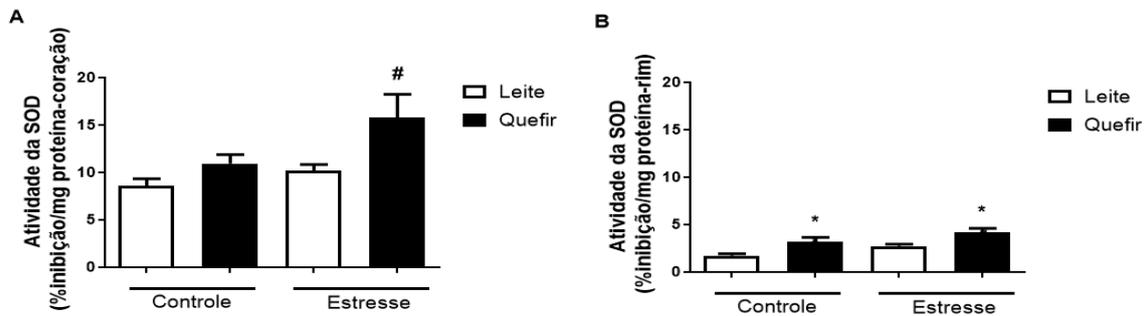
Fonte: Da autora.

## 6.6 Determinação da atividade tecidual de SOD

A Figura 11A mostra que no tecido cardíaco não há aumento da atividade de SOD no grupo que foi submetido ao estresse ( $p > 0,05$ ). No entanto, há um aumento da atividade de SOD nos animais que consumiram quefir e foram submetidos ao estresse quando comparada aos grupos controle leite e estresse leite ( $p < 0,05$ ).

Já no tecido renal (Figura 11B), não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo estresse ( $p > 0.05$ ). Todavia, houve um aumento nos níveis de SOD nos grupos controle e estresse que receberam quefir quando comparados ao controle ( $p < 0,05$ ).

Figura 11– Atividade da SOD (% Inibição/mg proteína)



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. A: Tecido cardíaco (CL  $8.615 \pm 0.7192$ , CQ  $10.92 \pm 0.9760$ , EL  $10.16 \pm 0.6710$ , EQ  $15.77 \pm 2.473$ ,  $n=6$  a  $8$ /grupo). B: Tecido renal (CL  $1.729 \pm 0.2053$ , CQ  $3.192 \pm 0.4605$ , EL  $2.727 \pm 0.1902$ , EQ  $4.192 \pm 0.4201$ ,  $n=10$  a  $12$ /grupo). Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*. # $p < 0,05$  versus CL e EL; \* $p < 0,05$  versus CL e EL.

Tabela 12- Análise de variância de duas vias da atividade da SOD no tecido cardíaco.

SOD	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,25}=6.574$ , $p=0.0167$	$F_{1,25}=10.09$ , $p=0.0039$	$F_{1,25}=1.759$ , $p=0.1967$

Fonte: Da autora.

Tabela 13- Análise de variância de duas vias da atividade da SOD no tecido renal.

SOD	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,40}=8.331$ , $p=0.0063$	$F_{1,40}=17.90$ , $p=0.0001$	$F_{1,40}=9.701^{e-006}$ , $p=0.9975$

Fonte: Da autora.

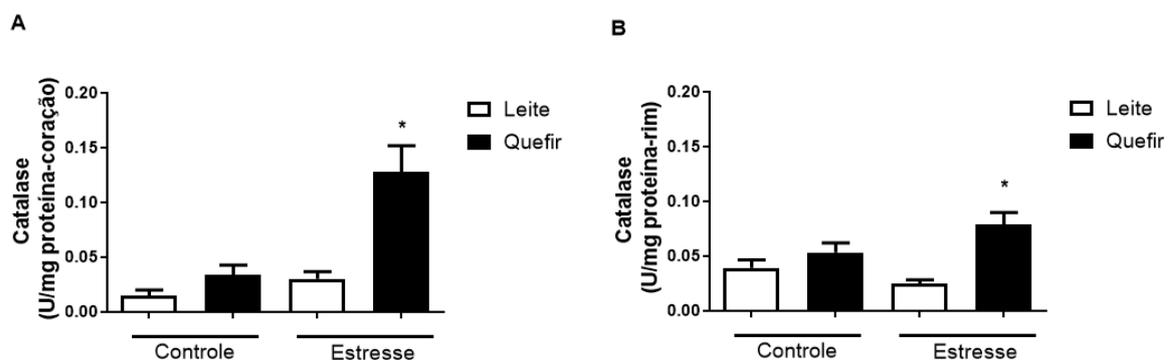
## 6.7 Determinação da atividade tecidual de CAT

A Figura 12A mostra que, no tecido cardíaco, não foram observadas alterações no grupo estresse, embora há uma tendência de aumento da atividade nesses animais, bem como nos animais controles tratados com quefir ( $p > 0,05$ ). Já o grupo

estresse que recebeu quefir teve um aumento da atividade de CAT em relação aos dois grupos controles ( $p < 0,05$ ).

No tecido renal, (Figura 12B), o grupo estresse leite teve uma tendência na redução da atividade da CAT quando comparado ao grupo controle que recebeu leite, porém sem resultados significativos ( $p > 0,05$ ). De modo semelhante ao que foi observado no coração, o grupo estresse que recebeu quefir teve um aumento da atividade de CAT quando comparado ao grupo controle leite e ao grupo estresse leite. Ou seja, o tratamento com quefir aumentou os níveis da enzima acima dos encontrados no grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Figura 12– Atividade da CAT (U/mg proteína)



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. A: Tecido cardíaco (CL  $0.01458 \pm 0.005462$ , CQ  $0.03355 \pm 0.009244$ , EL  $0.03026 \pm 0.006617$ , EQ  $0.1277 \pm 0.02402$ ,  $n = 5$  a  $8$ /grupo). B: tecido renal (CL  $0.03925 \pm 0.007285$ , CQ  $0.05341 \pm 0.008615$ , EL  $0.02495 \pm 0.003335$ , EQ  $0.07889 \pm 0.01104$ ,  $n = 9$  a  $13$ /grupo). Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*. \* $p < 0,05$  versus todos os outros grupos; \* $p < 0,05$  versus EL e CL.

Tabela 14- Análise de variância de duas vias da atividade da CAT no tecido cardíaco

CAT	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,24}=16.24, p=0.0005$	$F_{1,24}=18.24, p=0.0003$	$F_{1,24}=8.291, p=0.0082$

Fonte: Da autora.

Tabela 15- Análise de variância de duas vias da atividade da CAT no tecido renal

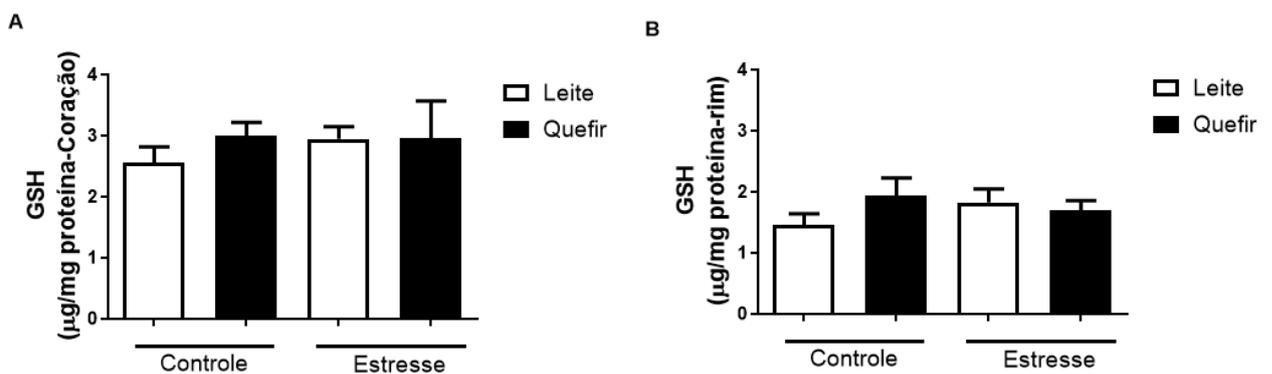
CAT	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,42}=0.5232, p=0.4735$	$F_{1,42}=19.40, p<0.0001$	$F_{1,42}=6.618, p=0.0137$

Fonte: Da autora.

## 6.8 Determinação dos níveis teciduais de GSH

Na Figura 13, não foi observada diferença estatística entre os grupos nos níveis de GSH no tecido cardíaco (Figura 13A) e renal (Figura 13B) ( $p>0,05$ ).

Figura 13– Níveis de GSH (U/mg proteína)



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos swiss machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. A: Tecido cardíaco (CL 2.551±0.2642, CQ 2.994±0.2239, EL 2.946±0.2018, EQ 2.954±0.6127, n=5 a 9/grupo). B: Tecido renal (CL 1.458±0.1850, CQ 1.939±0.2841, EL 1.827±0.2176, EQ 1.699±0.1580, n= 11 a 14/grupo). Teste ANOVA two way, seguido pelo teste Sidak's post-hoc.  $p>0,05$

Tabela 16- Análise de variância de duas vias dos níveis de GSH no tecido cardíaco

GSH	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,24}=0.2543$ , $p=0.6186$	$F_{1,24}=0.4145$ , $p=0.5258$	$F_{1,24}=0.3851$ , $p= 0.5408$

Fonte: Da autora.

Tabela 17- Análise de variância de duas vias dos níveis de GSH no tecido renal

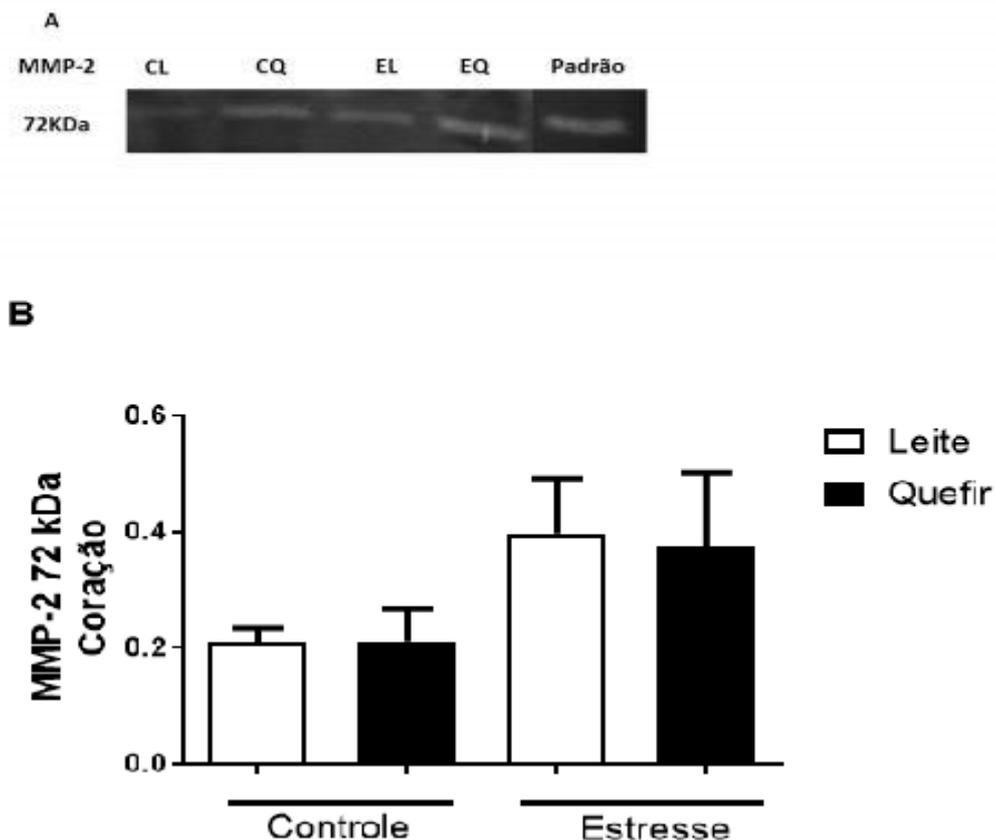
GSH	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,49}=0.08706$ , $p=0.7692$	$F_{1,49}=0.6540$ , $p=0.4226$	$F_{1,49}=1.957$ , $p= 0.1681$

Fonte: Da autora.

## 6.9 Determinação dos níveis de MMP-2 no coração

Na Figura 14B, encontra-se a determinação de MMP-2 no tecido cardíaco. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados ( $p>0.05$ ).

Figura 14– Expressão de metaloproteinases de matriz do tipo 2 (MMP-2) por zimografia



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. Figura A: gel representativo, em escala de cinza, do zimograma de extratos de coração de animais dos quatro grupos experimentais. Figura. B: CL  $0.2095 \pm 0.02464$ , CQ  $0.2108 \pm 0.05579$ , EL  $0.3987 \pm 0.09497$ , EQ  $0.3749 \pm 0.1253$ ,  $n = 4$  a  $7$ /grupo. Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*.  $p > 0,05$

Tabela 18- Análise de variância de duas vias da banda pertencente a MMP-2 no coração.

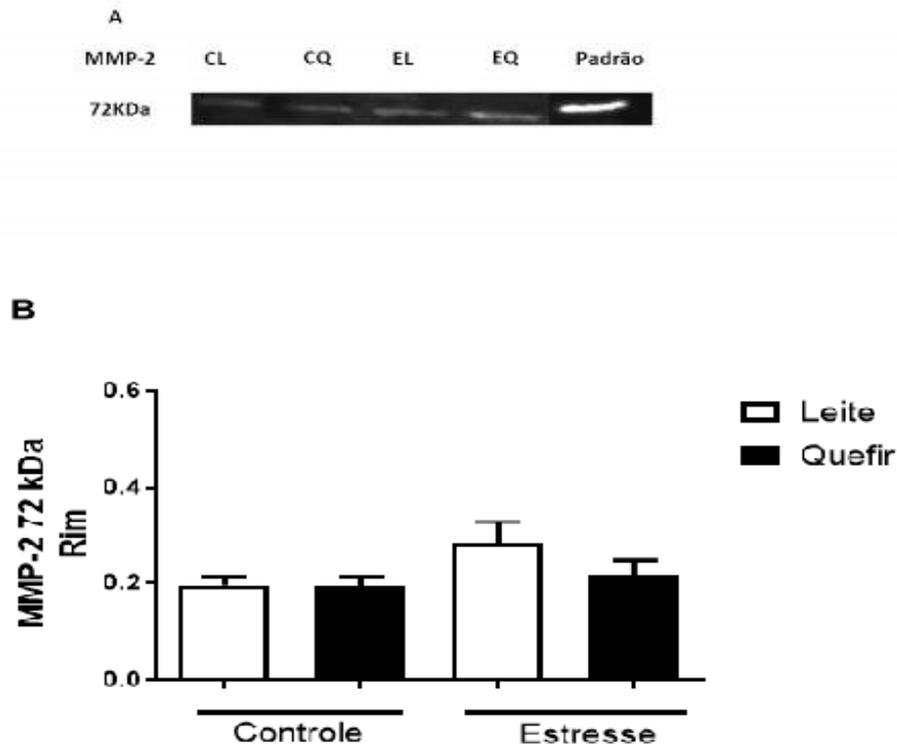
MMP-2 (72KDa)	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,17}=4.969$ , $p=0.0396$	$F_{1,17}=0.01705$ , $p=0.8976$	$F_{1,17}=0.02141$ , $p= 0.8854$

Fonte: Da autora.

## 6.10 Determinação dos níveis de MMP-2 no rim

Os níveis de MMP-2 no tecido renal podem ser observados na Figura 15B. No entanto, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos estudados ( $p>0.05$ ).

Figura 15– Expressão de metaloproteinases de matriz do tipo 2 (MMP-2) por zimografia



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. Figura A: gel representativo, em escala de cinza, do zimograma de extratos de rim de animais dos quatro grupos experimentais. Figura. B: CL  $0.1961 \pm 0.01547$ , CQ  $0.1917 \pm 0.02003$ , EL  $0.2816 \pm 0.04560$ , EQ  $0.2161 \pm 0.03075$ ,  $n = 6$  a  $11$ /grupo. Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*.  $p > 0,05$ .

Tabela 19- Análise de variância de duas vias da banda pertencente a MMP-2 no rim

MMP-2 (72KDa)	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,33}=2.399$ , $p=0.1310$	$F_{1,33}=0.9692$ , $p=0.3320$	$F_{1,33}=0.7405$ , $p= 0.3957$

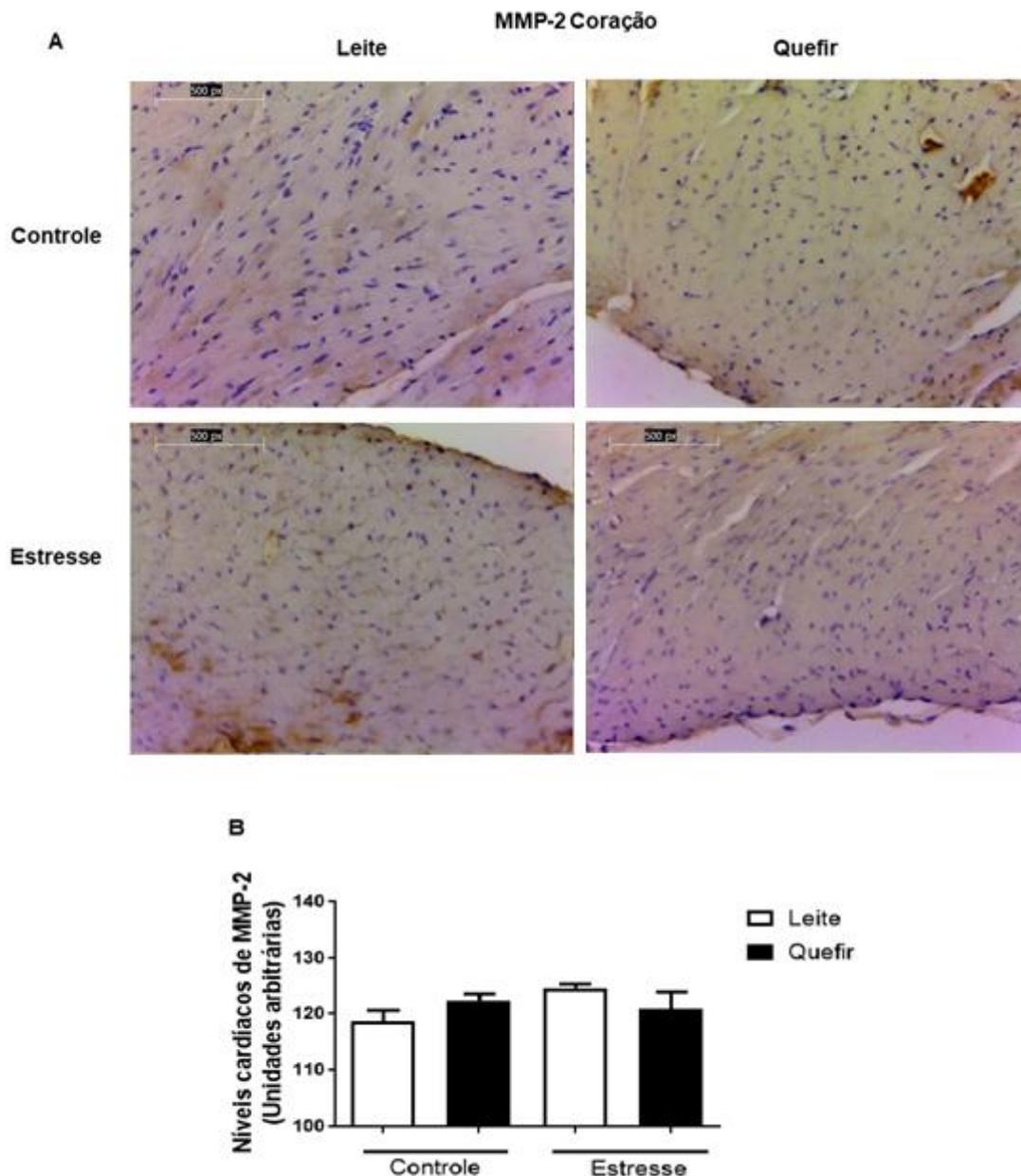
Fonte: Da autora.

## 6.11 Imunoistoquímica para MMP-2 e 3-nitrotirosina

Os níveis de MMP-2 e de 3-nitrotirosina também foram avaliados pelo método de imunohistoquímica.

Observa-se, na Figura 16, que não houve diferença significativa nos níveis de MMP-2 no tecido cardíaco entre os grupos estudados ( $p > 0.05$ , Figura 16A e 16B). Entretanto, foi observado o aumento dos níveis de MMP-2 nos animais estresse leite em relação ao grupo controle leite no tecido renal ( $p < 0.05$ , Figura 17A e 17B), e o tratamento com o quefir diminuiu os níveis de MMP-2 em relação ao grupo estresse não tratado ( $p < 0.05$ ).

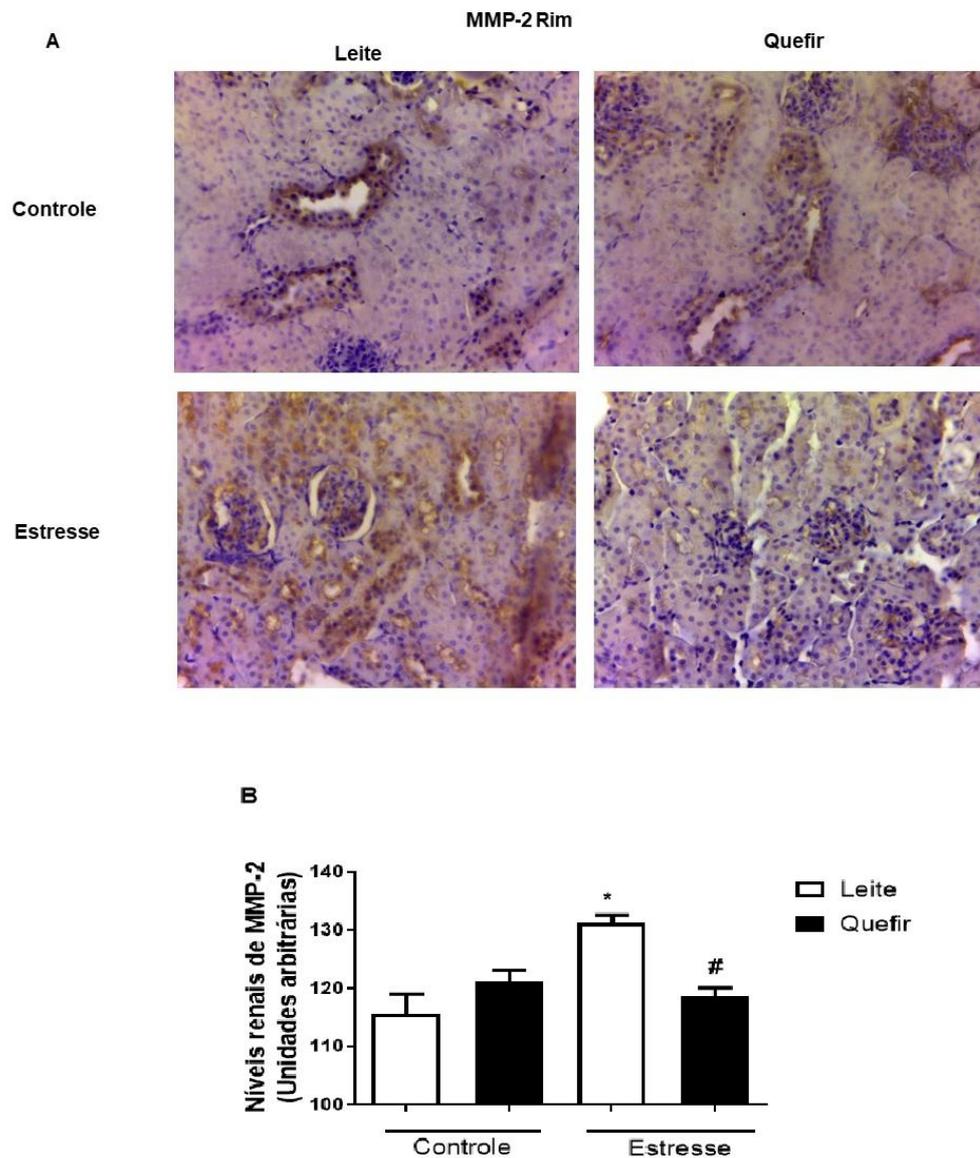
Figura 16– Imunoistoquímica dos níveis de MMP-2 no coração



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos swiss machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. Figura. A: Fotografias representativas (x500) dos níveis de MMP-2 em marrom no ventrículo dos grupos experimentais. Figura. B: Representação gráfica da atividade da expressão de MMP-2, quantificado e analisando a intensidade de marrom (CL 118.5 ± 1.999, CQ 122.3 ± 1.377, EL 124.7 ± 0.6667, EQ 120.8 ± 3.224), n = 3 a 4/grupo. Teste ANOVA two way, seguido pelo teste Sidak's post-hoc. p > 0,05.

Figura 17– Imunoistoquímica dos níveis de MMP-2 no rim

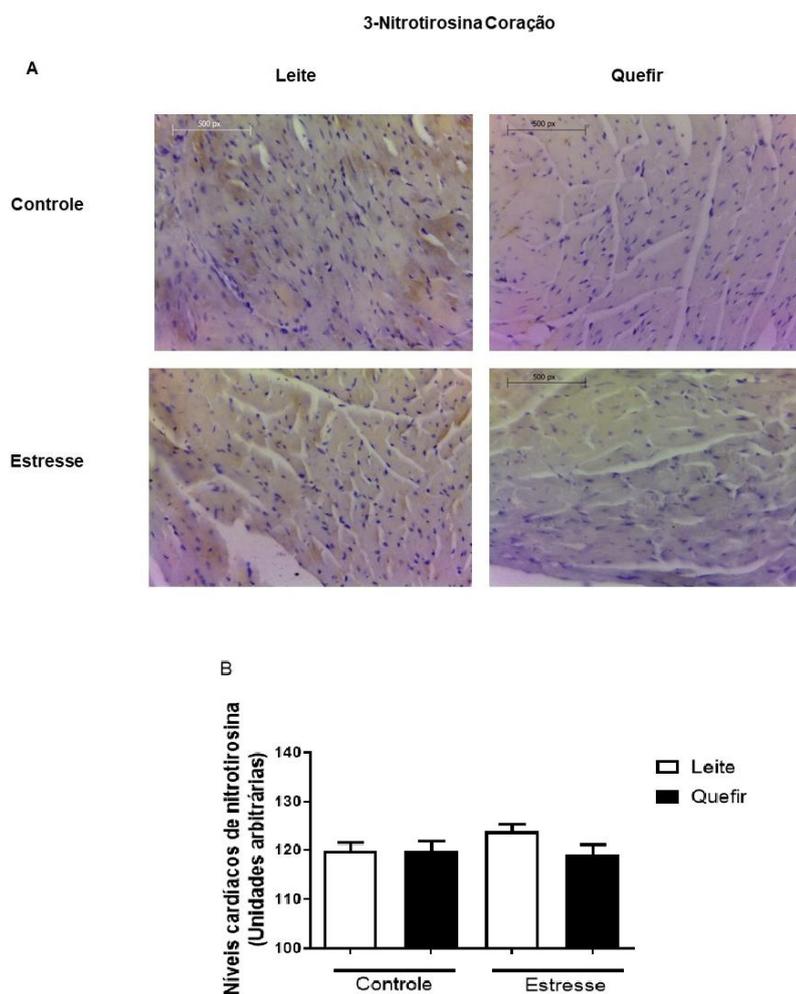


Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. Figura. A: Fotografias representativas (x500) dos níveis de MMP-2 em marrom no córtex renal dos grupos experimentais. Figura. B: Representação gráfica da atividade da expressão de MMP-2, quantificado e analisando a intensidade de marrom (CL 115.6± 3.385, CQ 121.2±1.508, EL 131.1±1.398, EQ 118.5±1.555), n= 4 a 5/grupo. Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*. \*p<0,05 versus CL, #p< 0,05 versus EL.

Observa-se, na Figura 18, que não houve alterações significativas nos níveis de 3-nitrotirosina nos corações dos grupos estudados ( $p>0,05$ , Figura 18A e 18B). Entretanto, foi observado aumento dos níveis de 3-nitrotirosina dos animais estresse leite em relação ao controle leite e controle quefir no tecido renal ( $p<0,05$ , Figura 19A e 19B). O tratamento com quefir não alterou os níveis de 3-nitrotirosina nos animais que foram submetidos ao estresse ( $p>0,05$ ).

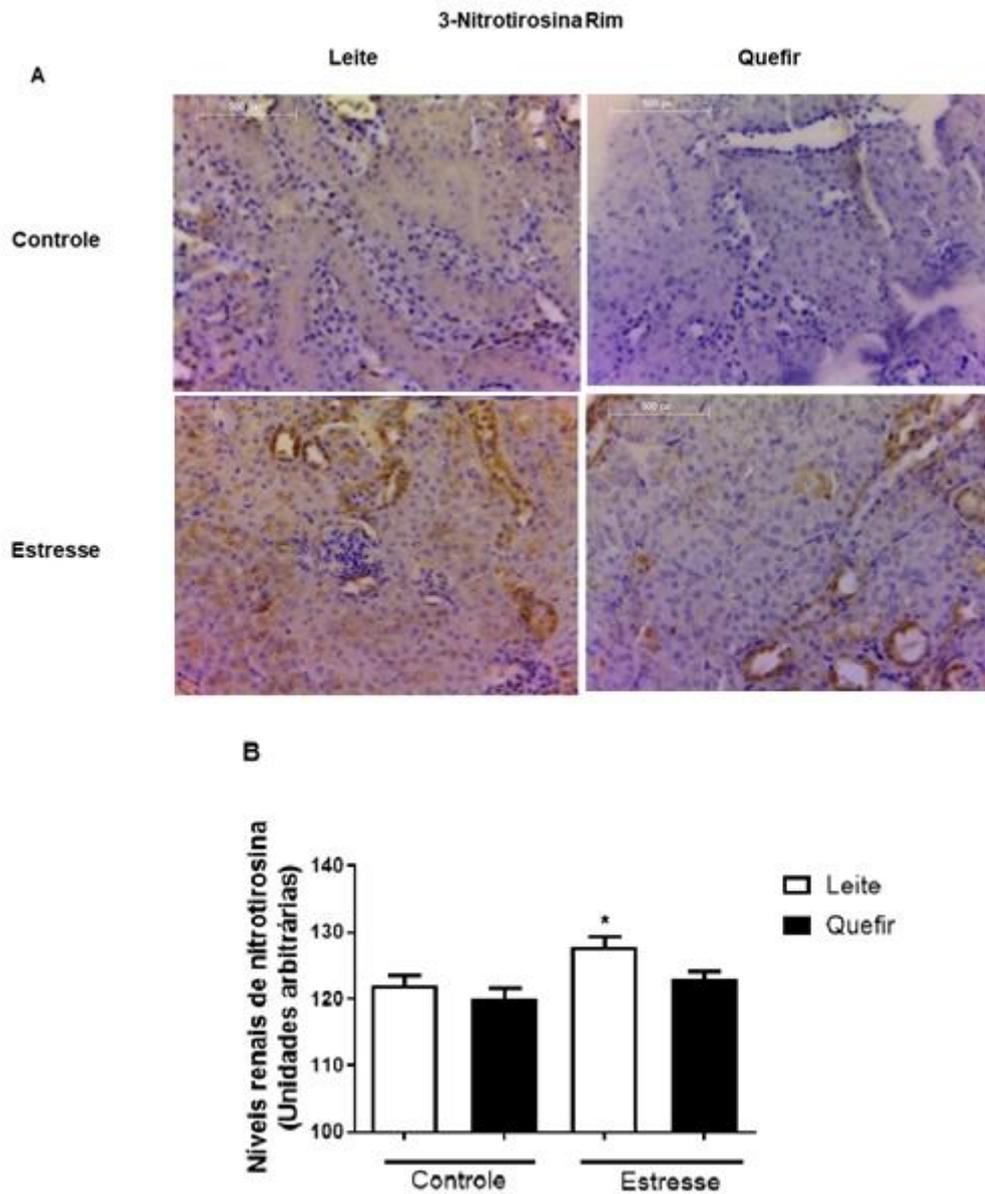
Fiura 18– Imunoistoquímica dos níveis de 3-nitrotirosina no coração



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. Figura A: Fotografias representativas (x500) dos níveis de 3-nitrotirosina em marrom no ventrículo dos grupos experimentais. Figura B: Representação gráfica da atividade da expressão de 3-nitrotirosina, quantificado e analisando a intensidade de marrom (CL 119.8± 1.702, CQ 119.8± 2.016, EL 123.8±1.702, EQ 119 ± 2.082), n= 3 a 4/grupo. Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*.  $p>0,05$ .

Figura 19– Imunoistoquímica dos níveis de 3-nitrotirosina no rim



Fonte: Da autora

Legenda: Camundongos *swiss* machos, expostos ou não ao período de estresse de 20 dias, que receberam ou não quefir por um período de 30 dias. Figura A: Fotografias representativas (x500) dos níveis de 3-nitrotirosina em marrom no córtex renal dos grupos experimentais. Figura B: Representação gráfica da atividade da expressão de 3-nitrotirosina, quantificado e analisando a intensidade de marrom (CL 122± 1.532, CQ 120± 1.623, EL 127.8±1.493, EQ 122.9± 1.138), n= 3 a 4/grupo. Teste ANOVA *two way*, seguido pelo teste *Sidak's post-hoc*. \*p<0,05 versus CL e quefir controle.

Tabela 20- Análise de variância de duas vias da imunistoquímica da MMP-2 no coração

MMP-2 (72KDa)	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,10}=1.060, p=0.3274$	$F_{1,10}=0.00182, p=0.9668$	$F_{1,10}=2.874, p= 0.1209$

Fonte: Da autora.

Tabela 21- Análise de variância de duas vias da imunistoquímica da MMP-2 no rim

MMP-2 (72KDa)	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,14}=7.246, p=0.0175$	$F_{1,14}=2.181, p=0.1619$	$F_{1,14}=14.62, p= 0.0019$

Fonte: Da autora.

Tabela 22- Análise de variância de duas vias da imunistoquímica da 3-nitrotirosina no coração

3-Nitrotirosina	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,11}=0.7435, p=0.4069$	$F_{1,11}=1.588, p=0.2337$	$F_{1,11}=1.588, p= 0.2337$

Fonte: Da autora.

Tabela 23- Análise de variância de duas vias da imunistoquímica da 3-nitrotirosina no rim

3-Nitrotirosina	Doença	Tratamento	Interação
	$F_{1,11}=8.945, p=0.0123$	$F_{1,11}=5.517, p=0.0386$	$F_{1,11}=0.9176, p= 0.3587$

Fonte: Da autora.

## 7 Discussão

O estresse crônico afeta milhares de pessoas no mundo e pode desencadear uma série de alterações fisiológicas, diminuindo a qualidade de vida dos indivíduos. Modelos animais de indução de estresse auxiliam no melhor entendimento das alterações que decorrem de períodos crônicos de estresse. Dentre as alterações fisiológicas observadas durante modelos animais de estresse, há a diminuição do peso corporal e alterações dos níveis de corticosterona (MARIN et al., 2007; CRUZ et al., 2012; MEHTA et al., 2017).

Nesse estudo, foi observada queda de peso nos animais submetidos ao estresse no 10º dia e o retorno ao peso corporal normal no 20º dia de estresse. Segundo Marin et al. (2007) que realizaram um protocolo de estresse de 10 dias de duração utilizando ratos, a perda ponderal caminha para uma adaptação e retorno ao peso corporal normal após alguns dias de estresse. Estudos sugerem que a queda no peso corporal pode estar relacionada com a quantidade de alimentos ingeridos pelos camundongos e ratos, pois a exposição a agentes estressantes pode desencadear um menor consumo de alimentos nesses grupos (MARIN et al., 2007; CRUZ et al., 2012; MEHTA et al., 2017). No entanto, a ingestão de ração não foi avaliada no presente estudo.

Ainda, o fator liberador de CRH, além de regular a atividade do eixo HPA, possui atividade anorexígena. O aumento da atividade do eixo HPA pelo estresse, têm como consequência, o aumento dos níveis de CRH. Diante disso, o CRH, pode agir de duas formas distintas e que se complementam. A primeira delas é pela sua ação aumentando a atividade simpática e diminuindo a parassimpática, o que interfere diretamente nos gastos calóricos, bem como na supressão das respostas termogênicas. Seu segundo mecanismo de ação se dá em resposta a leptina circulante, aumentando assim a ativação dos seus receptores no PVN, o que também favorece a perda de peso (MARANGON, 2011).

Além disso, observou-se aumentos dos níveis de corticosterona nos animais que foram submetidos ao estresse. Esses resultados corroboram os dados

encontrados por Santos (2013), que demonstrou que camundongos *Swiss* expostos ao estresse crônico imprevisível por 11 dias tiveram aumento dos níveis de corticosterona. Outros estudos utilizando ratos Wistar também revelaram o aumento dos níveis de corticosterona em animais submetidos ao estresse crônico imprevisível (LEPSCH et al., 2005; MARIN et al., 2007; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2016).

A corticosterona age diretamente em neurônios dopaminérgicos, potencializando a ação das respostas ao estresse, portanto, indicando uma sensibilidade alterada ao feedback negativo os efeitos dos corticosteroides circulantes. Todavia, alguns autores acreditam que esse aumento pode estar associado a um estado de estresse contínuo, visto que o animal submetido ao estresse imprevisível não pode prever o próximo agente estressor (LEPSCH et al., 2005; MARIN et al., 2007; SANTOS, 2013).

Sabe-se ainda que o estresse crônico imprevisível pode levar a comportamento tipo ansioso, acarretando uma disfunção comportamental em roedores (HU et al., 2017; MEHTA et al., 2017). O teste de labirinto é utilizado para determinar o grau de ansiedade que os animais se encontram. De acordo com esse teste, quanto menor a permanência nos braços abertos, mais ansioso o animal está, pois os ambientes abertos são considerados mais repulsivos (PACHECO, 2013). Nesse trabalho, os animais expostos ao estresse apresentaram uma redução no tempo de permanência nos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado.

O teste de *grooming* avalia o comportamento de autolimpeza do animal, o que pode indicar um maior desalento do animal, denotado pelo aumento da ansiedade (HU et al., 2017). No presente estudo, os animais submetidos ao estresse apresentaram uma maior frequência de *grooming*.

O *head dipping* é um comportamento caracterizado pela frequência que os animais “abaixam a cabeça” (“mergulham”) no labirinto em cruz elevado, e revela a resposta exploratória do animal em um novo ambiente, sendo que, na ansiedade, isso tende a ser prejudicado (TAKEDA et al., 1998). No presente trabalho, o estresse crônico levou a uma redução na frequência de *head dipping*.

Assim, as alterações comportamentais apresentadas, pelos animais do grupo estresse sugerem o desenvolvimento de comportamento ansioso pelo modelo de estresse crônico imprevisível. Esses resultados corroboram outros trabalhos que

mostraram que animais expostos ao mesmo tipo de protocolo utilizado apresentaram parâmetros comportamentais de *grooming*, *head dipping* e permanência nos braços abertos alterados, no sentido de um maior nível de ansiedade (PACHECO, 2013; HU et al., 2017; MEHTA et al., 2017).

O tratamento dos animais submetidos ao estresse com quefir levou a uma diminuição dos níveis de corticosterona, maior tempo de exploração dos braços abertos, bem como diminuição da frequência de *grooming* e *head dipping*. Isso sugere que o quefir reduziu a ansiedade no modelo de estresse crônico imprevisível desenvolvido nesse estudo. Nesse sentido, Noori et al. (2014) demonstraram que o quefir apresenta uma alta concentração de triptofano, que é capaz de atuar revertendo os sintomas do estresse. Eles observaram que os animais que receberam quefir tiveram melhoras no quadro de abstinência provocados pela ausência de nicotina.

Por outro lado, a melhora dos sintomas da ansiedade também pode estar relacionada com a possível modulação intestinal realizada pelos probióticos, por meio do qual haveria melhora do microbioma alterado pela doença. O eixo intestino-cérebro é intimamente conectado e por isso a alteração benéfica do microbioma intestinal traz benefícios para todo o organismo (FOSTER et al., 2013; VEDOVATO et al., 2014; LIU et al., 2015; LUNA et al., 2015; O'MAHONY et al., 2015; MÖRKL et al., 2018; ZORZO, 2020). No entanto, a microbiota dos animais não foi analisada nesse trabalho.

Trabalhos que avaliam modelos de estresse agudo utilizando medicamentos ansiolíticos revelam resultados semelhantes aos observados no presente trabalho (TAKEDA et al., 1998; DALVI et al., 1999). Essas observações, associadas aos resultados comportamentais observados, reforçam a ideia de que o quefir pode reduzir os sintomas do estresse por causar um efeito ansiolítico.

O estresse oxidativo desempenha papel fundamental nas complicações decorrentes do estresse, como descrito anteriormente, pois leva a alterações das taxas metabólicas. As alterações dessas taxas levam a uma desregulação das atividades das enzimas antioxidantes, bem como da peroxidação lipídica (MAHTE et al., 2017; SAMARGHANDIAN et al., 2017; SÁNCHEZ-SOLÍS et al., 2018).

Nesse trabalho, avaliamos a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e os níveis teciduais de GSH. O modelo de estresse desenvolvido não alterou a

atividade de SOD no tecido cardíaco e renal. Estudos anteriores, no entanto, verificaram a diminuição da SOD no tecido cardíaco conforme Sahin et al. (2007) e renal de acordo com Samardghandian et al. (2017) em animais que passaram por estresse de imobilização. Essa discrepância nos resultados pode ser explicada pelas diferenças de protocolos de indução de estresse. Por outro lado, o tratamento com quefir foi capaz de aumentar a atividade da SOD em ambos os tecidos estudados, o que sugere uma melhora do sistema antioxidante pelo probiótico.

Em relação ao aumento da atividade da SOD pelo quefir, nosso resultado está de acordo com Yener et al. (2015), que demonstraram em seu trabalho com modelo de isquemia-reperfusão que os animais tratados com quefir tiveram aumento da atividade da SOD e diminuição dos níveis de MDA no tecido renal, mostrando assim o potencial antioxidante do quefir. Além disso, estudos envolvendo intoxicação alimentar mostraram que o quefir aumenta os níveis de SOD *in vitro* e *in vivo*. O efeito *in vitro* foi analisado através de culturas de células de carcinoma do cólon humano, e o efeito *in vivo*, por meio da análise de amostras de fígado dos animais tratados, sugerindo uma atividade protetora do composto (GOLLI-BENNOUR et al., 2019; GOLLI-BENNOUR et al., 2019).

Ao analisar a atividade da CAT, pode se notar que não houve alterações significativas entre os grupos controle leite e estresse leite. Já os grupos estresse que receberam quefir, apresentaram aumento na atividade da CAT, no tecido cardíaco e renal, em comparação ao grupo estresse e controle leite. Esse resultado indica um possível efeito antioxidante protetor do quefir. Trabalhos anteriores demonstraram que o estresse de imobilização altera a atividade de CAT tanto nos rins como no coração de animais *Wistar* machos (DAVYDOV et al., 2003; SAHIN et al., 2007; SAMARDGHANDIAN et al., 2017).

Os níveis de GSH não foram alterados pelo modelo de estresse ou pelo tratamento com quefir no coração e rim dos animais. Esses resultados diferem de resultados encontrados na literatura, em que há diminuição da GSH no tecido renal e cardíaco de ratos *Wistar* que foram expostos ao protocolo de estresse de imobilização por 15 e 21 dias (SAHIN et al., 2007; SAMARDGHANDIAN et al., 2017). Ainda, trabalhos anteriores demonstraram que o quefir aumentou os níveis de GSH em animais submetidos a protocolos de ulcera gástrica, de estresse oxidativo por tetracloreto de carbono (CCL<sub>4</sub>) e de infarto do miocárdio. Em todas as doenças, houve

uma diminuição nos níveis de atividade de GSH e o quefir foi eficiente para restaurar esses níveis (GÜVEN et al., 2003; HANAN et al., 2015; MERT et al., 2018). Entretanto, a não alteração dos níveis de GSH em nosso estudo pode estar associada ao aumento da atividade de CAT. Isso ocorre porque a CAT age inativando o  $H_2O_2$ , que, por sua vez, também é substrato da GPx, que age reduzindo o  $H_2O_2$  através da oxidação da GSH. Sendo assim, aumentos na atividade de CAT podem ter influenciado na ação da GPx, impedindo alterações dos níveis de GSH, que é seu substrato.

O efeito do quefir de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT dos tecidos cardíaco e renal sugere que ele possa ter ação protetora nesses órgãos, por levar a uma regulação do sistema de defesa antioxidante. Essa regulação pode acontecer pela eliminação de radicais livres e manutenção do equilíbrio redox. Nesse sentido, Samardghandian et al. (2017), verificaram o poder oxidante da curcumina, que apresentou o mesmo efeito de aumento das atividades das enzimas antioxidantes, encontrado com o tratamento com o quefir no presente trabalho.

Além disso, Zhang et al. (2017), em estudo envolvendo indução de estresse oxidativo em ratos por D-galactose, verificaram que, no intestino, houve redução da atividade das enzimas antioxidantes. Porém, o tratamento com um exopolissacarídeo de quefir atenuou esse quadro, sendo seu efeito dependente da dose. Outro trabalho também verificou a capacidade antioxidante total das enzimas no intestino de camundongos tratados apenas com quefir e observou que o tratamento elevou a atividade antioxidante e diminuiu os níveis de MDA (ERDOGAN et al., 2019).

O estresse oxidativo leva a oxidação dos lipídios, o que acarreta em grande prejuízo às membranas celulares. A degradação de lipídios insaturados forma principalmente MDA, que pode ser medido utilizando o ensaio de TBARS, que detecta substâncias reativas ao TBA (JASCOLKA, 2010; PISOSCHI et al., 2015). Sahin et al. (2007) encontraram aumento nos níveis de TBARS em ratos que foram submetidos ao protocolo de estresse de imobilização por 15 dias. Outro trabalho também encontrou elevação dos níveis de TBARS medido por espectrofotômetro no tecido renal de ratos exposto ao modelo de estresse de restrição por 21 dias (SAMARDGHANDIAN et al., 2017).

No presente estudo, no entanto, não foi possível observar alteração no TBARS no coração e rim de nenhum dos grupos estudados. A não alteração dos níveis de

TBARS nos nossos resultados pode estar associada ao aumento na atividade das enzimas antioxidantes encontrados no presente estudo. A técnica de TBARS, entretanto, possui baixa especificidade. O TBA reage com uma grande variedade de compostos, como açúcares, aminoácidos, uma variedade de aldeídos e bilirrubina, produzindo interferência nos ensaios colorimétricos e medições fluorimétricas do MDA (KNIGHT et al., 1988; VALENZUELA et al., 1991).

Outro marcador de lesão oxidativa tecidual estudado foi a 3-nitrotirosina. Como citado anteriormente, o NO reage com o  $O_2^-$ , formando o  $ONOO^-$ , que realiza a nitração da tirosina de proteínas teciduais, alterando suas funções. Esse aumento de  $NOO^-$  tem sido associado a várias patologias como diabetes, distúrbios neurodegenerativos e doenças vasculares (LIU et al., 2010). No presente trabalho, não foi possível observar alterações nos níveis de 3-nitrotirosina no tecido cardíaco dos animais estudados. Porém, no tecido renal, observou-se que a indução do estresse aumentou os níveis de 3-nitrotirosina em relação aos grupos controles. O tratamento com o quefir, no entanto, não foi capaz de reduzir essa alteração. Piroddi et al. (2011), em seu estudo com pacientes com doença renal crônica, observaram maiores níveis de 3-nitrotirosina e inflamação crônica. Esses resultados corroboram os resultados encontrados no presente estudo, visto que o estresse pode desencadear alterações que levam ao desenvolvimento de doenças renais (DHALLA et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2010; RAVAROTTO et al., 2018).

Estudos sugerem que as ERO, especialmente  $ONOO^-$ , podem causar a ativação das MMPs pela ruptura da ligação entre o pró-peptídeo inibitório e o sítio catalítico da enzima (KANDASAMY et al., 2010). Ademais, o aumento do estresse oxidativo também está envolvido com alterações nos níveis de MMP-2. Por isso, realizamos a análise dos níveis de MMP-2 por zimografia e também por imunistoquímica. As MMP-2, na sua forma de 72KDa, é capaz de degradar o colágeno intersticial desnaturado tipo I, estando presente em diversas doenças. Quando há uma regulação positiva da via pode ocorrer o surgimento de doenças neurológicas ou até mesmo, aneurisma da aorta, bem como desenvolvimento de processos inflamatórios ou doenças cardiovasculares e renais (ALI et al., 2012; GARCIA et al., 2016; HENRIET et al., 2019).

No tecido cardíaco, tanto o estresse quanto o quefir não alteraram os níveis de MMP-2 observados pelas técnicas de zimografia e imunistoquímica. Esse resultado já poderia ser considerado esperado, uma vez que não encontramos aumento de estresse oxidativo nesse tecido pelas técnicas de TBARS e 3-nitrotirosina. SEVIN et al. (2013), observaram aumento nos níveis de MMP-2 no coração de coelhos que foram submetidos a um modelo de estresse oxidativo por depleção de GSH.

Ao avaliar o tecido renal, observamos aumentos nos níveis de MMP-2 nos animais que foram submetidos ao estresse em relação ao grupo controle e o tratamento com o quefir foi capaz de reverter esses danos. Esse corrobora com o aumento de 3-nitrotirosina encontrado nesse tecido, um indicador da ação do ONOO<sup>-</sup>. O tratamento com quefir, no entanto, diminuiu os níveis de MMP-2, sem alterar os níveis de 3-nitrotirosina, o que sugere que outros fatores podem estar influenciando essa diminuição de MMP-2 observada no tratamento com quefir, como a ativação das enzimas antioxidantes SOD e CAT observada nesse grupo.

Estudo anterior utilizando um modelo de lesão renal em ratos observou aumento nos níveis de MMP-2, o que corrobora os nossos resultados. Além disso, o tratamento de animais com taurina ou curcumina, que são compostos anti-inflamatórios e antioxidantes, foi capaz de reduzir os níveis de MMP-2, assim como o tratamento com quefir em nosso estudo. Desse modo, é possível que o quefir possa agir inibindo a MMP-2 de forma semelhante a taurina ou a curcumina, que apresentam sua ação intimamente ligada ao seu poder antioxidante (CAVDAR et al., 2017; HU et al., 2018).

Por fim, analisamos o efeito do estresse e do tratamento com quefir sobre a função renal. A ureia é principal produto de excreção do metabolismo proteico e acumula no plasma quando há disfunção renal (SODRÈ et al., 2007). Nesse trabalho, não foram observadas alterações nos valores de ureia no plasma dos animais que foram submetidos ao estresse crônico tratados ou não com quefir. Estudo anterior com modelo de diabetes, observou um aumento dos níveis de ureia nos animais doentes, sendo que o uso do quefir diminuiu esses níveis (PUNARO et al., 2014).

Nos níveis plasmáticos de creatinina, houve uma tendência a aumento no grupo estresse quando comparados ao controle, mas não foi encontrada diferença significativa. No entanto, o tratamento com quefir levou a uma redução nos níveis de

creatinina nos animais controle e estresse. A creatinina sérica é utilizada para avaliar a taxa de filtração glomerular, sendo que alterações nos seus níveis podem estar associadas a diversas doenças como: baixa massa muscular em estados avançados, doença hepática, depuração renal diminuída, entre outros (THONGPRAYOON et al., 2016). Essa queda nos valores da creatinina abaixo dos níveis encontrados nos animais controle sugere uma proteção do composto na função renal desses animais. Sendo que, essa proteção pode estar associada com o aumento da atividade das enzimas antioxidantes decorrente do consumo do quefir.

O aumento dos níveis de 3-nitrotirosina encontrado nos rins dos animais que passaram pelo estresse pode indicar uma lesão renal em estágio inicial, não detectada pelos outros ensaios de ureia e creatinina utilizados. Uma limitação desse estudo foi a não realização do teste de albuminúria, que é um marcador de dano renal inicial (JOHNSON et al., 2012; LEVEY et al., 2015). PUNARO et al. (2014), utilizando ratos *Wistar* diabéticos, demonstraram que o tratamento com o quefir normalizou os valores de creatinina nos animais diabéticos, mas não interferiu nos valores dos animais controles. Em outro trabalho, animais hipertensos tratados com quefir em baixa dose apresentaram melhora dos níveis de creatinina (KANBAK et al., 2014), sem mudança no valor de creatinina dos controles.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, o modelo de estresse crônico imprevisível foi capaz de alterar os parâmetros de ansiedade analisados e os níveis de corticosterona no sentido de maior nível de ansiedade. Diante disso, o protocolo foi eficiente em gerar um comportamento do tipo ansioso e o quefir atuou como ansiolítico, restaurando os danos causados pelo estresse. Além disso, o modelo de estresse crônico imprevisível desenvolvido não foi capaz de alterar a atividade de CAT, SOD e os níveis de GSH e TBARS no coração dos animais estudados. Porém, no tecido renal o modelo aumentou os níveis de 3-nitrotirosina e de MMP-2. Esses resultados indicam que o modelo desenvolvido não elevou o estresse oxidativo em níveis necessários para o desenvolvimento de lesões cardíacas observáveis pelas técnicas utilizadas. Porém, os resultados demonstrados nos níveis de MMP-2 e 3-nitrotirosina no rim sugerem o início do desenvolvimento de uma disfunção renal, que não pôde ser detectada nos testes de ureia e creatinina realizados. O tratamento com quefir foi capaz de aumentar a defesa antioxidante nos animais que passaram por estresse e de animais controles, além de diminuir os níveis de creatinina dos animais controle, o que sugere uma proteção da função renal pelo probiótico.

Portanto, o quefir pode apresentar efeito benéfico por aumentar a defesa antioxidante quando há uma alteração já instalada e proteger o organismo contra uma possível doença, além de, apresentar efeito ansiolítico frente a condições estressoras.

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALI, M. A. M. et al. Calpain inhibitors exhibit matrix metalloproteinase-2 inhibitory activity. **Biochemical and Biophysical research communications**, v. 423, p.1-5, 2012.

ATWOLI, L. et al. Epidemiology of posttraumatic stress disorder: prevalence, correlates and consequences. **Curr Opin Psychiatry**, v. 28, n. 4, p. 307-311, July 2015.

BARBOZA, K. R. et al. Gastroprotective effect of oral kefir on indomethacin-induced acute gastric lesions in mice: Impact on oxidative stress. **Life Sciences**, v. 209, p. 370-376, 2018.

BERGMANN, R. S. O. et al. Microbial profile of a kefir sample preparations: Grains in natural and lyophilized and fermented suspension. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 1022–1026, 2010.

BRASIL, G. A. et al. The benefits of soluble non-bacterial fraction of kefir on blood pressure and cardiac hypertrophy in hypertensive rats are mediated by an increase in baroreflex sensitivity and decrease in angiotensin-converting enzyme activity. **Nutrition**, v. 51-52, p. 66-72, 2018.

CARMASSI, C. et al. Frequency of trauma exposure and post-traumatic stress disorders in Italy: Analysis from the world mental health survey initiative. **J Psychiatric Res.**, v. 59, p. 77-84, Dec. 2014.

CARVALHO, L. F. P. **Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com endometriose pélvica**, 2012. 138f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2012.

CASTRO, M. M. et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. **Atherosclerosis**, v. 198, n. 2, p. 320-331, June 2008.

CAVDAR, Z. et al. Protective effects of taurine against renal ischemia/reperfusion injury in rats by inhibition of gelatinases, MMP-2 and MMP-9, and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 92, n. 7, p. 524-535, 2017.

CERON, C. S. et al. Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. **Br J Pharmacol**, v. 160, n. 1, p. 77-87, May 2010.

CEZÁRIO, C. **Sensibilização cruzada entre estresse e nicotina**. 2012. 31f. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Departamento de Farmácia-Bioquímica, Faculdades de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Araraquara, 2012.

CNUBBEN, N. H. et al. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 10, n. 4, p. 141-152, 2001.

CRUZ, F. C.; MARIN, M. T.; LEÃO, R. M.; PLANETA, C. S. Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, p. 19-23, 2012.

CRUZ, F. C. Effects of chronic stress on nicotine-induced locomotor activity and corticosterone release in adult and adolescent rats. **Addiction Biology**, v. 13, p. 63-69, 2008.

DALVI, A.; RODGERS, J. Behavioral effects of Diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism if enhanced head dipping but not the disinhibition of open-arm avoidance. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 62, n. 4, p. 772-734, 1999.

DAVYDOV, V. V.; SHVETS, V. N. Age-dependent differences in the stimulation of lipid peroxidation in the heart of rats during immobilization stress. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 693-698, 2003.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **J Hypertens**, v. 18, n. 6, p. 655-673, June 2000.

ERDOGAN, F. S. et al. The effect of Kefir produced from natural Kefir grains on the intestinal microbial populations and antioxidant capacities of Balb/c mice. **Food Research International**, v. 115, p. 408-413, 2019.

FAHMY, H. A.; ISMAIL, A. F. Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats. **J Photochem Photobiol B**, v. 144, p. 85-93, 2015.

FOSTER, J. A. Gut -brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 05, 2013.

GARCIA, V. P. et al. Exogenous L-arginine reduces matrix metalloproteinase-2 and -9 activities and oxidative stress in patients with hypertension. **Life Science**, v. 157, p. 125-130, 2016.

GUIMARÃES, D. A. et al. Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? **Ver Bras. Hipertensão**, v. 17, n. 4, p. 226-230, 2010.

GRIENGLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO\_FUKAI, M. "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." **Circ Res**, v. 86, n. 5, p. 491-501, 2000.

GOLLI-BENNOUR, E. E. et al. Protective effects of kefir against deltamethrin-induced hepatotoxicity in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 18856-18865, 2019.

GOLLI-BENNOUR, E. E. et al. Protective effects of kefir against zearalenone toxicity mediated by oxidative stress in cultured HCT-116 cells. **Toxicon**, v. 157, p. 25-34, 2019.

GÜVEN, A. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride- induced mice tissues. **J. Vet. Med B.**, v. 50, p. 412-416, 2003.

HANAN, A. F.; AMEL, F. M. I. Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 144, p. 85-93, 2015.

HENRIET, P.; EMONARD, H. Matrix metalloproteinase-2: Not (just) a "hero" of the past. **Biochimie**, v. 166, p. 223-232, 2019.

HERMAN, J. P. et al. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. **ComprPhysiol**, v. 6, n. 2, p. 603-621, 2016.

HU, C. et al. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **Plos One**, Sept 2017.

HU, J. et al. An E-selectin targeting and MMP-2- responsive dextran-curcumin polymeric prodrug for targeted therapy of acute kidney injury. **Biomaterials Science**, v. 6, p. 3397-3409, 2018.

HU, J. et al. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 6, p. 480-498, jun. 2007.

JASCOLKA, T. L. **Efeitos do quefir no perfil lipídico, estresse oxidativo e aterosclerose de camundongos deficientes em Apoliproteína E**, 2010. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

JOHNSON, D. W. et al. Chronic Kidney disease and measurement of albuminuria or proteinuria: a position statement. **Clinical Focus**, v. 197, n. 4, 2012.

LAGRAAUW, H. M. 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, 2015

LEITE, A. M. et al. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **J Dairy Sci**, v. 96, p. 4149-4159, 2013.

LEPSCH, L. B. et al. Exposure to chronic stress increases the locomotor response to cocaine and the basal levels of corticosterone in adolescent rats. **Addiction Biology**, V. 10, p. 251-256, 2005.

LEVEY, A. S. et al. Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. **Jama**, v. 313, n. 8, p. 837-846, 2015.

LIMA, A. P. N. **Efeitos do estresse agudo de contenção sobre a caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas em camundongos Balb/c**.2014. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

LIU, X. et al. Modulation of gut microbiota- brain axis by probiotics, prebiotics and diet. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, p. 7885-7895, 2015.

LIU, Y., et al. Fasting induces a high level of 3-nitrotyrosine in the brain of rats. **Neuroscience Letters**, v. 472, p. 204-209, 2010.

LOGAN, J. G.; BARKSDALE, J. D. Allostasis and allostatic load: expanding the discourse on stress and cardiovascular disease. **Journal Compilation**, 2008.

LÓPEZ-LÓPEZ, A. L. et al. Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. **Physiology & Behavior**, v. 161, p. 15-23, 2016.

LUNA, R. A.; FOSTER, J. A. Gut brain axis: diet microbiota interactions an implication for modulation of anxiety and depression. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 35-41, 2015.

MAEDA, H.; ZHU, X.; MITSUOKA, T. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) from *Lactobacillus kefirano faciens* on blood glucose in KKAY mice and constipation in SD rats induced by a low-fiber diet. **Biosci. Microflora**, v. 23, p. 149–153, 2004.

MARANGON, Paula Beatriz. **Participação do fator liberador de corticotrofina nos efeitos do estradiol no controle da homeostase energética**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MARIN, M. T. et al. Chronic restriction or variable stresses differently affect the behavior corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiology & Behavior**, v. 90, p. 29-35, 2007.

MARCON, M. et.al Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. **Psychopharmacology**, v. 233, p. 3815-3824, 2016.

MARTINEZ, M. L. et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats. **Eur J Pharmacol**, v. 591, n. 1-3, p. 224-230, Sept. 2008.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research Interactive**, p. 172-189, 2000.

MEHTA, V. et al. Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and inflammatory stress. **Physiology & Behavior**, v 171, p. 69-78, 2017.

MERT, H. et al. Investigation of the protective effect of kefir against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. **Korean Journal for Food Science of Animal's Resources**, v. 38, n. 2, p. 259-272, 2018.

MILIK, E. et al. Effect of chronic mild stress on AT1 receptor messenger RNA expression in the brain and kidney of rats. **Psychosomatic Medicine**, v. 78, p. 208-220, 2016.

MOREIRA, M. E. C et al. Atividade anti-inflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1738-1742, 2008.

MÖRKEL, S. et al. The role of nutrition and the gut-brain axis in psychiatry: a review of the literature. **Neuropsychobiology**, v. 79, p. 80-88, 2020.

NEUMEISTER, A. Depleção de triptofano, serotonina e depressão: onde estamos? **Psychopharmacol Bull**, v. 37, p. 99-115, 2002

NOORI, N. et al. Kefir protective effects against nicotine cessation-induced anxiety and cognition impairments in rats. **Adv. Biomed Res.**, v. 3, 2014.

OSMONOVIC-THUNSTRÖM, A. et al. Do levels of perceived stress increase with increasing age after age 65? A population-based study. **Age and Ageing**, v. 44, p. 828-834, 2015.

O'MAHONY, S. M. et al. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. **Behavioral Brain Research**, v. 277, p. 32-48, 2015.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocr Ver**, v. 22, n. 4, p. 502-48, 2001.

PACHECO, Larissa Helena Lobo Torres. **Avaliação do desenvolvimento do sistema nervoso central de camundongos Balb/c expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal**. 2013. 133 f. Tese (Doutorado em Toxicologia) -

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PEREIRA, A. C. et al. The role of MMP-2 and MMP-9 in the development of squamous cell carcinoma. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 3, p.257-262, 2006.

PIMENTA, F. S. et al. Mechanisms of action of kefir in chronic cardiovascular and metabolic diseases. **Cell Physiol Biochem**, v. 48, p. 1901-1914, 2018.

PIRODDI, M. et al. Plasma nitroproteome of kidney disease patients. **Amino Acids**, v. 40, p. 653-667, 2011.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, abr. 2015.

PUNARO, G.R. et al. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. **Nitric Oxide**, v. 37, p. 53-60, 2014.

KANBAK, G. et al. Effect of Kefir and low-dose aspirin on arterial blood pressure measurements and renal apoptosis in hypertensive rats with 4 weeks salt diet. **Hypertension**, v. 36, n. 1, p. 1-8, 2014.

RAMBO, C.L. et al. Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. **Physiology & Behavior**, v. 171, p. 50-54, 2017.

RAVAROTTO, V. et al. Oxidative stress - chronic kidney disease - cardiovascular disease: A vicious circle. **Life Sci**, v. 210, p. 125-131, 2018.

RODRIGUEZ, D. L. et al. Evaluation of the brain and kidney renin-angiotensin system and oxidative stress in neonatal handled rats. **Developmental Psychobiology**, v. 54, p. 706-713, 2012.

RODRIGUES, K. L. **Propriedades anti-inflamatória e antiulcerogênica de uma cerveja fermentada unicamente por grãos de quefir**. 2016.88f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

ROSA, D. et al. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutr Res Ver**, v. 30, p. 82-96, 2017

SAHIN, E.; GÜMÜSLÜ, S. Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 144, p. 342-347, 2007.

SALTHOUSE, T. A. When does age-related cognitive decline begin? **Neurobiol Aging**, v. 30, n. 4, p. 507-514, 2009.

SANTOS, J. R. B. **Participação da enzima nNOS na sensibilização cruzada entre estresse e etanol em camundongos swiss**. 2013. 94f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SÁNCHEZ-SOLÍS, C. N. et al. Morphometric changes and AQP2 expression in kidneys of young male rats exposed to chronic stress and a high-sucrose diet. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1098-1105, 2018.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, V. 87, p. 223-229, 2017.

SEVIN, G. et al. Taurine inhibits increased MMP-2 expression in a model of oxidative stress induced by glutathione depletion in rabbit heart. **European Journal of Pharmacology**, v. 706, p. 98-106, 2013.

STEPTOE, A.; KIVIMÄKI, M. Stress and cardiovascular disease. **Rev. Cardiol.**, v. 9, p. 360-370, April.2012.

SIMAS, B. B et al. Cardiovascular and metabolic consequences of the association between chronic stress and high-fat diet in rats. **Stress**, v. 21, p. 247-256, 2018.

SIMPLICIO, J. A. et al. Contribution of oxidative stress and prostanoids in endothelial dysfunction induced by chronic fluoxetine treatment. **VacPharmacol**, v. 73, p. 124-137, 2015.

SODRÈ, F. L. et al. Evaluation of renal function and damage: a laboratorial challenge. **J.Bras. Patol. Lab**, v. 43, n. 5, p. 329-337, 2007.

TABUCHI, M. et al. Antidiabetic effect of Lactobacillus GG in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biosci. Biotechnology. Biochem**, v. 67, p. 1421–1424, 2013.

TAKEDA, H. et al. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 350, p. 21-29, 1998.

THONGPRAYOON, C. et al. Serum creatinine level, a surrogate of muscle mass, predicts mortality in critically ill patients. **Perspective**, p. 305-311, 2016.

LAB4- Protocolo. In: CURSO DE VERÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 15., 2020, São Paulo. [ANAIIS...] São Paulo: Departamento de Química, Universidade de São Paulo, 2020. Disponível em <[http://cursobioquimica.iq.usp.br/paginas\\_view.php?idPagina=172&idTopico=656#.XsV6D2hKjIV](http://cursobioquimica.iq.usp.br/paginas_view.php?idPagina=172&idTopico=656#.XsV6D2hKjIV)>. Acesso em: 20 May 2020

VALENZUELA, A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. **Life Sci**, v. 48, n. 4, p. 301-9, 1991.

VALKO, M. et al. Free radicals and anti-oxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VEDOVATO, K. et al. O eixo intestino-cérebro e o papel da serotonina. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, v. 18, n. 1, p. 33-42, Jan/Apr. 2014.

ZHANG, J. et al. Antioxidant status and gut microbiota change in an aging mouse model as influenced by exopolysaccharide produced by Lactobacillus plantarum YW11 isolated from Tibetan Kefir. **J. Dairy**, v. 100, n. 8, p. 6025-6041, 2017.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P. R. Oral administration of dahi containing probiotic Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. **J. Dairy Res**, v. 75, p. 189–195, 2008.

YENER, A. U. et al. Effects of kefir on ischemia-reperfusion injury. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, p. 887-896, 2015.

ZORZO, R. A. Impact of the intestinal microbiome Brain-intestine axis. **International Journal of Nutrology**, v. 10, n. 1, p. 298-305, 2017.

KANDASAMY, A. et al. Matriz metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. **Cardiovascular Research**, v. 85, n. 3, p. 413-423, 2010.

KNIGHT, J. A. et al. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. **Clin Chem**, v. 34, n. 12, p. 2433-2438, 1988.

## ANEXO A -CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA/UNIFAL



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas/MG. CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL**



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do quefir nas alterações cardiovasculares, intestinais e renais induzidas por modelo de estresse crônico em camundongos", registrada com o nº 61/2018, sob a responsabilidade de Carla Speroni Ceron, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	( ) Ensino	(X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 15/02/2019 a 07/01/2021	
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico	
Nº de animais	60	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central da UNIFAL	

Alfenas, 15 de Fevereiro de 2019.

  
 Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG