

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO-UFES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**BRENNALÉPAUSMONTEIRO**

**EFEITOS DO KEFIR NA REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS COM  
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C**

**VITÓRIA**

**2017**

**BRENNALEPAUS MONTEIRO**

**EFEITOS DO KEFIR NA REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS COM  
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof Dr Elisardo Corral Vasquez

Coorientador: Profª Drª Bianca Prandi Campagno

VITÓRIA

2017

BRENNA LEPAUS MONTEIRO

**EFEITOS DO KEFIR NA REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS COM  
HIPERTENSÃO RENOVASULAR 2R1C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Elisardo Corral Vasquez (Orientador – UFES)**

---

**Bianca Prandi Campagnaro (Coorientador – UVV)**

---

**Thiago Melo Costa Pereira (UVV)**

---

**Agata Lages Gava (UFES)**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Monteiro, Brenna Lepaus

Efeitos do kefir na reatividade vascular de ratos com hipertensão renovascular.  
Vitoria, 2017.

80f. : il.

Orientador: Elisardo Corral Vasquez

Coorientadora: Bianca Prandi Campagnaro

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Espírito  
Santo, Centro de Ciências da Saude.

1. Hipertensão renovascular. 2.Kefir. 3.Disfunção endotelial. 4.Angiotensina II.
1. Enzima Conversora de Angiotensina. 6. Estresse oxidativo

I. Vasquez, Elisardo Corral. II.Campagnar, Bianca Prandi. III. Universidade Federal  
do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612

---

## DEDICATÓRIA

A Deus, pela força, direção e Seu imensurável amor que me deu todos os dias vontade de prosseguir mesmo em meio as dificuldades. Aos meus pais, por terem me educado e ajudado em cada etapa da minha vida e ao meu esposo pelo amor e paciência. Vocês são aquilo que tenho de mais importante em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pois em qualquer situação pude sentir que esteve comigo e tenho certeza que ouviu cada oração silenciosa. Sem o Seu amor eu não seria nada do que sou.

Aos meus pais, Rogério e Rosana, todas as palavras que eu venha a dizer seriam pouco para agradecer a vocês pela educação que me deram. Obrigada pela paciência que tiveram comigo todos esses anos e por terem apoiado cada sonho meu, inclusive o de fazer mestrado. Sinto todo o amor e gratidão do mundo por vocês.

A minha irmã Brunella, que mesmo com tantos afazeres sempre me deu apoio nos estudos. Obrigada pelas palavras de sabedoria e por ter me dado a sobrinha mais linda desse mundo.

Ao meu esposo Joabe, que desde a época de namoro me incentiva nos estudos e me ajuda de todas as formas possíveis com muito amor e compreensão. Durante o mestrado compartilhamos muitos momentos, alguns deles difíceis, obrigada por me aturar nos momentos de estresse com as provas e afazeres do laboratório e nas ausências que eventualmente aconteciam por sempre ter que estudar até mesmo nos finais de semana. O seu amor é um lindo presente de Deus, e espero compartilhar muitas outras conquistas com você e que possamos crescer e aprender juntos.

Ao professor Dr. Elisardo Corral Vasquez, por ter me acolhido de braços abertos no laboratório e ter me dado a honra de ser orientada por ele. O senhor é um exemplo de ser humano e todos os seus ensinamentos me foram muito valiosos. É certo que guardarei todos eles por toda a vida. Agradeço muito por tudo!

A professora Dr<sup>a</sup> Silvana dos Santos Meyrelles, por também ter me recebido tão bem no laboratório, estando sempre disposta a ajudar e por aliviar muitas vezes o ambiente do laboratório com seu bom humor e alegria contagiantes.

A Professora Dra. Bianca Prandi Campagnaro pela co-orientação, por ter separado um tempo e me ajudado na citometria, na escrita do artigo e dessa dissertação. Muito obrigada por seus ensinamentos e dedicação.

Aos alunos de doutorado, Marcos e Ananda, que me ajudaram com os protocolos, estando sempre dispostos a esclarecer minhas dúvidas e me acompanhar nos experimentos. Obrigada pela ajuda, pelas ideias e principalmente, pela paciência que tiveram comigo.

Aos alunos de iniciação científica, em especial a Rossana, Thamirys e Arthur Roberto, que me ajudaram com meus animais e com os experimentos sempre que o dia estava corrido. Sou muita grata e desejo muito sucesso para vocês.

Aos meus colegas do Laboratório de Fisiologia Translacional, Brunella, Jamila, Victor, Vinicius, Thaís, Eduardo, Bruna, Giselle, Andreia e a todos os integrantes do laboratório que fizeram parte do meu mestrado de alguma forma. Foi muito bom dividir esta etapa da minha vida com vocês.

A professora Dr<sup>a</sup> Dulce Elena Casarini e ao aluno de doutorado Rodrigo Yokota da UNIFESP pela ajuda na dosagem das angiotensinas e atividade da ECA.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da UFES.

## RESUMO

Dentre as características da hipertensão renovascular podemos destacar o estresse oxidativo e a disfunção endotelial. Objetivo: avaliar efeitos do kefir na disfunção endotelial de ratos com hipertensão renovascular. Metodologia: Ratos Wistar foram divididos em 3 grupos Sham, 2R1C e 2R1C-Kefir tratados por 60 dias com Kefir (0,3ml/100g), por gavagem. A pressão dos animais foi acompanhada durante o tratamento através da pletismografia de cauda e ao final do tratamento os animais foram submetidos ao registro de PA direta. A aorta foi usada na construção de curvas dose-resposta à Acetilcolina (ACh) ou Nitroprussiato de sódio (NPS), e Fenilefrina (Phe). Os rins foram retirados e usados para dosagem de angiotensina I, II e 1-7 e atividade da ECA (Enzima conversora de angiotensina). As aortas e o sangue total foram usados na análise do estresse oxidativo usando a citometria de fluxo. Os valores indicam a média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham; #  $P < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C. Resultados: O grupo 2R1C apresentou PAS, PAD, PAM ( $203 \pm 11$ ,  $129 \pm 4$ ,  $179 \pm 6$  mmHg) mais elevadas do que o grupo sham ( $139 \pm 11$ ,  $67 \pm 5$ ,  $94 \pm 2$ ). Nos ratos tratados com Kefir a PAS, PAD e PAM diminuiu significativamente quando comparados com o grupo 2R1C ( $180 \pm 11$ ,  $89 \pm 7$ ,  $128 \pm 4$  mmHg). Os animais do grupo 2R1C apresentaram disfunção endotelial, que foi observada na curva de relaxamento dependente do endotélio (Rmáx:  $56 \pm 4\%$ \*) quando comparados aos controles (Rmáx:  $85 \pm 4\%$ ), e o tratamento com kefir foi capaz de reverter essa disfunção (Rmáx:  $72 \pm 5\%$ #). Também foi observado disfunção do músculo liso vascular na curva de NPS no grupo 2R1C (Rmáx:  $87 \pm 3\%$ \*) em relação ao grupo sham (Rmáx:  $96 \pm 2\%$ ), e o tratamento com kefir não foi capaz de restaurar essa disfunção (Rmáx:  $90 \pm 3\%$ ). O grupo 2R1C mostrou hiperreatividade (Rmáx:  $80 \pm 2\%$ \*) na curva com Phe em relação ao grupo sham (Rmáx:  $73 \pm 2\%$ ), e o tratamento com kefir também não diminuiu essa respostas nos animais hipertensos tratados (Rmáx:  $86 \pm 3\%$ ). O papel do NO e dos prostanoídes foi verificado realizando o bloqueio com L-NAME e Indometacina e observamos que o relaxamento à ACh nos animais 2R1C estavam diminuídos (dAUC: NO:  $162 \pm 9$  \*; Prostanoides:  $86 \pm 6$  a.u.) quando comparados aos controles (dAUC: NO:  $255 \pm 11$



\*; Prostanoides:  $29 \pm 0,2^*$  a.u.) e foi restabelecido nos animais tratados (NO:  $247 \pm 8^{\#}$ ; Prostanoides:  $54 \pm 2^{\#}$  a.u.). Observamos também que houve participação de ERO's na disfunção dos animais hipertensos (dAUC:  $92 \pm 11^*$ ), quando comparados com os animais normotensos (dAUC:  $1,2 \pm 0,02$ ), e semelhante o kefir restabeleceu os níveis de ERO's nos animais tratados (dAUC:  $40 \pm 6^{\#}$ ). Na análise do estresse oxidativo na aorta e no sangue realizado pela citometria de fluxo, observamos que os animais 2R1C apresentaram aumento na produção de ERO's no sangue ( $\bullet O_2^-$ :  $1771 \pm 32$ ,  $H_2O_2$ :  $562 \pm 41$  a.u.) e na aorta ( $\bullet O_2^-$ :  $551 \pm 42$ ,  $H_2O_2$ :  $929 \pm 86$  a.u.) quando comparamos ao grupo sham ( $\bullet O_2^-$ :  $251 \pm 5$ ,  $H_2O_2$ :  $516 \pm 60$  a.u. sangue) ( $\bullet O_2^-$ :  $1129 \pm 85$ ,  $H_2O_2$ :  $191 \pm 2$  a.u. aorta) e o tratamento com kefir foi capaz de promover diminuição da produção dessas espécies no sangue ( $\bullet O_2^-$ :  $260 \pm 60$ ,  $H_2O_2$ :  $370 \pm 64$  a.u.) e na aorta ( $\bullet O_2^-$ :  $1080 \pm 70$ ,  $H_2O_2$ :  $198 \pm 11$  a.u.). A atividade da ECA apresentou-se aumentada no soro ( $174 \pm 11$  nmon/min/mg) e no rim não clipado ( $0,48 \pm 0,04$  nmon/min/mg) de ratos 2R1C quando comparado com o grupo sham ( $151 \pm 6$  nmon/min/mg soro e  $0,35 \pm 0,03$  nmon/min/mg rim não clipado). O tratamento com kefir diminuiu a atividade da enzima ( $148 \pm 8$  nmon/min/mg soro;  $0,31 \pm 0,01$  nmon/min/mg rim não clipado). Logo, podemos concluir que o tratamento com kefir durante 60 dias em ratos com hipertensão renovascular apresenta vários efeitos benéficos, atenuando a hipertensão, melhorando a disfunção endotelial e o estresse oxidativo, como também diminuindo a atividade da ECA.

Palavras-chave: Hipertensão renovascular, Kefir, Disfunção endotelial, Angiotensina II, Enzima Conversora de Angiotensina, Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Among the characteristics of renovascular hypertension we can highlight oxidative stress and endothelial dysfunction. Objective: To evaluate the effects of kefir on the endothelial dysfunction of rats with renovascular hypertension. Method: Wistar rats were divided into 3 groups Sham, 2K1C and 2K1C-Kefir treated for 60 days with Kefir (0.3ml/100g), by oral gavage. The arterial pressure was monitored during treatment through tail plethysmography and at the end of treatment the animals were submitted to direct PA recording. The aorta was used in the construction of dose-response curves to Acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (NPS), and Phenylephrine (Phe). Kidneys were removed and used for angiotensin I, II and 1-7 analysis and ACE (angiotensin converting enzyme) activity. Aortas were used for oxidative stress analysis using flow cytometry. Values indicate the mean  $\pm$  SEM. \* P <0.05 compared to the Sham group; # P <0.05 relative to the 2K1C group. RESULTS: The 2K1C group had higher SBP, DBP, MAP ( $203 \pm 11$ ,  $129 \pm 4$ ,  $179 \pm 6$  mmHg) than the sham group ( $139 \pm 11$ ,  $67 \pm 5$ ,  $94 \pm 2$ ). In the Kefir-treated rats the PAS, PAD and PAM decreased significantly when compared to the 2R1C group ( $180 \pm 11$ ,  $89 \pm 7$ ,  $128 \pm 4$  mmHg). The animals in the 2K1C group presented endothelial dysfunction, which was observed in the relaxation curve endothelium-dependent (Rmax:  $56 \pm 4\%$  \*) when compared to controls (Rmax:  $85 \pm 4\%$ ), and kefir treatment was able to reverse this dysfunction (Rmax:  $72 \pm 5\%$  #). Vascular smooth muscle dysfunction was also observed in the NPS curve in the 2K1C group (Rmax:  $87 \pm 3\%$  \*) compared to the sham group (Rmax:  $96 \pm 2\%$ ), and kefir treatment failed to restore this dysfunction (Rmax:  $90 \pm 3\%$ ). The 2K1C group showed increased the response to phenylephrine (Rmax:  $80 \pm 2\%$  \*) when compared to sham group (Rmax:  $73 \pm 2\%$ ), and kefir treatment also did not decrease these responses in treated hypertensive animals (Rmax:  $86 \pm 3\%$ ). The role of NO and Prostanoids was verified by blocking with L-NAME and Indomethacin and we observed that relaxation to ACh in 2R1C animals was decreased (dAUC: NO:  $162 \pm 9$  \*; Prostanoids:  $86 \pm 6$  \* au ) As compared to controls (dAUC: NO:  $255 \pm 11$  \*, Prostanoids:  $29 \pm 0.2$  \* au) and

restored in kefir-treated animals (NO:  $247 \pm 8$  #; Prostanoids:  $54 \pm 2\%$  au). We also observed that ERO'S participation in the dysfunction of hypertensive animals (dAUC:  $92 \pm 11$  \*), when compared with normotensive animals (dAUC:  $1.2 \pm 0.02$ ), and similarly, kefir reestablished ERO levels in the treated animals (dAUC:  $40 \pm 6\%$ ). In the analysis of oxidative stress in the aorta and blood performed by flow cytometry, we observed that 2K1C animals showed an increase in the production of ROS in the blood (O-2:  $1771 \pm 32$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $562 \pm 41$  a.u) and in the aorta (O-2:  $551 \pm 42$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $929 \pm 86$  a.u) when compared to the sham group (• O-2:  $251 \pm 5$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $516 \pm 60$  a.u blood) (•O-2:  $1129 \pm 85$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $191 \pm 2$  a.u aorta) and kefir treatment was able to decrease the production of these species in the blood (• O-2:  $260 \pm 60$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $370 \pm 64$  a.u) and in the aorta O-2:  $1080 \pm 70$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  $198 \pm 11$  a.u). ACE activity was higher in serum ( $174 \pm 11$  nmol/min/ mg) and in the non-clipped kidney ( $0.48 \pm 0.04$  nmol/min/mg) of 2K1C rats when compared to the sham group ( $151 \pm 6$  nmol/min/mg serum and  $0.35 \pm 0.03$  nmol/min/mg non-clipped kidney). Treatment with kefir decreased enzyme activity ( $148 \pm 8$  nmon/min/mg serum,  $0.31 \pm 0.01$  nmol/min/mg non-clipped kidney). Therefore, we conclude that 60 days kefir treatment in rats with renovascular hypertension has several beneficial effects, attenuating hypertension, improving endothelial dysfunction and oxidative stress, as well as decreasing ACE activity.

Keywords: Renovascular hypertension, Kefir, Endothelial dysfunction, Angiotensin II, Angiotensin converting enzyme, Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Taxa de mortalidade no Brasil por doença cardiovascular (DCV) e distribuição por causas no ano de 2013. DIC: doenças isquêmicas do coração; DCbV: doença cerebrovascular; DH: doenças hipertensivas; ICC: insuficiência cardíaca congestiva.

**Figura 2.** Versão simplificada do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas.

**Figura 3:** Função endotelial em condições fisiológicas.

**Figura 4:** Pressão arterial direta verificada através da canulação da artéria femoral.

**Figura 5:** Pressão arterial indireta feita pela pletismografia de cauda.

**Figura 6:** Avaliação da hipertrofia cardíaca através da relação entre o peso do VE e comprimento da tibia.

**Figura 7:** Relação entre o peso de rim clipado e rim contralateral, juntamente com imagens macrofotográficas típicas dos rins de cada grupo.

**Figura 8:** Representação gráfica das curvas dose-resposta à Acetilcolina.

**Figura 9:** Representação gráfica das curvas dose-resposta ao Nitropussiato de sódio.

**Figura 10:** Representação gráfica das curvas dose-respostaa Fenilefrina.

**Figura 11:** Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio.

**Figura 12:** Participação das espécies reativas de oxigênio no relaxamento dependente do endotélio.

**Figura 13:** Participação dos prostanóides derivados da ciclooxygenase no relaxamento dependente do endotélio.

**Figura 14:** Representação gráfica da citometria de fluxo comparando a intensidade da fluorescência do DHE e DCF nos grupos sham, 2R1C e 2R1C tratado com kefir.

**Figura 15:** Representação da atividade da ECA no soro e nos rins feita através da utilização do substrato Zphe- His Leu.

**Figura 16:** Efeitos da indução da hipertensão renovascular sobre os níveis teciduais de angiotensina I após 60 dias da cirurgia.

**Figura 17:** Efeitos da indução da hipertensão renovascular sobre os níveis teciduais de angiotensina II após 60 dias da cirurgia.

**Figura 18:** Efeitos da indução da hipertensão renovascular sobre os níveis teciduais de angiotensina II após 60 dias da cirurgia.

**Figura 19.** Imagens feitas através de microscopia de varredura ilustrando glomérulos, podócitos e túbulos renais dos rins esquerdos.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

ACh: Acetilcolina

ADH: Hormônio Antidiurético (ADH)

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

Ang 1-7: Angiotensina 1-7

ANOVA: Análise de variância

AT1: Receptor de Angiotensina II tipo 1

AT2: Receptor de Angiotensina II tipo 2

BH4: Tetrahidrobiopterina

CEUA-EMESCAM: Comitê de Ética no Uso de Animais da EMESCAM

COX 1-2: Ciclooxygenase tipo 1 e tipo 2

CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

dAUC: Diferença entre as áreas abaixo da curva

DCFH-DA:: Diacetato de diclorofluoresceína

DCV: Doenças cardiovasculares

DCbV: Doença Cerebrovascular

DH: Doenças Hipertensivas

DHE: Dihidroetideo

DIC: Doenças Isquêmicas do Coração

EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra acético

ECA: Enzima conversora de angiotensina

EMESCAM: Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória

EPS: Polissacarídeos Extracelular

EPM: Erro padrão da média

ERO's: Espécies reativas de oxigênio

FAD: Flavina Adenina Dinucleotídeo

FC: Frequência cardíaca

FMN: Flavina mononucleotídeo  
GC: Guanilato ciclase  
GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina  
GTP: Trifosfato de Guanosina  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio  
HAS: Hipertensão arterial sistêmica  
ICC: Insuficiência Cardíaca Congestiva  
INDO: Indometacina  
L-NAME: N-G-nitro-L-arginina metil ester  
Log EC<sub>50</sub>: Log da concentração de agonista que produziu metade da resposta máxima  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NO: Óxido nítrico  
NPS: Nitroprussiato de sódio  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Ânion superóxido  
OH•: Radical Hidroxila  
PA: Pressão arterial  
PAM: Pressão arterial média  
PBS: Solução tampão fosfato (Salina tamponada com fosfato)  
PDE's: Fosfodiesterases  
PE10: Cânula de polietileno 10  
PE20: Cânula de polietileno 20  
PGH<sub>2</sub>: Prostaglandina H<sub>2</sub>  
PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina  
PLA<sub>2</sub>: Fosfolipase A<sub>2</sub>  
PLC: Fosfolipase C  
PLD: Fosfolipase D  
R<sub>máx</sub>: Resposta máxima  
SHR: Ratos espontaneamente hipertensos  
SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona  
2R1C: 2 Rins-1Clipe

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>16</b> |
| 1.1 Hipertensão Arterial Sistêmica.....  | 16        |
| 1.2 Hipertensão Renovascular .....   | 18        |
| 1.3 Endotélio Vascular e Óxido Nítrico .....   | 22        |
| 1.4 Disfunção Endotelial na Hipertensão.....   | 26        |
| 1.5 Estresse Oxidativo na Hipertensão .....  | 27        |
| 1.6 Tratamento com Kefir.....  | 29        |
| <b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>   | <b>34</b> |
| 4.1 Animais experimentais.....   | 34        |
| 4.2 Indução da hipertensão renovascular .....  | 34        |
| 4.3 Preparação do kefir para administração .....   | 35        |
| 4.4 Grupos experimentais.....  | 35        |
| 4.5 Pletismografia.....  | 35        |
| 4.6 Canulação da artéria e veia femoral para aferição da pressão arterial direta .....                                   | 36        |
| 4.7 Hipertrofia cardíaca e peso dos rins .....   | 36        |
| 4.8 Reatividade Vascular .....   | 37        |
| 4.8.1 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio .....                       | 38        |
| 4.8.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) no relaxamento dependente do endotélio .....        | 38        |
| 4.8.3 Avaliação da participação de prostanoídes derivados da ciclooxigenase no relaxamento dependente do endotélio ..... | 38        |
| 4.9 Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio na aorta e sangue .....                      | 39        |



|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.10     | Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)   | 40        |
| 4.11     | Dosagem de angiotensina I,II e 1-7   | 41        |
| 4.12     | Microscopia Eletrônica de Varredura  | 42        |
| 4.13     | Análises estatísticas  | 43        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b>  | <b>44</b> |
| 5.1      | Parâmetros hemodinâmicos e avaliações de peso dos órgãos   | 44        |
| 5.2      | Reatividade vascular   | 47        |
| 5.2.1    | Efeito do Kefir na vasodilatação dependente do endotélio   | 47        |
| 5.2.2    | Efeito do Kefir na vasodilatação independente do endotélio   | 48        |
| 5.2.3    | Efeito do Kefir na resposta vasoconstrictora   | 50        |
| 5.2.4    | Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio   | 51        |
| 5.2.5    | Avaliação da participação das espécies reativas de oxigênio (ERO's) no relaxamento dependente do endotélio                             | 52        |
| 5.2.6    | Avaliação da participação dos prostanóides derivados da Ciclooxygenase no relaxamento dependente do endotélio                          | 54        |
| 5.3      | Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio •O <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nas células de aorta e sangue | 55        |
| 5.4      | Determinação da atividade da ECA no soro e nos rins  | 57        |
| 5.5      | Determinação dos níveis de angiotensina II e 1-7   | 57        |
| 5.6      | Microscopia de varredura   | 60        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO</b>   | <b>61</b> |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÃO</b>   | <b>72</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>73</b> |

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Hipertensão arterial sistêmica**

Mundialmente, doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 17,7 milhões de mortes por ano, representando cerca de 31% do total de óbitos no mundo. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é responsável por 9,4 milhões de mortes a cada ano, correspondendo cerca de 45% do total de óbitos por doença cardíaca e 51% por doença isquêmica do coração. Em determinados grupos de idade, a cada aumento de 20 mmHg de pressão arterial, o risco de doença cardiovascular é duplicado. Além de doenças coronárias e acidentes vasculares, complicações da pressão arterial elevada incluem insuficiência cardíaca, doença vascular periférica, insuficiência renal, hemorragia da retina e deficiência visual (WHO, 2013).

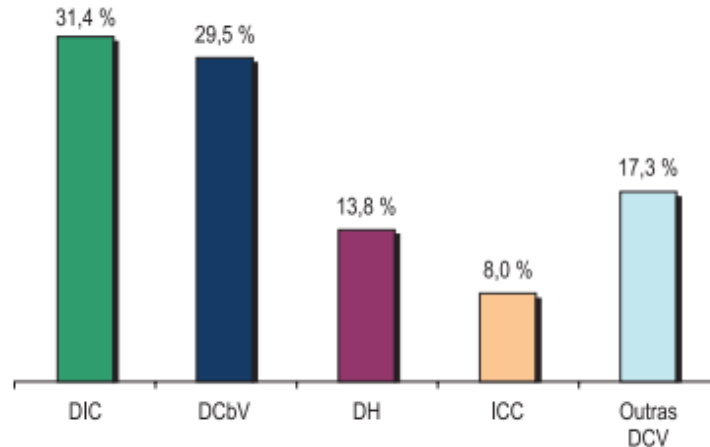
Em 2008, estima-se que 40% dos adultos acima de 25 anos foram diagnosticados com HAS, sendo que o número de pessoas com a doença aumentou de 600 milhões em 1980 para 1 bilhão em 2008. Esse aumento pode ser atribuído a diversos fatores. Dentre eles podemos citar, o crescimento da população, o envelhecimento e fatores de risco comportamentais, tais como alimentação, uso nocivo de álcool, sedentarismo, obesidade e rotinas estressantes. A região com maior prevalência é a Africana com 46% dos adultos com idade superior a 25 anos, enquanto a mais baixa prevalência é encontrada nas Américas com 35%. Em resumo, países de alta renda têm uma menor prevalência de hipertensão (WHO, 2011).

No Brasil, a HAS atinge 32,5% de indivíduos adultos, o que corresponde a 36 milhões de pessoas, contribuindo para 50% das mortes por Doenças Cardiovasculares (DCV). Junto com a Diabetes Mellitus, suas complicações têm impacto elevado na perda da produtividade do trabalho e da renda familiar, estimada em US\$ 4,18 bilhões entre 2006 e 2015. (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão,

2016). A prevalência entre homens e mulheres foi de 35,8% nos homens e de 30% em mulheres. Uma revisão sistemática quantitativa de 2003 a 2008, de 44 estudos em 35 países, revelou uma prevalência global de 37,8% em homens e 32,1% em mulheres (Borges *et al.*, 2008).

A HAS é considerada uma condição clínica multifatorial que se caracteriza por elevação continuada dos níveis pressóricos  $\geq 140$  e/ou 90 mmHg. Esta associada a distúrbios metabólicos, alterações funcionais e estruturais de órgãos-alvo. (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2016).

As complicações (cardíacas, renais e AVE) da HAS contribuem direta ou indiretamente para o elevado percentual de mortes por DCV. Conforme observado na figura 1, em 2013 ocorreram 1.138.670 óbitos, 339.672 dos quais (29,8%) decorrentes de DCV, a principal causa de morte no país (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2016).



**Figura 1.** Taxa de mortalidade no Brasil por DCV e distribuição por causas no ano de 2013. DIC: doenças isquêmicas do coração; DCbV: doença cerebrovascular; DH: doenças hipertensivas; ICC: insuficiência cardíaca congestiva. Fonte: Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2016.

Dentre os fatores de risco para a HAS pode-se destacar fatores genéticos, ambientais, vasculares, hormonais, renais e neurais. Os principais mecanismos envolvidos na hipertensão arterial são a constrição vascular e a disfunção endotelial. A hipertrofia da parede vascular encontrada em indivíduos hipertensos leva ao aumento da resistência vascular periférica e conseqüentemente ao aumento da contratilidade da musculatura lisa dos vasos (Nobre *et al.*, 2013).

Diferente da hipertensão primária, que é uma condição clínica multifatorial, a hipertensão denominada secundária apresenta causa identificável passível ou não de correção. A segunda maior causa de hipertensão secundária é a hipertensão renovascular precedida pelas doenças renais (Praxedes, 2002).

## **1.2 Hipertensão Renovascular**

Dentre as causas de HAS, as alterações da vasculatura renal constituem fatores etiopatogênicos mais comuns e formas plenamente curáveis. A hipertensão renovascular é uma forma bastante comum de hipertensão secundária e é causada por estenose da artéria renal capaz de provocar diminuição do diâmetro luminal de pelo menos 60% (Lincevicius *et al.*, 2015). A prevalência aumenta em idosos e pessoas com doenças cardiovasculares como insuficiência cardíaca, doenças isquêmicas do coração e doença cerebrovasculares. É uma das causas mais comuns de hipertensão arterial secundária e sua prevalência atinge 5% dos pacientes hipertensos (Baumgartner & Lerman, 2011).

São observadas duas formas de lesões obstrutivas da artéria renal, sendo que a aterosclerótica é mais frequente e é responsável por até 90% dos casos. Geralmente ocorre como resultado de extensões de placas ateroscleróticas presentes na aorta que atinge o óstio ou o terço proximal da artéria renal (Borelli, 2015). A etiologia da lesão do tipo displasia fibromuscular permanece desconhecida, a despeito de inúmeras teorias. Há suspeita de um componente genético, já que a doença atinge primariamente caucasianos (la Batide Alanore, 2007).

O modelo 2 rins 1 clipe (2R1C) tem sido muito utilizado experimentalmente para estudar a hipertensão renovascular. O modelo consiste na obstrução parcial da artéria renal esquerda com um clipe de prata. A obstrução provoca diminuição do fluxo, que por sua vez causa aumento do tônus simpático, queda da pressão de perfusão e diminuição da carga de NaCl na mácula densa. Juntos, esses fatores provocam a liberação de renina (Guan *et. al.*, 1992; Guimarães *et. al.*, 2010; Najafipour *et. al.*, 2015).

A primeira fase da hipertensão no modelo 2R1C acontece aproximadamente quatro semanas após a colocação do clipe e nessa fase o aumento da pressão é causado pelo aumento da atividade da renina. A renina liberada pelas células justaglomerulares atua sobre o angiotensinogênio formando a Angiotensina I (Ang I) que após perder dois aminoácidos terminais é convertida em Angiotensina II (Ang II) pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). Nesta fase ocorre ativação constante do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) (Guimarães *et al*, 2010).

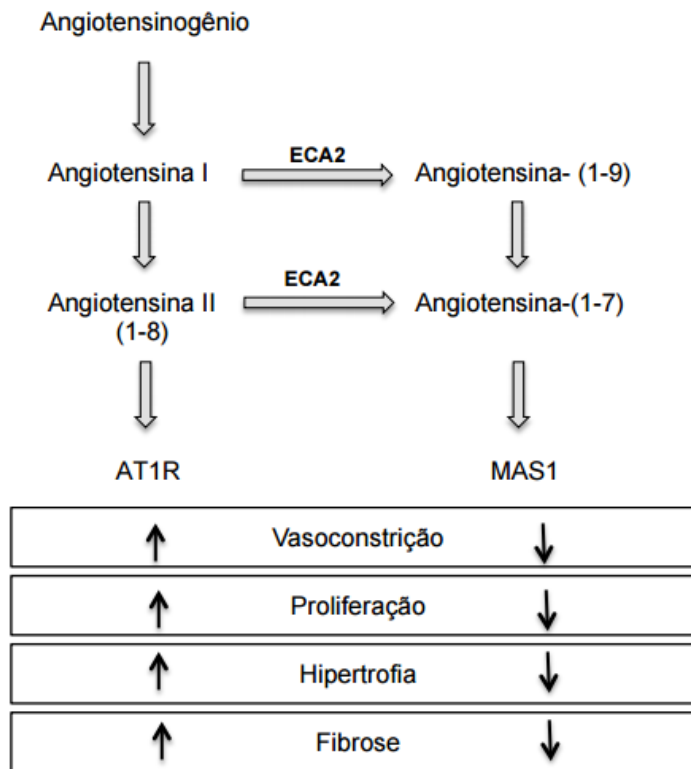
Com 25 dias, os níveis de renina plasmáticos retornam a valores próximos dos normais (Guan *et. al.*, 1992). Inicia-se então, a segunda fase de hipertensão, que ocorre entre cinco e oito semanas e a pressão normalmente para de aumentar e se mantém a níveis hipertensivos (Maldonado, 1991). Nessa fase, os níveis de renina diminuem e a manutenção da hipertensão é caracterizada pelo aumento de Ang II intrarenal, que contribui para uma excessiva retenção de sódio e água (Navar, Nishiyama, 2004).

Estudos recentes mostraram que os níveis de Ang II no soro e no plasma estão elevados em ratos 2R1C após 4 e 8 semanas respectivamente (Yu *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2015). E estudos também demonstraram que o aumento da Ang II e da aldosterona, conforme encontramos no modelo 2R1C, pode levar a modificações vasculares funcionais e estruturais incluindo disfunção endotelial, deposição de matriz extracelular e hipertrofia. Essas modificações são causadas principalmente

pelo aumento do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e do *up-regulation* das metaloproteinases de matriz (Ceron *et al.*, 2010).

A Ang II é um hormônio pleitrópico que possui efeitos importantes no sistema renal, vasos sanguíneos e sistema nervoso. Quando o SRAA é ativado de maneira exacerbada, como acontece na hipertensão renovascular, isso produz efeitos deletérios nos rins, podendo causar progressivamente perda de função renal. Este peptídeo atua em receptores AT1 e AT2, sendo que em receptores AT1 os seus efeitos causam vasoconstrição arterial sistêmica, estimulação da reabsorção de água e sódio pelo túbulo renal e aumento da secreção de aldosterona pela glândula adrenal. Em receptores AT2 os efeitos da angiotensina ainda não estão bem claros, mas sabe-se que no endotélio, tanto a ativação de receptores AT1 como AT2, podem produzir vasodilatação que contrabalança o efeito vasoconstritor de AT1 nas células musculares lisas (Santos *et al.*, 2000; Unger *et al.*, 2002).

Além dos componentes clássicos do SRAA, existem outros que foram descobertos ao longo dos anos. A ECA 2 por exemplo, que é uma enzima homóloga a ECA, está envolvida na clivagem de ang II e formação de Angiotensina 1-7 (Ang 1-7) (Figura 2). Já está bem descrito na literatura que o proto-oncogene Mas é um receptor para este peptídeo, e que o eixo ECA2-Ang1-7-Mas parece compensar os efeitos cardiovasculares deletérios do SRAA (Dilauro *et al.*, 2009). Possíveis mecanismos envolvidos nos benefícios da Ang 1-7 sob o sistema cardiovascular envolvem: amplificação das ações da bradicinina (Gorelik *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2000), diminuição das ações da Ang II e estimulação da produção de Óxido Nítrico (NO) em cardiomiócito e endotélio (Zimmerman *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Versão simplificada do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas. Adaptado de Marian, 2013.

Nogueira e colaboradores (2012), ao dosarem as concentrações plasmáticas de Ang I, II e 1-7 em camundongos com hipertensão renovascular observaram que os níveis de Ang I e Ang 1-7 estavam muito elevados no grupo de camundongos com hipertensão em relação ao grupo normotenso. Também, no grupo hipertenso os níveis plasmáticos de Ang II estavam extremamente elevados no 14º dia após a clipagem.

Além da ativação continuada do SRAA provocar a constrição das arteríolas renais, aumento da pressão nos capilares vasculares e proteinúria, a Ang II também provoca o aumento do estresse oxidativo, através da NADPH oxidase. No músculo liso vascular, a tirosina quinase Src regula a atividade da NADPH oxidase estimulada pela Ang II, induzindo a fosforilação e translocação da subunidade p47phox. A Src também é essencial para os efeitos da Ang II na síntese das

subunidades da NADPH, estimulando o aumento na expressão da gp91phox, p22phox, p47phox e p67phox. Essa ativação da NADPH oxidase leva a disfunção endotelial, proliferação de células mesangiais, processos inflamatórios e profibróticos devido a fosforilação da Src que antecede a ativação das cascatas ERK1/2 e JNK (Arq. bras. cardiol, 2010; Roscioni, 2013).

O tônus do músculo liso vascular é um fator determinante de resistência vascular e sua regulação é realizada pelos fatores derivados do endotélio, pressão sanguínea, inervação e por estímulos hormonais (Lincoln *et. al.*, 2001). Nas últimas duas décadas estudos vem demonstrando que o SRAA altera o músculo liso vascular e o endotélio vascular. Estas alterações parecem ocorrer pela redução da biodisponibilidade de NO e a produção de radicais livres. Logo, para compreender os efeitos da hipertensão renovascular no sistema cardiovascular se faz necessário o conhecimento do endotélio e das vias que participam do controle do tônus vascular (Phillips & Schmidt-Ott, 1999; Sun, 2010).

### **1.3 Endotélio Vascular e Oxido Nítrico**

Atualmente, sabe-se que o endotélio vascular não é somente uma camada de células localizada entre o sangue e a parede dos vasos, mas sim um órgão que pode ser controlado através de estímulos químicos e físicos. A superfície endotelial conta com uma vasta distribuição, que junto com a sua localização estratégica, contribui para a realização de diversas funções relacionadas à homeostase vascular (Furchgott *et. al.*, 1980).

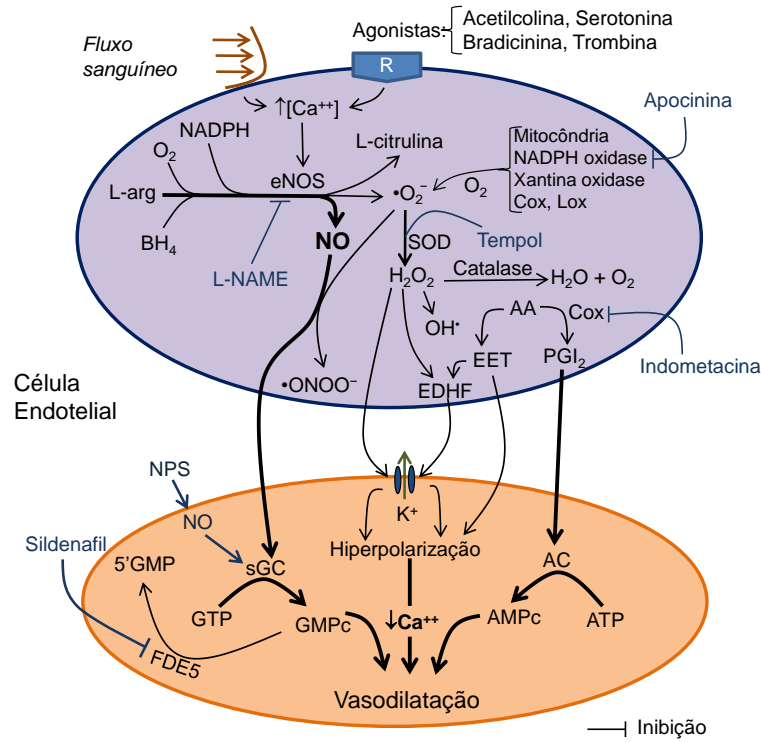
Alguns processos fisiológicos como a coagulação, a fibrinólise, a angiogênese e a manutenção do tônus vascular acontecem através da participação das células endoteliais que sintetizam e liberam fatores atuantes nesses processos, como por exemplo, o NO. A secreção desses fatores ocorre principalmente com a ativação do endotélio por agonistas estimuladores de receptores acoplados a proteínas G, que por sua vez causam elevação da concentração de cálcio intracelular. Dentre esses



agonistas pode-se citar alguns como: 1) neurotransmissores: acetilcolina, noradrenalina, substância P e ATP; 2) autacóides: bradicinina, histamina, ADP e endotelina e 3) hormônios circulantes: bradicinina, vasopressina, ang II e insulina (Matlung *et. al.*, 2009).

Como citado anteriormente, além dos estímulos químicos pelos agonistas, o endotélio também conta com a participação de estímulos físicos como a tensão de cisalhamento, também conhecida como *shear stress*. O *shear stress* é caracterizado como sendo uma força aplicada tangencialmente na parede dos vasos e é um potente estimulador de produção de NO. O fluxo, que é laminar no interior dos vasos, é determinado pelo gradiente de pressão, fazendo com que cada anel de fluxo tenha velocidade própria e gere atrito (viscosidade) entre as várias camadas do sangue (Moncada, 1991). Conforme visto na figura 3, o *shear stress* estimula a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), uma enzima responsável pela produção de NO, através do aumento da concentração intracelular de cálcio na célula endotelial (Meirelles *et. al.*, 2011)

Controlar o tônus da musculatura lisa vascular é uma das funções do endotélio, e pode ocorrer através da síntese de vários mediadores que conduzem a vasodilatação ou vasoconstrição. Os principais fatores relaxantes derivados do endotélio são o NO, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Entre os fatores contráteis, os principais são a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), o tromboxano A<sub>2</sub>, a Ang II, a endotelina-1 (ET-1) e o O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Carvalho *et. al.*, 2001).



**Figura 3.** Função endotelial em condições fisiológicas. As vias predominantes que levam à vasodilatação endotelial são indicadas por setas grossas. Abreviaturas: AA, ácido araquidônico; AC, adenilato ciclase; BH4, tetrahydrobiopterina; AMPc, monofosfato de adenosina cíclica; GMPc, monofosfato de guanosina cíclico; Cox, ciclooxigenases; EDHF, factor hiperpolarizante derivado do endotélio; EET, ácidos epoxieicosatrienoicos; eNOS, óxido nítrico sintase endotelial; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrogênio; L-arg, L-arginina; L-NAME, L-nitroarginina metilester; Lox, lipoxigenases; NADPH, fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina; • O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ânion superóxido; • ONOO<sup>-</sup>, peroxinitrito; PDE5, fosfodiesterase tipo 5; PGI<sub>2</sub>, prostaciclina; GCs, guanilil ciclase solúvel; SOD, superóxido dismutase; SNP, nitroprussiato de sódio. Fonte: Meyrelles et al.: Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in Health and Disease* 2011 10:211.

Dentre esses fatores, o NO tem sido alvo de muitos estudos. O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, é formado por sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, e possui um elétron desemparelhado (Dusse, 2003). Sua produção acontece inicialmente pela ação de alguns agonistas como acetilcolina (ACh), bradicinina, ADP, substância P ou, como descrito anteriormente, pelo *shear stress*. Esses agonistas levam a um aumento de Ca<sup>++</sup> intracelular, que por sua vez, ativa a eNOS que transforma L-arginina em NO e L-Citrulina. Essa reação é dependente de oxigênio e alguns cofatores como Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

(NADPH), Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), Flavina Mononucleotídeo (FMN) e Tetrahydrobiopterina (BH4) (Meyrelles *et. al.*, 2011).

A eNOS é encontrada principalmente em células endoteliais e sua ativação é regulada por um aumento de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular que leva a um aumento da sua ligação a calmodulina (Alderton *et. al.*, 2001). Essa ligação leva a transferência de elétrons do domínio redutase da NADPH para o domínio heme oxigenase da enzima. A ativação da eNOS também pode acontecer pela fosforilação em sítios específicos. Em humanos, esses sítios são dos aminoácidos serina 1177 (Ser1177), e treonina 495 (Thr495). Essa fosforilação pode acontecer pela ação de estrogênios, VEGF, insulina, bradicinina, ou *shear stress*. A fosforilação do resíduo Ser1177 aumenta o fluxo de elétrons através do domínio redutase, e leva ao aumento da atividade da enzima. Já o resíduo Thr495 é um sítio de regulação negativa, ou seja, sua fosforilação produz efeitos contrários, onde ocorre redução do fluxo de elétrons, e isso leva a uma diminuição na atividade enzimática da eNOS. A principal enzima que fosforila a eNOS em Thr495 é a proteína kinase C e a sua desfosforilação ocorre pela ação da fosfatase-1 (PP-1) (Vanhoutte *et. al.*, 2009; Förstermann & Sessa, 2012).

Após ser produzido o NO se difunde para o músculo liso onde ativa a enzima guanilato ciclase (GC), levando ao acúmulo de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) através de sua ação sobre o trifosfato de guanosina (GTP) que induz a diminuição de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular nas células musculares lisas, e conseqüentemente ao relaxamento (Meyrelles *et. al.*, 2011). A degradação do GMPc acontece pela ação de enzimas da família das fosfodiesterases (PDE's), que compreendem um grupo de enzimas que hidrolisam nucleotídeos cíclicos, atuando de modo essencial na modulação da sinalização citoplasmática desses segundos mensageiros (Raja & Nayak, 2004). Balarini e colaboradores (2013), mostraram que a inibição crônica da PDE5 com sildenafil restaura a função endotelial na aorta de camundongos apoE -/- com disfunção endotelial, devido a melhora da sinalização do NO por aumento do seu segundo mensageiro, mostrando a importância dessa via para a modulação endotelial.

Além de seu efeito vasodilatador, está bem estabelecido que o NO desempenha um importante papel vasoprotetor (Dusse, 2003). Muitos estudos experimentais e clínicos mostraram que, o NO liberado pelo endotélio de vasos de condutância e resistência é responsável por modular o tônus vascular e apresenta efeitos antitrombóticos, antiapoptóticos, antiinflamatórios e antioxidantes (Antoniades *et. al.*, 2004; Bendall *et. al.*, 2005; Balarini *et. al.*, 2013; Dias *et. al.*, 2014).

Em algumas condições fisiopatológicas, como HAS e a aterosclerose, o endotélio vascular exibe um estresse oxidativo excessivo e uma diminuição da biodisponibilidade do NO, que são características da disfunção endotelial (Leal *et. al.*, 2015; Balarini *et. al.*, 2013; Dias *et. al.*, 2014).

#### **1.4 Disfunção endotelial na hipertensão**

Em condições fisiológicas existe um equilíbrio entre a liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstrictores, no entanto, em diversas condições patológicas, como na hipertensão arterial, esse equilíbrio é alterado levando a uma consequente diminuição da liberação de mediadores vasodilatadores, provocando assim uma disfunção endotelial. Estudos do nosso grupo sobre a função endotelial em diferentes modelos de animais são feitos utilizando protocolos que tem como objetivo avaliar a função vascular em macrocirculação (aorta) e microcirculação (artérias mesentéricas) (Balarini *et. al.*, 2013; Dias *et. al.*, 2014).

O desacoplamento da eNOS também é evidenciado na disfunção endotelial, e acontece quando a eNOS não está acoplada com um cofator ou pela falta de substrato. Nessas condições, a eNOS passa a produzir  $O_2^{\cdot-}$ , e esse reage com o NO formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um ânion altamente reativo que oxida BH4 a BH2 e pode alterar a função e estrutura dos vasos (Vasquez *et. al.*, 2016).

São múltiplos os mecanismos presentes na HAS que estão correlacionados com a disfunção endotelial, sendo dependentes do tipo e duração da hipertensão e ao leito vascular. Entre esses mecanismos, estão a diminuição da biodisponibilidade e liberação de fatores vasodilatadores como o NO, EDHF e PGI<sub>2</sub>; vias de transdução de sinais desses fatores prejudicadas; sensibilidade diminuída da musculatura lisa a esses fatores e aumento de fatores de contração como endotelina-1, PGH<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Salvemini *et al*, 2013; Dautzenberg & Just, 2013). Callera (2004), Cau (2011) e Castro (2012) mostraram que ratos com hipertensão renovascular possuem um prejuízo na resposta vasodilatadora frente a diferentes drogas, quando comparados com ratos normotensos. Além disso, Santuzzi (2015) demonstrou que a resposta vasoconstritora está elevada nesse modelo 28 dias após a clipagem.

A disfunção endotelial encontrada no modelo 2R1C é causada principalmente pelo aumento do estresse oxidativo provocado pelas ERO's, devido a um aumento da ativação da NADPH Oxidase pela Ang II, e diminuição da biodisponibilidade NO (Nogueira *et. al.*, 2012; Dias *et. al.*, 2014;).

### **1.5 Estresse Oxidativo na Hipertensão**

Radicais livres são espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e devido a isso são altamente reativos e capazes de “atacar” biomoléculas para se estabilizarem (Halliwell, 1999).

As moléculas reativas derivadas do oxigênio e que podem ser radicais livres, como o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ou radical hidroxila (OH•), ou não radical, como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) são conhecidas como ERO's. Já as espécies reativas de nitrogênio são as moléculas reativas derivadas do nitrogênio, e podem ser classificados como íons ONOO<sup>-</sup>, ou não íons, como NO (Bolisetty & Jaimes, 2013).

A mitocôndria e sua cadeia transportadora de elétrons é a maior responsável pela produção de  $O_2^{\cdot-}$ . O citocromo p450, ciclooxygenases, lipoxigenases, xantina oxidases e aminoácido oxidases são outros sistemas enzimáticos que também podem produzir ERO's. Fisiologicamente, as ERO's são de grande importância, pois participam de processos biológicos como o crescimento e diferenciação celular, apoptose, senescência celular e defesa contra microrganismos. (Bolisetty & Jaimes, 2013).

Em condições normais a produção de ERO's é contrabalanceada por vias enzimáticas e não enzimáticas; no entanto, quando há uma produção excessiva, ocorre uma perda da capacidade protetora antioxidante em manter essas espécies em níveis normais, e conseqüentemente ocorre o estresse oxidativo (Stocker & Keaney, 2004). Os níveis de  $O_2^{\cdot-}$ , por exemplo, são controlados por vias que atuam em sua neutralização. Uma dessas vias ocorre pela ação da superóxido dismutase mitocondrial, que age sobre o  $O_2^{\cdot-}$ , produzindo  $H_2O_2$ . O  $H_2O_2$ , por sua vez, é convergido em água pela catalase ou pela glutathione peroxidase (Bolisetty & Jaimes, 2013).

Já está bem esclarecido que a Ang II também induz a formação de ERO's no endotélio e no músculo liso. Esse processo ocorre via receptor AT1 e a ativação da NAD(P)H oxidase, principal produtora de ERO's em processos patológicos. A NAD(P)H oxidase é uma família de proteínas que atuam na transferência de elétrons pelas membranas biológicas, usando NADPH como doador de elétrons. Essa enzima possui subunidades citossólicas (p47phox, p67phox, ou homólogos) e subunidades de membrana (NOX-1/NOX-2/NOX-4/NOX-5 e p22phox). Para a ativação dessa enzima é necessário a formação de um complexo que é resultado da ligação das subunidades p22phox, p67phox, p47phox a subunidade catalítica gp91phox também conhecido como Nox2. Essa ativação se dá pela ação de várias fosfolipases como a fosfolipase C (PLC), fosfolipase A2 (PLA2) e fosfolipase D (PLD). A NADPH oxidase é responsável pela produção de  $O_2^{\cdot-}$  pela redução de moléculas de oxigênio (Touyz & Schiffrin, 2000).

Além dos danos já descritos causados pelo aumento do estresse oxidativo, Campagnaro e colaboradores (2013) demonstraram que o aumento de  $O_2^{\cdot-}$  em camundongos com hipertensão renovascular, pode resultar na interação com o DNA, levando ao dano oxidativo e aumento da fragmentação do DNA.

A hipertensão renovascular apresenta características específicas durante o desenvolvimento dos altos níveis pressóricos, como o endotélio desnudado, altos níveis plasmáticos de Ang II, taquicardia, hipertrofia cardíaca, estresse oxidativo elevado e apoptose e atrofia do rim estenótico (Vasquez *et. al.*, 2016; ). Na segunda fase da hipertensão, são observados a normalização dos níveis plasmáticos de Ang II e aumento dos níveis intrarrenais, com consequente desequilíbrio entre NO/ERO'S (Nogueira *et. al.*, 2012; Dias *et. al.*, 2014).

Em estudos recentes, modelos experimentais de animais hipertensos foram usados para identificar novas alternativas não farmacológicas de tratamento e prevenção para DCV (Friques *et. al.*, 2015; Klippel *et. al.*, 2016).

### **1.7 Tratamento com Kefir**

Medidas de tratamentos não farmacológicos na hipertensão, como certos alimentos funcionais, vem sendo alvo de alguns estudos (Turpeinen *et. al.*, 2011; Friques *et. al.*, 2015; Klippel *et. al.*, 2016). Em estudos clínicos e experimentais o tratamento de indivíduos com hipertensão moderada (Turpeinen *et. al.*, 2011) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Jakala *et. al.*, 2009) demonstrou eficácia em atenuar a pressão sanguínea através da inibição da ECA e atenuando a disfunção endotelial através do aumento das concentrações de GMPc.

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas exercem um efeito benéfico à saúde (Who, 2001). Apesar de ainda haver discordâncias para a seleção de microrganismos probióticos, a capacidade de sobreviver no ambiente gastrointestinal e que possua pelo menos uma função

benéfica tem sido duas condições amplamente aceitas para classificar um probiótico (Diosma *et. al.*, 2014).

O kefir é considerado uma bebida probiótica obtida por fermentação dos grãos que é composto por uma variedade de microorganismos, proteínas e polissacarídeos. Acredita-se que seja originado das montanhas caucasianas e é comercializado principalmente na Argentina, Taiwan, Portugal, Turquia e França (Garrote, 2000). A fermentação ocorre pela interação dos grãos com o leite que é usado como substrato. Os grãos de Kefir variam de tamanho, de 0,3 a 3,0 cm de diâmetro e são caracterizados por uma superfície irregular, multilobular, unidas por uma única secção central, e a sua cor varia de branco a branco amarelado e com odor característico (Farnworth, 2005; Leite *et. al.*, 2013).

Em um estudo de Friques e colaboradores (2015), observou-se em uma análise microbiológica na qual a contagem de microrganismos total foi de  $7,5 \times 10^7$  UFC/mL, que a microflora predominante do Kefir é composta por várias espécies de bactérias benéficas, incluindo bactérias como *Acetobacter acetii*, *Acetobacter sp.*, *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc spp.*, *Lactobacillus kefiranofaciens* e leveduras, como *Candida famata* e *Candida krusei*.

Nos grãos de Kefir, a microflora encontra-se em uma matriz de proteína de polissacarídeo. Algumas espécies de bactérias ácido lácticas são conhecidas por produzir polissacarídeos extracelulares (EPS), que contribui para a textura do grão e do fermentado. O EPS produzido pelos microrganismos do Kefir é comumente conhecido como Kefiran, que é solúvel em água e é composto por D-glucose e D-galactose. O Kefiran é produzido pelo *Lactobacillus kefir* e *Lactobacillus kefiranofaciens* (Farnworth, 2005; Wszolek *et. al.*, 2006; Lopitz-Otsoa *et. al.*, 2006; Leite *et. al.*, 2013; Nielsen *et. al.*, 2014).

Entre os efeitos benéficos do kefir estão suas ações como antitumoral, antialérgico, hipocolesterolêmico e na melhora da digestão e tolerância à lactose (Hertzler &



Clancy, 2003; Sakar, 2007; Hong *et. al.*, 2010; Nielsen *et. al.*, 2014). O efeito antioxidante do kefir foi demonstrado recentemente em alguns trabalhos como o de Jасcolka (2013) em camundongos *knockout* para ApoE, onde foi demonstrado uma redução da oxidação de LDL no fígado e sangue de animais tratados com kefir e por Punaro (2014) em ratos diabéticos, que mostrou que ratos tratados com kefir apresentavam diminuição de ERO'S no plasma e rins.

Um trabalho de nosso grupo demonstrou que o tratamento crônico de ratos SHR com kefir trouxe diversos efeitos benéficos. Os resultados mostraram que o kefir administrado cronicamente durante 60 dias foi capaz de reduzir a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) nesses animais. O kefir também atuou melhorando a disfunção endotelial, reduzindo ERO's, aumentando a biodisponibilidade de NO em aortas de ratos SHR (Friques *et. al.*, 2015). Além disso, Klippel e colaboradores (2016), mostraram que o tratamento com kefir também foi capaz de atenuar o tônus simpático cardíaco exacerbado e aumentar o tônus vagal e, conseqüentemente, o ganho do barorreflexo prejudicado.

Devido aos vários danos provocados pela hipertensão renovascular, a proposta do nosso trabalho foi investigar qual o efeito do tratamento com kefir na função endotelial e na pressão arterial de ratos com hipertensão renovascular, assim como avaliar se o tratamento seria capaz de diminuir o estresse oxidativo e reduzir a ativação do SRAA nesses animais.

## 2 JUSTIFICATIVA

A HAS é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, sendo responsável por grande número de mortes e internações. Por isso, além de gerar grandes custos aos cofres públicos, a HAS também provoca redução na qualidade e expectativa de vida da população mundial.

Dentre os pacientes hipertensos, 5% possuem hipertensão secundária provocada pela estenose da artéria renal. A hipertensão renovascular é caracterizada por possuir aspectos fisiopatológicos que envolvem estresse oxidativo, diminuição de biodisponibilidade de NO, disfunção endotelial e dano ao DNA, entre outros. Logo se faz necessário o estudo de abordagens terapêuticas que visem interferir nesses mecanismos para promover uma diminuição dos efeitos causados pela hipertensão renovascular.

Abordagens não farmacológicas que possam ser associadas a tratamentos medicamentosos vêm sendo muito estudadas nos últimos anos para o tratamento e melhora da hipertensão. Dentre essas abordagens, podem-se citar alguns alimentos, tais como os produtos lácteos, que já demonstraram em alguns estudos que são capazes de provocar efeitos benéficos na hipertensão, tanto experimentalmente como clinicamente.

Nosso grupo de estudo tem desenvolvido estudos do kefir no tratamento de DCV e obtido resultados satisfatórios. Nos três últimos anos, foram relatados alguns efeitos benéficos do kefir como antioxidante em alguns modelos experimentais de doenças, inclusive em ratos SHR. Portanto, tudo indica que esse probiótico pode ser um promissor tratamento para a hipertensão secundária e fazem-se necessários estudos que avaliem seus efeitos nessa patologia.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do Kefir sobre a função vascular de ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

### 3.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do tratamento com Kefir sobre os seguintes desfechos:

- ✓ Na pressão arterial e frequência cardíaca;
- ✓ Resposta vasodilatadora dependente do endotélio (Acetilcolina);
- ✓ Resposta vasodilatadora independente do endotélio (Nitruprussiato de Sódio);
- ✓ Resposta vasoconstrictora frente à fenilefrina;
- ✓ Mecanismos da Disfunção Endotelial:
  - Avaliação da participação do NO – Bloqueio com L-Name
  - Avaliação da influência das ERO's – Bloqueio com Apocinina
- ✓ Avaliação do estresse oxidativo através da citometria de fluxo
- ✓ Análise da morfologia endotelial da aorta– Microscopia eletrônica de varredura
- ✓ Relação com os componentes do SRAA

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Animais experimentais**

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando de 140-160 g divididos em três grupos: Sham Veículo; 2R1C Veículo e 2R1C Kefir. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo. O uso e cuidado destes animais experimentais foi de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e pelo Comitê de Ética no Uso dos Animais Experimentais (CEUA-UFES, protocolo nº 040/2014). Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 20-25°C, umidade de 70% e livre acesso à água e ração.

### **4.2 Indução da hipertensão renovascular**

O animal foi submetido a indução de hipertensão renovascular 2R1C, onde após ser anestesiado com Ketamina (90 mg/Kg i.p) e Xilazina (10 mg/Kg i.p) foi feita uma laparotomia para exposição da artéria renal esquerda. Após essa artéria ser isolada com o auxílio de pinças, foi colocado um clipe de prata ajustável ao peso do animal e pré-calibrado com diâmetro interno de 0,2 mm, levando a uma diminuição do fluxo sanguíneo e diminuição de pressão de perfusão renal, assemelhando-se a uma estenose encontrada em seres humanos com hipertensão secundária renovascular. Os animais do grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a colocação do clipe. Após o procedimento, a incisão foi suturada e o animal foi acondicionado em uma gaiola individual.

O critério de inclusão para os grupos 2R1C no presente estudo, foi determinado por escolha dos animais que apresentaram pressão sistólica maior que 160 mmHg após sete dias da cirurgia.

### **4.3 Preparação do kefir para administração**

Os grãos de Kefir, provenientes da Universidade de Vila Velha (UVV), foram adicionados em leite integral, que recebeu tratamento térmico adequado, pasteurizado e resfriado (UHT). Foi utilizada uma proporção de 4% e a preparação foi mantida em temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, foi realizada uma filtração dos grãos e a preparação foi mantida sob refrigeração de 5 a 15°C por 24 horas para que as leveduras crescessem e se multiplicassem. Para finalizar, o Kefir filtrado foi colocado em tubos e acondicionado em freezer à -20°C.

#### **4.4 Grupos experimentais**

O grupo 2R1C tratado receberá o Kefir na dose de 0,3 mL/100g. Os animais veículo receberam leite UTH integral com o pH ajustado 4,3. As doses foram administradas por gavagem diariamente durante 60 dias, iniciando no mesmo dia após a cirurgia de indução da hipertensão renovascular.

#### **4.5 Pletismografia**

Os ratos foram acondicionados em um tubo cilíndrico de acrílico como forma de contenção, que era mantido em um ambiente aquecido e ventilado para melhor realização das medidas de pressão arterial sistólica (PAS). Após serem acondicionados, a cauda dos animais era encaixada a um cuff contendo um manguito de borracha conectado a um esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar. Dentro do cuff havia um transdutor de pulso (fotosensor) acoplado a um computador. O sensor captava os sinais, e esses eram enviados e registrados no computador.

No registro da PAS, ao insuflar o manguito ocorre a perda dos sinais de pulso e o retorno desses sinais ocorre ao longo da desinsuflação do manguito. Portanto, a pressão arterial sistólica (PAS) era considerada como sendo o primeiro sinal de pulso de retorno deste processo.

A medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada antes do procedimento cirúrgico para indução da hipertensão renovascular e semanalmente após a cirurgia durante o período de tratamento. Os animais foram previamente adaptados, durante três dias antes da mensuração, para prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento. Foi calculado a média de três medidas. Para realização do procedimento foi utilizado o pletismógrafo de cauda (IITC Life Science– 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA).

#### **4.6 Canulação da artéria e veia femoral para aferição da pressão arterial direta**

No término de 60 dias após a cirurgia, os animais foram novamente submetidos a anestesia com Ketamina (75mg/kg IP) e Xilazina (10mg/kg IP) para cateterização da artéria femoral. À princípio, foi realizada a tricotomia da superfície da região da pata esquerda, na sua porção ventral e região cervical dorsal interescapular. Posteriormente, foi realizado uma incisão e foi feita a exposição do plexo femoral para permitir o isolamento dos vasos femorais. Foram utilizados cateteres de polietileno PE-10 previamente unidos a cateteres de polietileno PE-50, tendo o seu comprimento ajustado de acordo com o tamanho do animal. A artéria femoral dos ratos foi canulada, inserindo um cateter preenchido com salina-heparina (100:1/UI) para registro de pressão arterial média (PAM). Após o implante, os cateteres foram exteriorizados no dorso do animal, através de um trocáter, para permitir os registros de PAM após 24h. Os registros foram feitos nos animais acordados e livres dentro das gaiolas. A extremidade livre do cateter foi acoplada a um transdutor de pressão (Cobe Laboratories, EUA) previamente conectado a um amplificador e a um sistema de aquisição de dados (Biopac System, Santa Barbara, CA, EUA).

#### **4.7 Hipertrofia cardíaca e peso dos rins**

No último dia do protocolo experimental o coração e rins de cada animal foi isolado, lavado com solução fisiológica e pesado. Para avaliação da hipertrofia cardíaca o

ventrículo esquerdo foi isolado e pesado. O ventrículo esquerdo foi colocado em estufa a 37° durante 24 horas para obtenção do peso seco. O índice de hipertrofia cardíaca foi realizado pela razão do peso do coração (mg) pelo comprimento da tíbia (cm). Também foi calculada a razão entre rim esquerdo e rim direito para determinar a presença de hipertrofia renal direita e atrofia renal esquerda.

#### **4.8 Reatividade vascular da aorta**

Após 60 dias de tratamento, os animais foram anestesiados com Tiopental (200 mg/Kg i.p), e logo após foram submetidos a toracotomia para exposição do coração e aorta, que foram cuidadosamente dissecados do tecido conjuntivo e retirados do animal para serem colocados em placas de Petri contendo solução Nutridora tampão de Krebs (concentrações em mM: NaCl 115; KCl 4.7; CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O 2.5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; NaHCO<sub>3</sub> 25; EDTA 0,1; glicose 11,1), pH 7.4, a 37°C.

A aorta foi cuidadosamente isolada do tecido perivascular e cortada em anéis de 4 mm aproximadamente. Posteriormente, os anéis foram colocados em triângulos de aço inoxidável e acondicionados em cubas contendo a solução nutritora de Krebs com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). A solução foi trocada a cada 30 minutos. Os anéis foram conectados a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC, Systems, Santa Barbara, EUA).

As respostas de vasodilatação e vasoconstrição foram obtidas através de curvas concentração resposta, com acetilcolina nas concentrações de 10<sup>-10</sup> a 10<sup>-5</sup>M e fenilefrina 10<sup>-10</sup> a 3x10<sup>-4</sup> M , respectivamente. Além disso, também foi feita curva com Nitropussiato de sódio (10<sup>-10</sup> a 10<sup>-5</sup> M).

Os anéis foram submetidos a tensão de 1.5 g durante 30 minutos para estabilização e a contração máxima foi avaliada com a segunda incubação com KCl 125 mM durante 30 minutos. Os anéis foram considerados viáveis quando a contração atingir, no mínimo, o dobro da tensão basal, caso contrário, o anel foi descartado.

Para avaliação da viabilidade do endotélio foi administrado Fenilefrina 100 nM (agonista alfa1-adrenérgico seletivo) para se obter uma pré-contração e posteriormente foi adicionado a Acetilcolina 1µM (agonista muscarínico). O relaxamento provocado pela Acetilcolina deveria ser maior que 80 % e a contração com Fenilefrina maior que 60%.

Após a realização das curvas ACh e Phe sem bloqueio os anéis serão incubados com bloqueadores farmacológicos para avaliar alguns mecanismos envolvidos nas respostas de relaxamento e constrição.

#### 4.8.1 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio

Para avaliar a participação do NO no relaxamento vascular dependente do endotélio, as doses de ACh serão administradas após os anéis serem incubados por um período de 20 minutos com N<sup>G</sup> – nitro-L-arginine methyl ester ( L-NAME 100 µM), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS).

#### 4.8.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) no relaxamento dependente do endotélio

Para verificação da influencia de ERO's produzidos pela NADPH oxidase no relaxamento endotelial, os anéis serão incubados durante 20 minutos com Apocinina (0,3 mM) que é um inibidor da enzima, e posteriormente será feita a curva ACh na presença desse bloqueador.

#### 4.8.3 Avaliação da participação de prostanoides derivados da cicloxigenase no relaxamento dependente do endotélio



Para avaliar a participação dos prostanóides no relaxamento dependente do endotélio com o ACh, os anéis de aorta foram incubados durante 20 minutos com Indometacina ( $10^{-5}\text{M}$ ), um inibidor não seletivo da ciclooxigenase.

#### **4.9 Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio na aorta e sangue**

Para isolamento das células da aorta, a mesma foi triturada com tesoura cirúrgica e foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos com solução de extração contendo proteinase K (0,1 m/v –Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e colagenase tipo II (0,2% m/v- GibcoLife Technologies, São Paulo, SP, Brasil), dissolvidos em uma solução tampão fosfato salina (PBS). Posteriormente, o extrato foi filtrado através de uma tela de nylon (BD Falcon 70  $\mu\text{m}$ , San Jose, Califórnia, EUA) acoplada em tubo falcon para remover os debris celulares. Em seguida, as amostras filtradas foram lavadas duas vezes com PBS, através de centrifugação (10 minutos a 2600 rpm), para remoção de enzimas e por fim foram armazenadas em solução contendo 95% de soro bovino fetal 9SFB, Gilbco) 5% dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma) e foram estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento dos ensaios.

Após a coleta do sangue diretamente do coração, foi separada uma amostra de 200ul para análise por citometria de fluxo após a lise de hemácias. Para tal, foram adicionados 2ml de solução de lise pré-aquecida a  $37^{\circ}\text{C}$  (BD Pharm Lyse, # 555899) aos 200ul de sangue previamente separados, e imediatamente foram vortexados. A solução de lise (10X) foi diluída (1X) com água destilada e mantida em temperatura ambiente. Em seguida, o tubo foi incubado em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Decorrido este tempo, a reação foi parada acrescentado-se 2ml de PBS ao tubo. Passado este tempo o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 1200rpm. Logo após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 2ml de solução de PBS com 1% de soro fetal bovino (FBS: *Fetal Bovine Serum*) e novamente centrifugado por 10 minutos a 1200rpm. Logo após, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1ml de PBS com solução de congelamento (95% SFB + 5% DMSO).

A determinação intracelular dos  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  foram realizadas utilizando o dihidroetídeo (DHE) e 2',7'- diacetato de dicloro fluoresceína (DCF-DA), respectivamente. O dihidroetídeo é oxidado pelo superóxido a etídeo, que é um composto que emite fluorescência que será detectada por citometria de fluxo. A determinação de peróxido de hidrogênio será estimada através da fluorescência emitida por dicloro fluoresceína (DCF) que é um produto da oxidação de 2',7'- diacetato de dicloro fluoresceína (DCF-DA).

Para realização dos ensaios as células isoladas foram ressuspensas em 1 mL de PBS na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL e incubadas, no escuro, com DHE (160mM) e DCF-DA 920 mM por 30 minutos a 37°C. Para controle positivo, as amostras foram incubadas 5 minutos com 10  $\mu$ M doxorubicina ou 50 mM de  $H_2O_2$  e para controle negativo as amostras foram incubadas apenas com etanol. A aquisição de dados foi feita através do citômetro de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada com auxílio do software FACSDiva (Becton Dickinson, San Juan, CA) e a sobreposição dos histogramas foram construídas usando o FCS Express software. Para quantificação da fluorescência emitida pelo DHE e DCF, as amostras foram analisadas em duplicata, sendo adquiridos 10.000 eventos por leitura, as células foram excitadas a 488 nm e os sinais foram obtidos utilizando 585/42 e 530/30, respectivamente, e os dados foram expressos em média geométrica da intensidade de fluorescência emitida (MFI).

#### **4.10 Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)**

A ação do kefir sobre a atividade da ECA foi mensurada por método fluorimétrico. As amostras de plasma em triplicata (3  $\mu$ L) foram incubadas por 15 minutos a uma temperatura de 37 °C com 40  $\mu$ L de "buffer" contendo o substrato da ECA, 5 mM Zphe- His Leu, tampão borato de sódio 0,4M e 0,9 M NaCl pH 8.3. Para análise nos

rins, cada 100 mg de rim foi usado 1 mL de tampão (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 50 mM, Ph 7.0). Foi feita a homogeneização e centrifugado por 15 minutos a 4°C, 3000 rpm.

A reação foi interrompida pela adição de 190 µL de 0,34 M NaOH. O produto gerado, His-Leu, foi mensurado fluorimetricamente (Synergy 2, Biotek, U.S.A.) antecedido por 10 minutos de incubação com 17 µL de 2% o-phataldialdehyde (OPA) em metanol. As medidas de fluorescência foram realizadas a 37°C em uma placa de leitura negra com 96 cavidades (Black polystyrene, Corning, U.S.A.) com filtros de excitação de 365 nm e de emissão de 495 nm. A placa de leitura fluorescente foi controlada pelo software Gen5. Uma curva de calibração com substrato da ECA foi incluída em cada placa. Para o branco foi adicionado 40 µL "buffer" contendo o substrato da ECA, 5 mM Zphe- His Leu, tampão borato de sódio 0,4M e 0,9 M NaCl pH 8.3, 190 µL de 0,34 M NaOH, 17 µL de OPA.

#### **4.11 Dosagem de angiotensina I, II e 1-7**

Após os animais serem decapitados, os rins foram retirados e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e posteriormente foram armazenado em freezer -80°C até o momento da preparação das amostras. Além disso, o sangue também foi coletado através do ventrículo direito com uso de uma seringa contendo EDTA e 100 µL de coquetel inibidor de protease (P2714, Sigma Aldrich). O sangue foi centrifugado por vinte minutos, 4000 rpm, à 4°C. O plasma foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. A dosagem das Angiotensinas foram realizadas por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) no Departamento de Nefrologia da UNIFESP.

As amostras foram purificadas utilizando coluna de C18 Oasis (Water Corporation), que serão previamente ativadas com Metanol (5mL), tetrahydrofurano (5 mL), hexano (5mL) e água destilada (10mL). Posteriormente, as amostras foram aplicadas nas colunas, lavadas com água e eluídas em mistura de etanol, ácido acético e água (90/4/6). Os eluatos foram liofilizados e redissolvidos em 500 µL de fase móvel a

(5% de acetonitrila em 0,1% de ácido fosfórico), e então foram filtrados com membrana de 0,22 µm para serem analisados.

Os peptídeos foram separados em coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 (250 x 4,6 mm), (PerkinElmer's Brownlee Columns), utilizando 5 minutos de gradiente isocrático seguido por 20 minutos de gradiente linear de 5% a 35% de fase móvel B (95% Acetonitrila em ácido trifluoacético 0,1%, sob um fluxo de 1,5 mL/min por 40 minutos por HPLC. A angiotensina I, II e 1-7 foram identificadas de acordo com o período de retenção (<6%) e a altura (<5%) utilizando curva padrão de concentração conhecida e os valores das dosagens no rim foram normalizados de acordo com o peso do mesmo.

#### **4.12 Microscopia eletrônica de varredura**

Os animais foram perfundidos com uma solução de paraformaldeído (2%), glutaraldeído (2,5%) e solução de tampão de cacodilato (0,1 M; pH 7,2) e posteriormente os rins foram dissecadas e fixados nessa solução durante 24 h. Foi feita a lavagem com tampão de cacodilato 0,1M (pH 7,2-7,4) três vezes deixando 30 minutos em cada lavagem. Posteriormente as amostras foram pós-fixadas numa solução de 2,0% tetróxido de ósmio (1,25% em água) de ferrocianeto de potássio (2,5%+tampão cacodilato 0,2M) durante 1 h á temperatura ambiente, e foi feita uma segunda lavagem com tampão de cacodilato 0,1M (pH 7,2-7,4) três vezes deixando 30 minutos em cada lavagem.

Posteriormente, as amostras foram submetidos a um procedimento de criofratura, onde foram adicionadas algumas gotas nas amostras pos-fixadas de glicerol (30% em tampão cacodilato 0,1M), que desempenhou um papel de crioprotetor. As gotas foram adicionadas em intervalos de 5 minutos de modo que ao final de 30 minutos o volume inicial contido nos eppendorfs com as amostras foi dobrado. Após 3 horas, foi descartado todo o líquido dos eppendorfs, as amostras foram armazenados em freezer -80°C até o dia posterior, quando as amostras foram mergulhadas em

nitrogênio líquido e foram feitas as criofraturas com auxílio de pinças previamente armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Após a pós-fixação, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, submetidos a secagem no ponto crítico do  $\text{CO}_2$ , revestidos com 10 nm de ouro puro em um revestidor por crepitação a vácuo e avaliados em um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV, Jeol Inc. EUA). As imagens digitais (1000x) foram coletadas aleatoriamente dos cortes longitudinais.

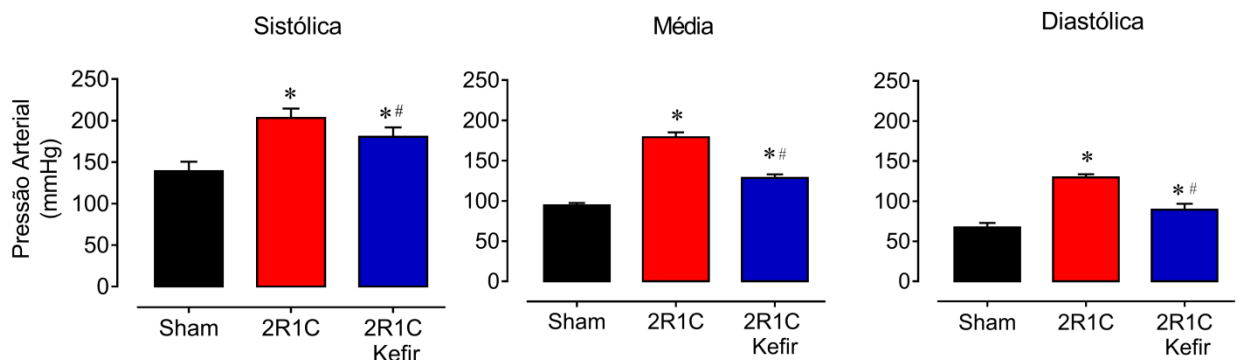
#### **4.13 Análises estatísticas**

Nas curvas dose-resposta, a resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e o log da dose do agonista que produziu metade da  $R_{\text{máx}}$  (log EC50) foram calculados por regressão não linear (Prism 5, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). As respostas vasoconstritoras à Phe foram expressas como porcentagem de contração em relação ao nível máximo de contração ao KCl. A sensibilidade ao agonista foi expressa como pEC50 ( $-\log \text{EC50}$ ). Foi utilizada análise de variância (ANOVA) de 2 vias para medidas repetidas, seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Parâmetros hemodinâmicos e avaliações de peso dos órgãos

De acordo com a figura 4, os animais 2R1C mostraram um aumento na PAM ( $179 \pm 6$  mmHg\*) quando comparados aos animais do grupo Sham ( $94 \pm 2$  mmHg). O mesmo aconteceu com a PAS, sendo que o grupo 2R1C apresentou elevação neste parâmetro ( $203 \pm 11$  mmHg\*) quando comparado ao grupo Sham ( $139 \pm 11$  mmHg). Na PAD enquanto o grupo normotenso estava com ( $67 \pm 5$  mmHg) o grupo hipertenso apresentou ( $129 \pm 4$  mmHg\*). A administração de Kefir por 60 dias provocou uma atenuação significativa nos níveis pressóricos dos animais tratados, sendo os valores encontrados  $128 \pm 4$  mmHg\* # de PAM,  $180 \pm 11$  mmHg\*# PAS e  $89 \pm 7$  mmHg\*# PAD.

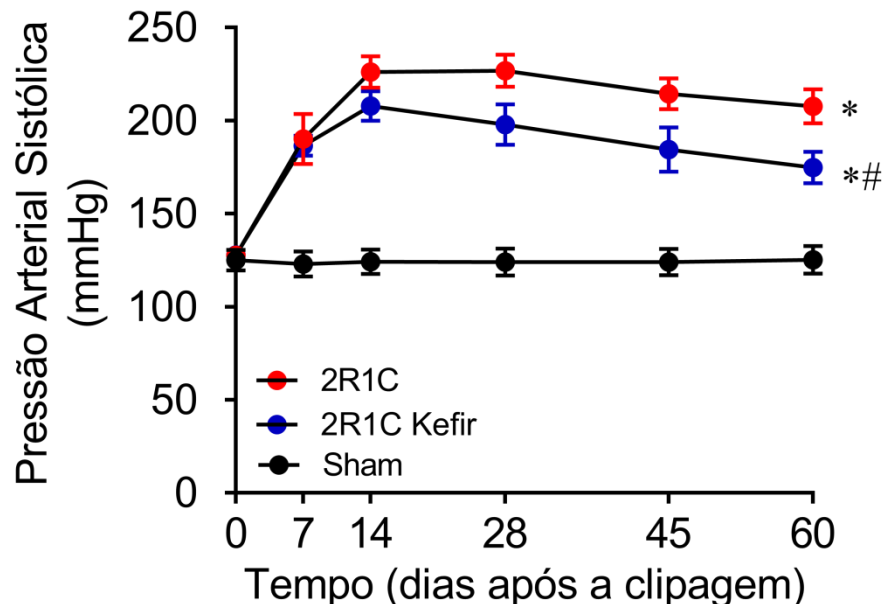


**Figura 4.** Pressão arterial verificada através da canulação da artéria femoral. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C.

Vemos que nos registros da pressão acompanhada através da pletismografia (figura 4), o primeiro dia de registro, antes da cirurgia para implantação do clipe ou a cirurgia fictícia, a PAS encontrou-se semelhante em todos os grupos. Após 7 dias, na segunda aferição, os animais 2R1C tratados ( $187 \pm 5$  mmHg\*) e não tratados ( $190 \pm 14$  mmHg\*) apresentaram PAS elevada em relação ao grupo Sham ( $123 \pm 7$

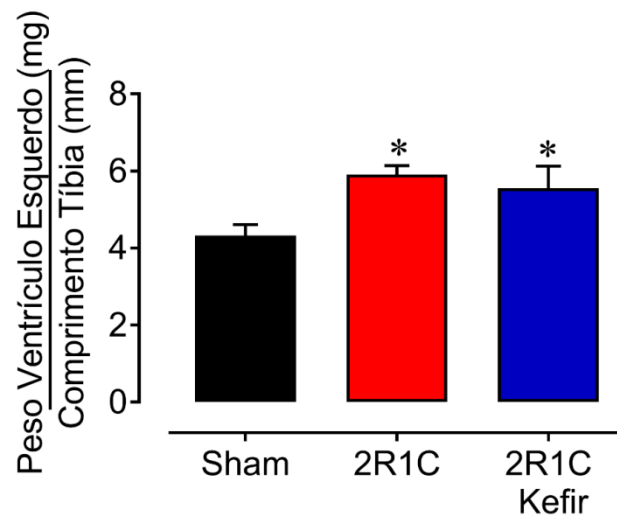
mmHg), mostrando que a cirurgia realizada para indução da hipertensão renovascular foi bem sucedida. Após 14 dias os animais hipertensos atingiram o pico de pressão, o grupo 2R1C ( $226 \pm 9$  mmHg\*) e grupo Kefir ( $208 \pm 8$  mmHg\*) mantiveram-se com a pressão elevada quando comparados com o grupo Sham ( $124 \pm 7$  mmHg).

Após 28 dias, não houveram diferenças significativas entre o grupo 2R1C veículo e 2R1C tratado com Kefir. Somente com 60 dias de tratamento com Kefir, na ultima semana de aferição os níveis pressóricos foram atenuados nos animais clipados com redução de 33 mmHg quando comparados aos animais 2R1C.



**Figura 5.** Pressão arterial verificada pela pletismografia de cauda. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C.

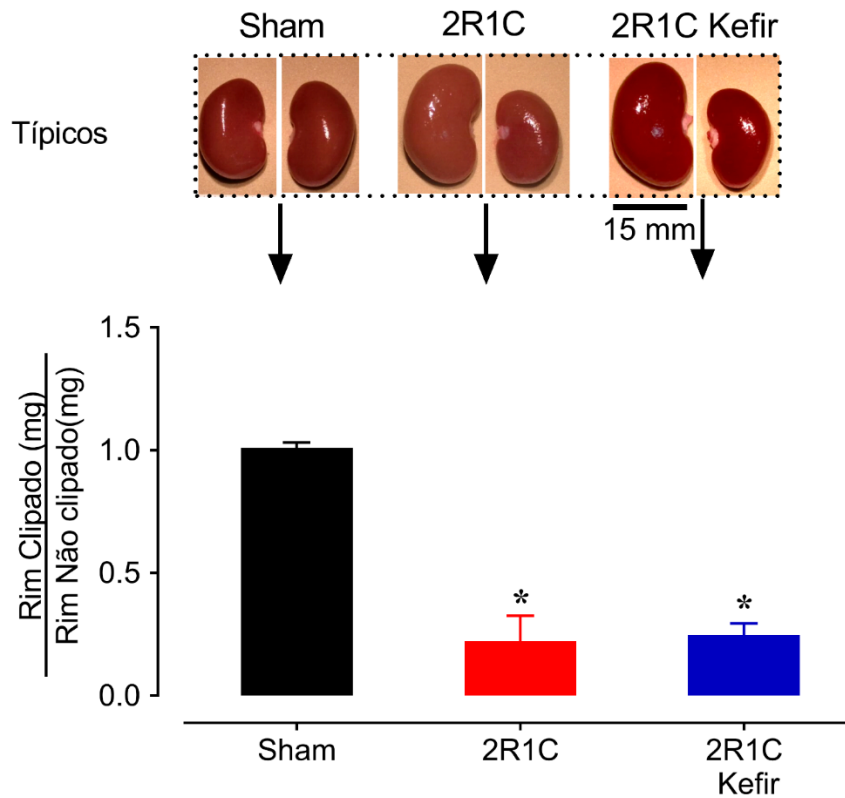
Na análise da hipertrofia cardíaca, a razão do peso do coração pelo comprimento da tibia foi avaliada (Figura 6), os animais hipertensos apresentaram aumento do ventrículo esquerdo ( $5,9 \pm 0,2$  mg/mm) quando comparados aos animais normotensos ( $4,3 \pm 0,2$  mg/mm). Apesar de a pressão ter sido reduzida o kefir não foi capaz de diminuir a hipertrofia cardíaca nos animais tratados ( $5,5 \pm 0,5$  mg/mm).



**Figura 6.** Avaliação da hipertrofia cardíaca através da relação entre o peso do VE e comprimento da tíbia. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham.

Conforme observado na figura 7, os animais 2R1C ( $0,22 \pm 0,1$  RE/RD\*) apresentaram diminuição na razão entre o rim clipado e o rim contralateral quando comparado aos animais do grupo sham ( $1,01 \pm 0,02$  RE/RD). No entanto, o tratamento com o Kefir ( $0,24 \pm 0,04$  RE/RD\*) não foi capaz de reverter essa diminuição.



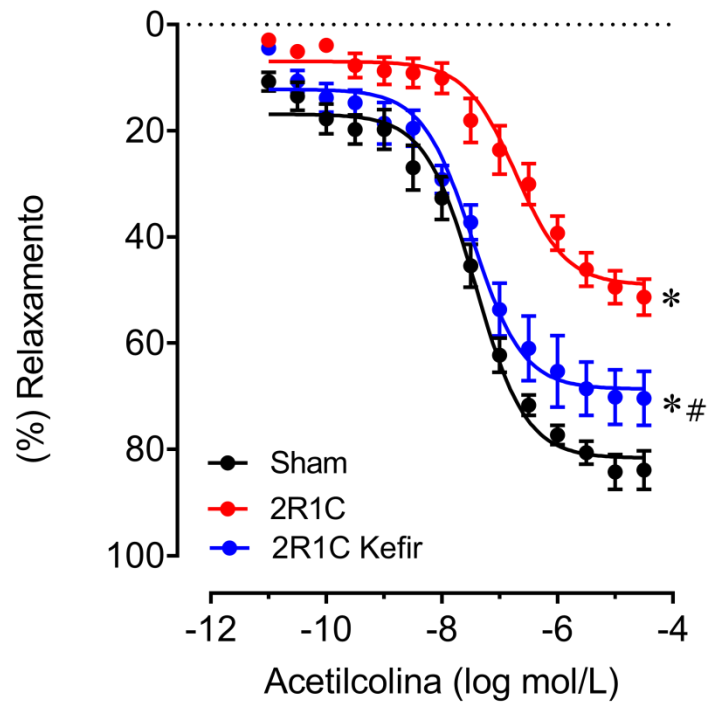


**Figura 7.** Relação entre o peso de rim clipado e do rim contralateral, juntamente com imagens macrofotográficas típicas dos rins de cada grupo. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham.

## 5.2 Reatividade vascular

### 5.2.1 Efeito do Kefir na vasodilatação dependente do endotélio

Para avaliar a função endotelial dos grupos estudados foram feitas curvas de relaxamento à ACh após a pré-contracção com Phe em anéis de aorta. Na figura 8 podemos observar que os animais 2R1C ( $56 \pm 4\%$ ) apresentaram um prejuízo significativo no relaxamento quando comparados com o grupo Sham ( $85 \pm 4\%$ ). O tratamento com Kefir durante 60 dias ( $72 \pm 5\%$ ) foi capaz de melhorar o relaxamento e a sensibilidade a ACh dos animais hipertensos quando comparados com o grupo 2R1C.



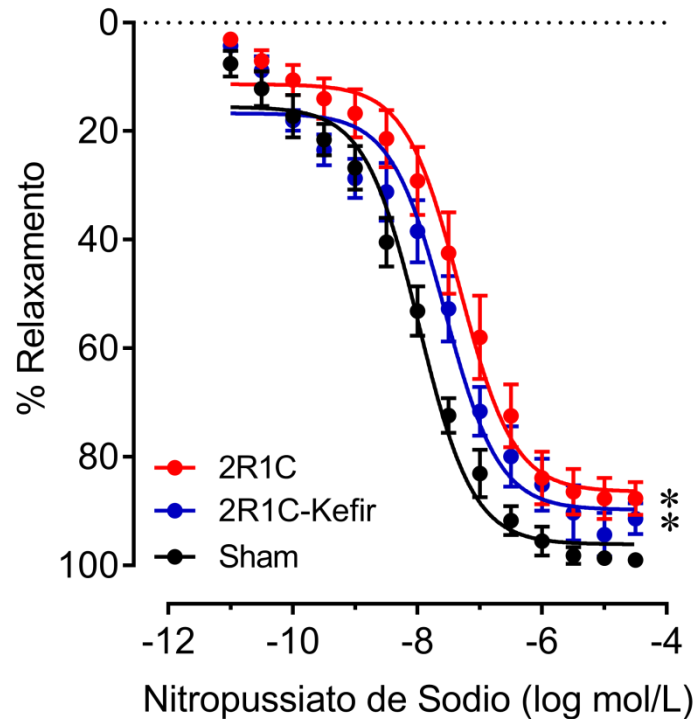
| PARAMETROS              | Sham    | 2R1C     | 2R1C Kefir |
|-------------------------|---------|----------|------------|
| $R_{max}$ (%)           | 85±4    | 56±4*    | 72±5#      |
| $pEC_{50}$ (-log mol/L) | 7.4±0.3 | 6.7±0.7* | 7.4±0.4*   |

**Figura 8.** Representação gráfica das curvas dose-resposta à acetilcolina. Curvas comparativas entre os resultados dos animais Sham, 2R1C e 2R1C tratados com Kefir.  $R_{max}$ : resposta máxima (eficácia) e  $pEC_{50}$ : logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade) em cada um dos grupos experimentais. Valores expressos como média ± EPM. \* $p < 0,05$  Sham vs. 2R1C e # $p < 0,05$  2R1C vs. 2R1C Kefir.

### 5.2.2 Efeito do Kefir na vasodilatação independente do endotélio

Para verificar o desempenho do músculo liso vascular na vasodilatação dos animais hipertensos bem como o efeito do kefir, foi feita curva de relaxamento com o NPS (figura 9), que é um doador de NO. Observamos que a resposta máxima nos vasos dos animais 2R1C (87±3%) apresentou uma pequena redução quando comparados com o grupo Sham (96±2%), e também houve uma diminuição na sensibilidade desses animais hipertensos (7,4±0,2 -log mol/L) em relação ao grupo Sham (8,0±0,1

-log mol/L). O grupo Kefir ( $90\pm 3\%$ ) não apresentou diferença na resposta máxima e na  $pEC_{50}$  quando com o grupo 2R1C. Ou seja, o tratamento com Kefir não capaz de restaurar a disfunção muscular encontrada nos animais hipertensos.

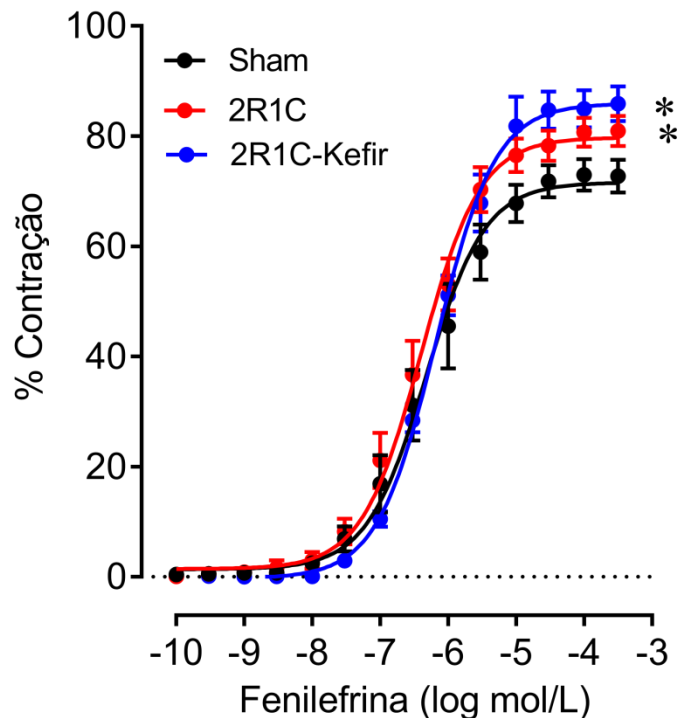


| PARAMETROS              | Sham         | 2R1C         | 2R1C Kefir   |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|
| $R_{TMAX}$ (%)          | $96\pm 2$    | $87\pm 3$    | $90\pm 3$    |
| $pEC_{50}$ (-log mol/L) | $8.0\pm 0.1$ | $7.4\pm 0.2$ | $7.4\pm 0.2$ |

**Figura 9.** Representação gráfica das curvas dose-resposta ao Nitropussiato de sódio. Curvas comparativas entre os resultados dos animais Sham, 2R1C e 2R1C tratados com Kefir.  $R_{m\acute{a}x}$ : resposta máxima (eficácia) e  $pEC_{50}$ : logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade) em cada um dos grupos experimentais. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  Sham vs. 2R1C e # $p < 0,05$  2R1C vs. 2R1C Kefir.

### 5.2.3 Efeito do Kefir na resposta vasoconstrictora

A resposta vasoconstrictora dos grupos foi avaliada através de curva com Phe (figura 10). O grupo 2R1C ( $80\pm 2\%$ ) apresentou diferença na resposta máxima em relação aos animais do grupo Sham ( $73\pm 2\%$ ), o que mostra uma hipereatividade nos animais hipertensos. O grupo 2R1C Kefir ( $86\pm 3\%$ ) não diferiu do grupo 2R1C, sendo assim, o tratamento não diminuiu essa hiperatividade.



| PARAMETROS              | Sham         | 2R1C         | 2R1C Kefir   |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|
| $R_{\text{máx}}$ (%)    | $73\pm 2$    | $80\pm 2$    | $86\pm 3$    |
| $pEC_{50}$ (-log mol/L) | $7.3\pm 0.2$ | $7.4\pm 0.2$ | $7.1\pm 0.1$ |

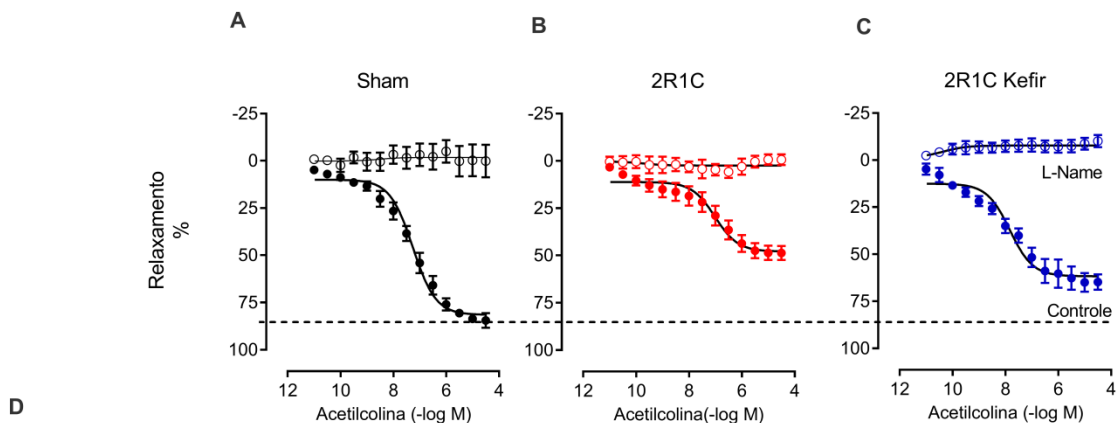
**Figura 10.** Representação gráfica das curvas dose-respostaa Fenilefrina. Curvas comparativas entre os resultados dos animais Sham, 2R1C e 2R1C tratados com Kefir.  $R_{\text{máx}}$ : resposta máxima (eficácia) e  $pEC_{50}$ : logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade) em cada um dos grupos experimentais. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  Sham vs. 2R1C e # $p < 0,05$  2R1C vs.2R1C Kefir.

### 5.2.4 Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento

## dependente do endotélio

A avaliação do papel da via do NO no relaxamento induzido pela ACh foi realizado por meio da incubação dos anéis de aorta com L-NAME, um inibidor não seletivo da eNOS. O bloqueio ocasionou uma redução no relaxamento de todos os grupos estudados, como podemos observar na figura 11. No entanto, a influência do bloqueio de NO na resposta a ACh foi diferente entre os grupos, conforme mostrado pela diferença na área abaixo da curva na presença ou sem a presença de bloqueio, em cada um dos grupos estudados, no qual a diminuição do relaxamento provocado pelo L-NAME representa a participação do NO na vasodilatação. O NO pode ser considerado o principal vasodilatador em anéis de aorta, visto que o bloqueio com L-NAME abole praticamente toda a resposta vasodilatadora nos grupos.

A participação do NO no relaxamento dependente do endotélio do grupo 2R1C (dAUC:  $255 \pm 11$  a.u.) se mostrou 33% menor, quando comparado ao grupo Sham (dAUC:  $169 \pm 9$  a.u.). A disfunção vascular observada nos animais 2R1C com redução da participação do NO na vasodilatação dependente do endotélio foi restaurada pelo tratamento com Kefir, pelo aumento da área abaixo da curva observada nos animais tratados (dAUC:  $247 \pm 8$  a.u.).



D

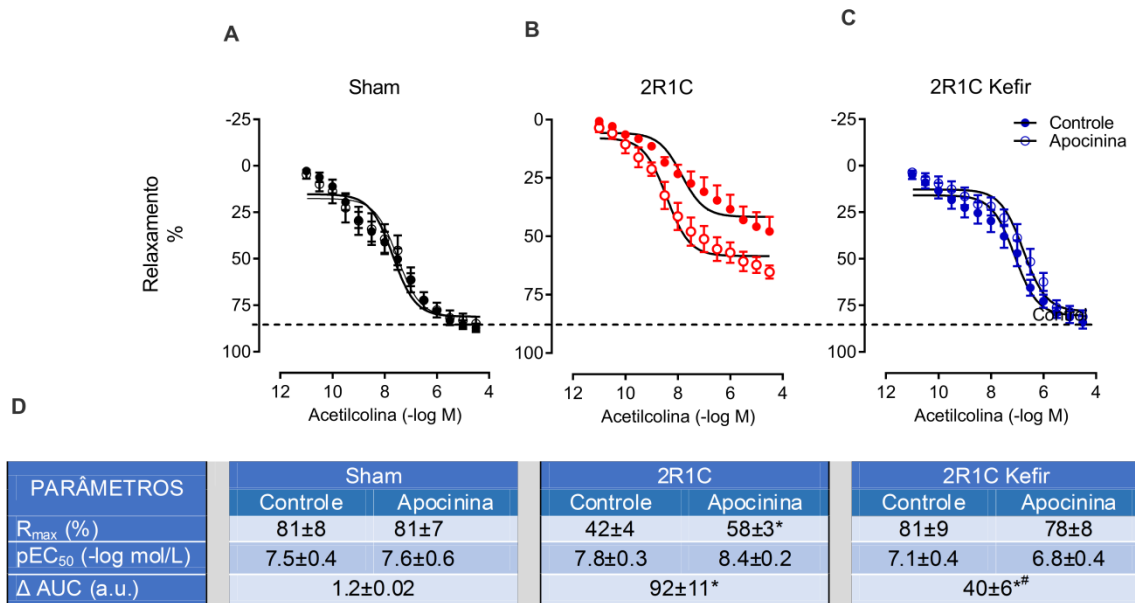
| PARÂMETROS              | Sham          |                  | 2R1C          |                 | 2R1C Kefir       |                  |
|-------------------------|---------------|------------------|---------------|-----------------|------------------|------------------|
|                         | Controle      | L-Name           | Controle      | L-Name          | Controle         | L-Name           |
| $R_{max}$ (%)           | $81 \pm 8$    | $-1.8 \pm 0.3^*$ | $48 \pm 4$    | $2.4 \pm 0.4^*$ | $62 \pm 7$       | $-7.8 \pm 0.7^*$ |
| $pEC_{50}$ (-log mol/L) | $7.2 \pm 0.4$ | $8.5 \pm 0.6$    | $7.0 \pm 0.2$ | $9.7 \pm 0.4^*$ | $7.8 \pm 0.5$    | $10.4 \pm 0.3^*$ |
| $\Delta$ AUC (a.u.)     | $255 \pm 11$  |                  | $162 \pm 9^*$ |                 | $247 \pm 8^{\#}$ |                  |

**Figura 11.** Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) no relaxamento dependente do endotélio A – Refere-se à curva de relaxamento do grupo Sham na presença e ausência do bloqueio realizado com L-NAME. B – Refere-se à curva de relaxamento do grupo 2R1C na presença e ausência do bloqueio com L-NAME. C – Refere-se à curva de relaxamento do grupo 2R1C tratado com kefir na presença e ausência de L-NAME. D – Representação da diferença entre a área abaixo da curva (dAUC); R<sub>máx</sub>: resposta máxima (eficácia) e pEC<sub>50</sub>: logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade) na presença e ausência do bloqueio realizado com L-NAME em cada um dos grupos experimentais. Podemos verificar que o NO tem maior participação no relaxamento do grupo sham e no tratado com kefir quando comparado com o grupo 2R1C. Valores expressos como média ± EPM. \*p<0,05 em relação ao grupo Sham; # p<0,05 em relação ao grupo 2R1C.

### **5.2.5 Avaliação da participação das espécies reativas de oxigênio (ERO's) no relaxamento dependente do endotélio**

Para a avaliação da influência do estresse oxidativo provocado pela NADPH oxidase no relaxamento vascular à ACh, os anéis foram previamente incubados com o antioxidante apocinina, seguindo-se da construção de curvas dose-resposta frente à administração de doses crescentes de acetilcolina.

Este inibidor não alterou a resposta a ACh no grupo Sham, quando comparada a condição controle (dAUC:1,2 ± 0,02). Entretanto, os animais submetidos a hipertensão renovascular apresentaram um aumento no relaxamento induzido pela ACh (dAUC:92 ± 11), enquanto que o tratamento com Kefir restaurou parcialmente a condição vascular observada nos animais hipertensos (dAUC:40 ± 6) (figura 12). Desta maneira, infere-se que o tratamento foi eficiente em reduzir o estresse oxidativo nestes animais, visto que o papel das ERO's na vasodilatação dos animais tratados é mínimo.

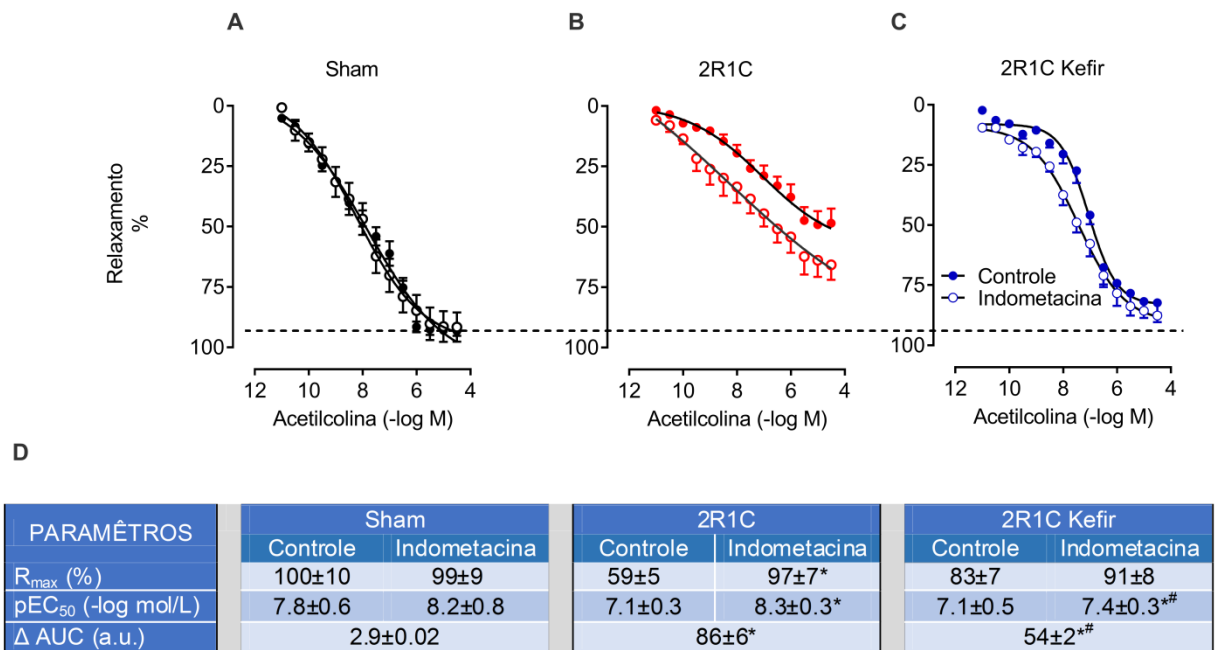


**Figura 12.** Participação das ERO's no relaxamento dependente do endotélio. A- Refere-se à curva de relaxamento do grupo sham na presença e ausência do inibidor apocinina. B – Refere-se a curva de relaxamento do grupo 2R1C na presença e ausência do inibidor apocinina, podemos observar que a inibição da NADP(H) promove aumento do relaxamento neste grupo C – Refere-se a curva de relaxamento do grupo 2R1C tratado com kefir na presença e ausência do inibidor indometacina. D – Representação da diferença entre as áreas abaixo da curva (dAUC);  $R_{max}$ : resposta máxima (eficácia) e  $pEC_{50}$ : logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade) na presença e ausência do inibidor apocinina em cada um dos grupos experimentais. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  em relação ao grupo Sham; #  $P < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C.

### 5.2.6 Avaliação da participação dos prostanóides derivados da Ciclooxygenase no relaxamento dependente do endotélio

Para avaliação da via do ácido araquidônico-ciclooxygenase e a influência da participação dos prostanóides na vasodilatação, os anéis foram previamente incubados com indometacina, seguindo-se da construção de curvas dose-resposta frente à administração de doses crescentes de acetilcolina.

No grupo Sham não foi encontrada evidência da participação dos prostanóides na vasodilatação, visto que não houve diferença no relaxamento dos anéis após ter adicionado a indometacina. O grupo 2R1C apresentou um maior relaxamento após o bloqueio, mostrando que provavelmente o aumento dos prostanoídes vasoconstrictores dessa via estava prejudicando o relaxamento no grupo hipertenso. O tratamento com Kefir não fez diferença no relaxamento antes e depois do bloqueio assemelhando-se ao grupo normotenso.

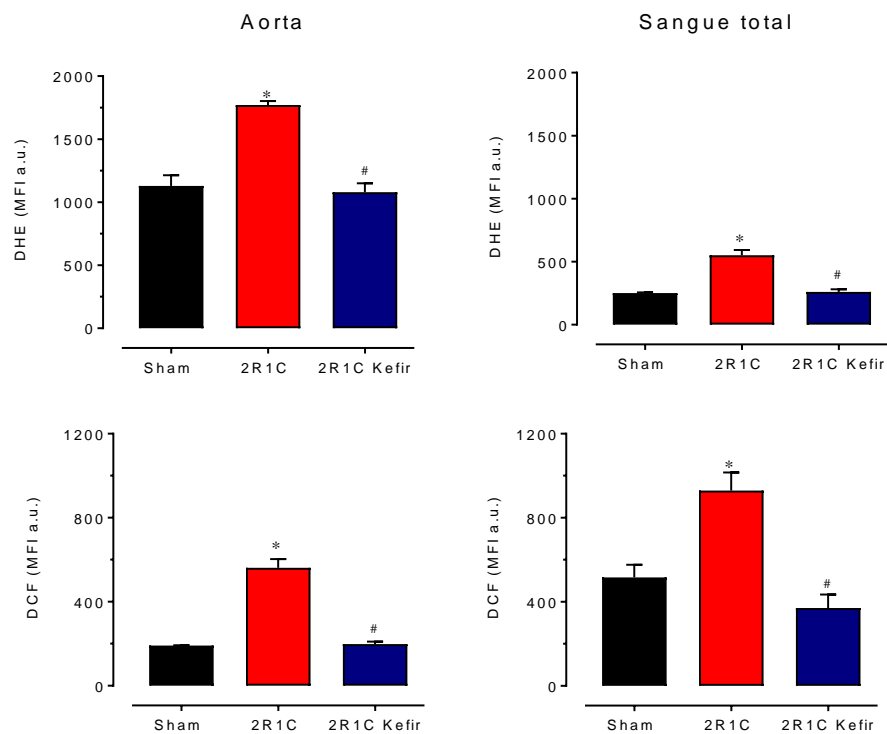


**Figura 13.** Participação dos prostanóides derivados da ciclooxigenase no relaxamento dependente do endotélio A – Refere-se à curva de relaxamento do grupo sham na presença e ausência de indometacina (Indo). B – Refere-se a curva de relaxamento do grupo 2R1C na presença e ausência de Indo. C – Refere-se a curva de relaxamento do grupo 2R1C tratado com kefir na presença e ausência do bloqueio de indo. D – Representação da diferença entre as áreas abaixo da curva (dAUC);  $R_{max}$ : resposta máxima (eficácia),  $pEC_{50}$ : logaritmo negativo da concentração necessária para produzir 50% da resposta máxima (sensibilidade) na presença e ausência do inibidor indo em cada um dos grupos experimentais. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C.



### 5.3 Determinação dos níveis de $\bullet\text{O}_2$ e $\text{H}_2\text{O}_2$ nas células de aorta e sangue

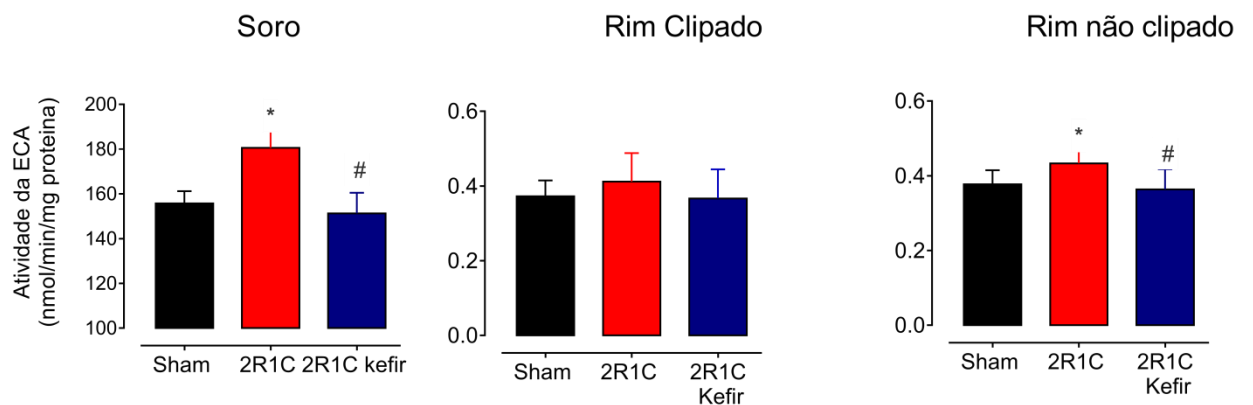
A determinação dos níveis de ERO's foi feita pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI – u.a.) emitida pela ligação das sondas DHE e DCFH-DA com o  $\bullet\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , respectivamente, produzidos pelas células. Na figura 8 observamos que os animais hipertensos apresentam um aumento da produção de ERO's nas células isoladas da aorta (DHE:  $1771 \pm 32$ ; DCF:  $562 \pm 41$  a.u) em comparação as células do grupo sham (DHE:  $1129 \pm 85$ ; DCF:  $191 \pm 2$  a.u) e tratado com Kefir (DHE:  $1080 \pm 70$ ; DCF:  $198 \pm 11$  a.u.). Semelhantemente, houve aumento de ERO's no sangue de ratos hipertensos (DHE:  $551 \pm 42$ ; DCF  $929 \pm 86$  a.u) quando comparados com o grupo sham (DHE:  $251 \pm 5$ ; DCF:  $516 \pm 60$  a.u) e o tratamento com Kefir normalizou a produção de ERO's (DHE:  $260 \pm 60$ ; DCF:  $370 \pm 64$  a.u). Estes dados mostram o aumento da produção de ERO's levando ao estresse oxidativo em células de aorta e sangue de animais hipertensos e o tratamento com Kefir foi capaz de promover uma diminuição das ERO's, e conseqüentemente diminuir o estresse oxidativo nesses animais.



**Figura 14.** Representação gráfica da citometria de fluxo comparando a intensidade da fluorescência do DHE e DCF nos grupos sham, 2R1C e 2R1C tratado com kefir. A – presença de  $\bullet\text{O}_2$  em aortas dos diferentes grupos experimentais. B – presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em aortas dos diferentes grupos experimentais. C – presença de  $\bullet\text{O}_2$  no sangue dos diferentes grupos experimentais. D – presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em aortas dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos como média  $\pm$  EPM . \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C.

#### 5.4 Determinação da atividade da ECA no soro e nos rins

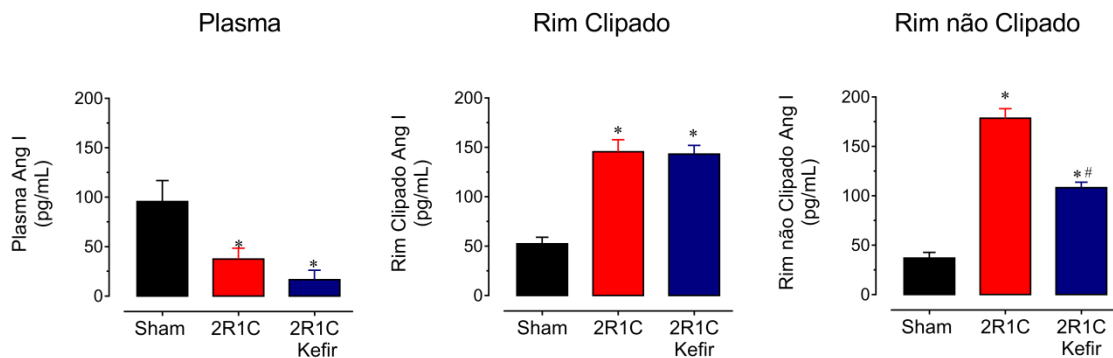
Ao avaliar a atividade da ECA nos rins e soro, percebemos que houve um aumento da atividade dessa enzima no soro de animais hipertensos ( $174 \pm 11$  nmol/min/mg) em relação ao grupo normotenso ( $151 \pm 6$  nmol/min/mg). Nos rins, quando analisamos o rim clipado, observamos que não houve diferença significativa em nenhum dos grupos, já no rim contralateral não clipado a atividade da ECA mostrou-se maior no grupo hipertenso ( $0,48 \pm 0,05$  nmol/min/mg) quando comparado com o grupo sham ( $0,35 \pm 0,03$  nmol/min/mg). Observamos também, que o tratamento com kefir foi capaz de diminuir a atividade da ECA no soro ( $148 \pm 8$  nmol/min/mg) e no rim não clipado ( $0,31 \pm 0,01$  nmol/min/mg), mostrando que o kefir pode estar exercendo algum efeito sobre essa enzima, e esse é possivelmente um de seus mecanismos para redução da pressão.



**Figura 15.** Representação da atividade da ECA no soro e nos rins feita através da utilização do substrato Zphe- His Leu. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \*P<0,05 em relação ao grupo Sham; # P<0,05 em relação ao grupo 2R1C.

### 5.5 Dosagem Plasmática de Angiotensina I, II e 1-7

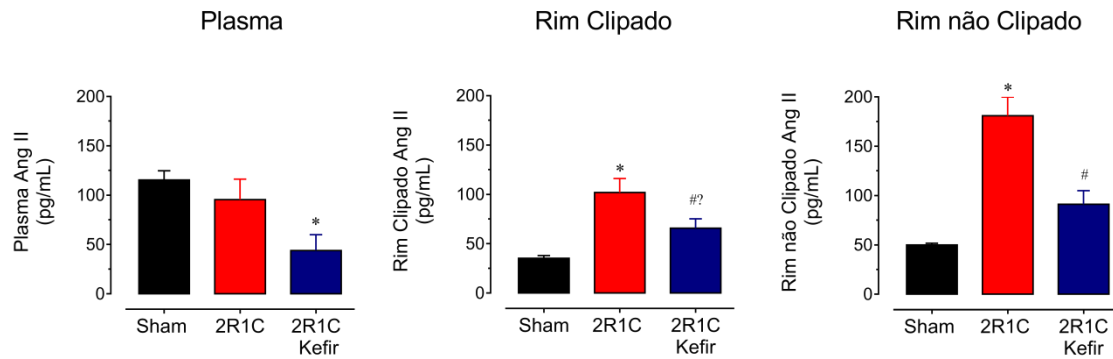
Um importante dado obtido em nosso trabalho foi a dosagem plasmática de Ang I, Ang II e Ang 1-7. Conforme observado na figura 16, os níveis de Ang I plasmáticas apresentaram-se reduzidos nos grupos 2R1C ( $40\pm 5$  pg/mL) e 2R1C Kefir ( $16\pm 3$  pg/mL) em relação ao grupo sham ( $83\pm 9$  pg/mL), porém no rim clipado houve aumento nos grupo 2R1C ( $145\pm 12$  pg/mL) e 2R1C Kefir ( $143\pm 8$  pg/mL) em relação ao grupo Sham ( $52\pm 6$  pg/mL). Na dosagem do rim contralateral, também se percebeu um aumento significativo de Ang I no grupo hipertenso ( $178\pm 9$  pg/mL), no entanto, o tratamento com kefir foi capaz de atenuar esses níveis elevados ( $108\pm 5$  pg/mL), mas não ao ponto de atenuá-los ( $36\pm 5$  pg/mL).



**Figura 16.** Gráfico representando os efeitos da indução da hipertensão renovascular sobre os níveis teciduais de angiotensina I após 60 dias da cirurgia. Os valores indicam a média  $\pm$  EPM. \*p<0,05 em relação ao grupo Sham; # p<0,05 em relação ao grupo 2R1C.

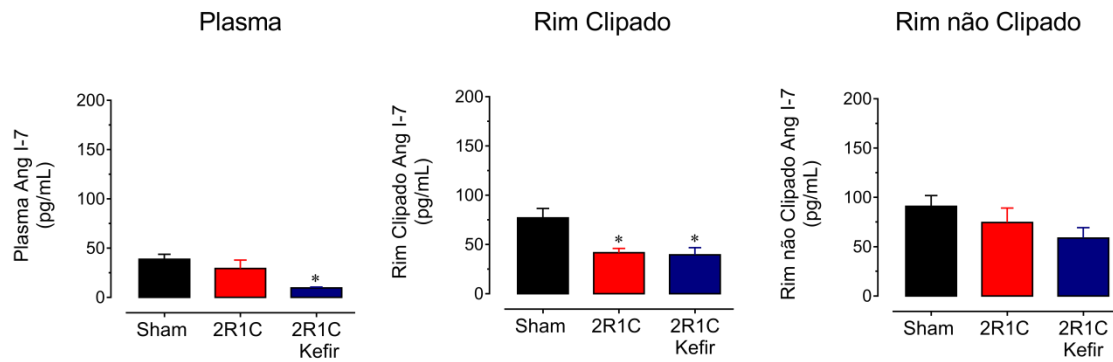
Na dosagem de Ang II (figura 17) plasmática não encontramos nenhuma mudança nos níveis desse peptídeo quando comparamos o grupo 2R1C ( $110\pm 9$  pg/mL) com o sham ( $87\pm 18$  pg/mL). Porém nos rins clipado e contralateral os níveis de Ang II foram elevados no grupo 2R1C ( $101\pm 14$  pg/mL;  $180\pm 19$  pg/mL) em comparação ao

grupo normotenso ( $35 \pm 2$  pg/mL;  $49 \pm 1$  pg/mL), e o tratamento com Kefir foi capaz de diminuir esses níveis ( $65 \pm 9$  pg/mL;  $91 \pm 13$  pg/mL).



**Figura 17.** Gráfico representando os efeitos da indução da hipertensão renovascular sobre os níveis teciduais de angiotensina II após 60 dias da cirurgia. Os valores indicam a média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C.

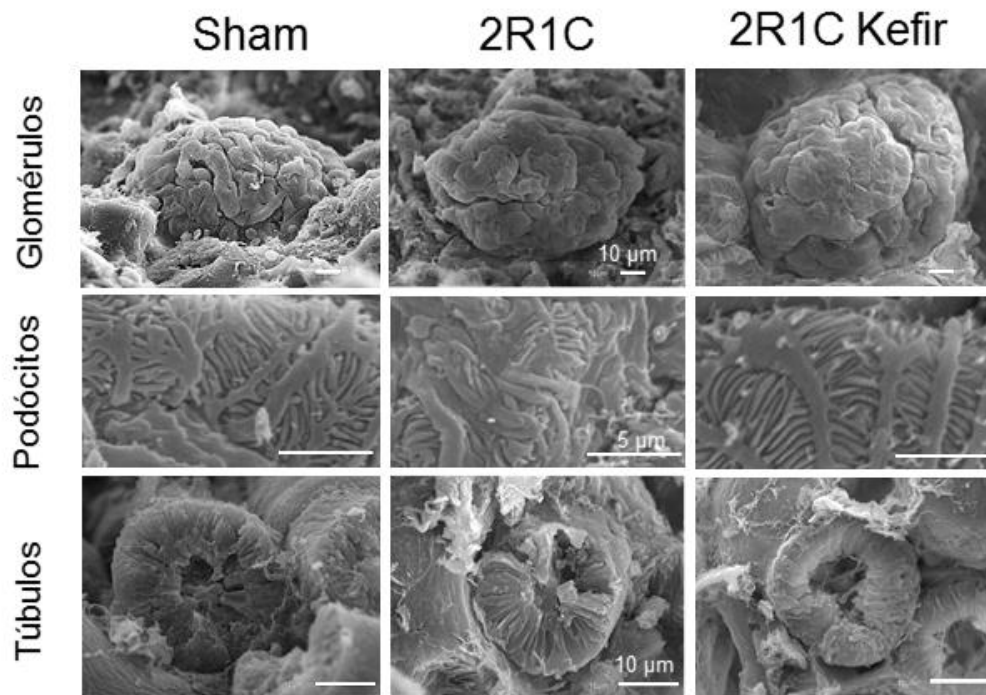
Na figura 18 podemos observar que os níveis de Ang 1-7 no grupo tratado com kefir ( $10 \pm 1$  pg/mL) estavam reduzidos em relação aos grupos Sham ( $38 \pm 5$  pg/mL) e 2R1C ( $21 \pm 3$  pg/mL) no plasma. No rim clipado, tanto o 2R1C ( $41 \pm 4$  pg/mL) como o grupo 2R1C kefir ( $39 \pm 7$  pg/mL) mostraram níveis menores de Ang 1-7 quando comparados ao grupo normotenso ( $77 \pm 9$  pg/mL). No rim cotralateral não encontramos nenhuma diferença entre os grupos (Sham:  $90 \pm 11$  pg/mL; 2R1C:  $74 \pm 14$  pg/mL; 2R1C Kefir:  $58 \pm 10$  pg/mL).



**Figura 18.** Gráfico representando os efeitos da indução da hipertensão renovascular sobre os níveis teciduais de angiotensina 1-7 após 60 dias da cirurgia. Os valores indicam a média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham; #  $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C.

## 5.6 Microscopia eletrônica de varredura dos rins

Na análise da estrutura renal feita através da microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar que os podócitos dos glomérulos, bem como os túbulos renais dos animais normotensos e no grupo tratado com kefir se apresentaram preservados. No grupo hipertenso percebeu-se que os túbulos estavam danificados e os podócitos mais tortuosos (Figura 19).



**Figura 19.** Imagens feitas através de microscopia de varredura ilustrando glomérulos, podócitos e túbulos renais dos rins esquerdos.

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo investigou os efeitos do Kefir na reatividade vascular em ratos com hipertensão renovascular. Conforme esperado, os animais 2R1C apresentaram uma PAM, PAS e PAD elevada em relação ao grupo Sham, e o Kefir reduziu a PA significativamente.

Classicamente, o mecanismo que leva a hipertensão no modelo 2R1C, pode ser explicado pelo efeito vasoconstritor direto da Ang II e aos efeitos mineralocorticóides da aldosterona. A Ang II é um potente vasoconstritor que apresenta dois efeitos principais que podem elevar a pressão arterial. O primeiro é a vasoconstrição em várias regiões do corpo, com maior intensidade nas arteríolas, ao aumentar a liberação de noradrenalina pelas terminações nervosas simpáticas encontradas nos vasos e também a secreção do vasoconstritor endotelina I. A constrição das arteríolas aumenta a resistência periférica total, levando ao aumento da pressão arterial. A segunda forma pela qual a Ang II eleva a pressão arterial é ao diminuir a excreção de sal e água pelos rins, o que aumenta o volume do fluido extracelular e, conseqüentemente a volemia, ao estimular a secreção de aldosterona pelo córtex adrenal, a sede e a secreção de hormônio antidiurético (ADH) pela glândula pituitária (Guyton & Hall, 2006). O volume circulatório aumentado associado a um maior estímulo simpático proporciona a elevação do débito cardíaco que, acrescido da ação vasoconstritora provocada pela Ang II elevam a PA (Silverthorn, 2003).

Indiretamente, a Ang II aumenta a frequência cardíaca em decorrência da facilitação do tônus simpático, do aumento da neurotransmissão noradrenérgica e da liberação de catecolaminas pela adrenal (Hu et al., 1998).

Jauhiainen e colaboradores (2012) sugerem que o mecanismo que provoca o efeito anti-hipertensivo de produtos derivados de leite fermentado, em parte, pode ser devido a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). Trabalhos anteriores mostraram o efeito protetivo do Kefir em ratos SHR tratados por 60 dias,

diminuindo a pressão arterial, atenuando o tônus simpático e aumentando o tônus vagal, conseqüentemente contribuindo para o ganho do barorreflexo (Friques, *et al.*, 2015; Gómez-Guzmán *et al.*, 2015; Klippel *et al.*, 2016). Kanbak e colaboradores (2014), também demonstraram efeitos benéficos do kefir em ratos hipertensos que receberam dieta hiperssódica durante 30 dias, onde o probiótico agiu reduzindo a pressão nesse modelo.

A *Lactobacillus kefiranofaciens* é responsável por produzir o exopolissacarídeo denominado como kefiran, que é o componente funcional principal da bebida (Hamet *et al.*, 2013). Anteriormente, a estrutura de kefiran isolado de cultura de *L. kefiranofaciens* foi elucidada, e mostrou-se ter a mesma estrutura que a extraída de grãos de Kefir. (Mukai *et al.*, 1990). Um estudo mostrou que o kefiran demonstrou ter efeitos na diminuição do aumento da pressão sanguínea e reduziu os níveis de colesterol séricos em ratos SHRSP/Hos quando consumiam colesterol dietético excessivo. Além disso, esse mesmo estudo também mostrou que o kefiran agiu diminuindo os níveis glicêmicos de camundongos diabéticos (Maeda *et al.*, 2004).

Os mecanismos relacionados com a normalização da pressão arterial e prevenção da disfunção endotelial de ratos tratados com Kefir, provavelmente estão relacionados com a redução de Ang II local e plasmática, além da redução do estresse oxidativo. A ECA possui grande participação no controle da pressão arterial devido a sua ação na formação de Ang II e na degradação de bradicinina, que tem efeito vasodilatador. Sendo assim, alimentos que contem peptídeos capazes de inibir a ECA, são exemplos de abordagens não farmacológicas no tratamento da hipertensão (Kanbak *et al.*, 2014).

Conforme esperado, ocorre uma diminuição significativa no peso de rins submetidos a estenose e uma hipertrofia nos rins contralaterais, que não foram clipados. Isso indica que o rim contralateral estava filtrando o fluxo sanguíneo que o rim clipado deixou de filtrar. O tratamento com Kefir durante 60 dias, porém, não foi capaz de recuperar a hipotrofia do rim estenosado.



Apesar do tratamento com kefir não ter recuperado a hipotrofia dos rins clipados, na microscopia eletrônica de varredura notamos que as estruturas renais estavam mais preservadas nos rins dos animais tratados em relação aos animais hipertensos. Dados semelhantes foram vistos por Barros (2011) que mostrou em seu trabalho que ao analisar os glomérulos de animais SHR na microscopia eletrônica de varredura os mesmos encontraram-se com suas estruturas danificadas. Outros estudos mostraram possíveis ações do kefir que podem estar associados com essa proteção aos rins, como sua capacidade de diminuir níveis de peroxidação lipídica, uréia plasmática, proteinúria, iNOS, além de agir reduzindo significativamente os níveis de Catepsina B e de fragmentação do DNA, resultando numa melhora da função renal melhora da função renal e diminuição da apoptose de animais diabéticos, hipertensos e que foram submetidos a isquemia-reperfusão (Punaro *et al.*, 2014; Kanbak *et al.*, 2014; Yener *et al.*, 2015).

O aumento de cardiomiócitos juntamente com o aumento da formação de tecido conjuntivo, leva ao aumento de massa no ventrículo esquerdo, denominada hipertrofia cardíaca. Sabe-se que a hipertrofia é tipicamente encontrada em casos de hipertensão, e essa hipertrofia sustentada faz com que o miocárdio se adapte ao aumento de carga aumentando a síntese proteica que culmina conseqüentemente no aumento da massa cardíaca (Frohlich *et al.*, 1992). Ademais, a Ang II também participa do desenvolvimento de hipertrofia cardiovascular ao estimular a síntese de determinadas proteínas nas células cardíacas (Sadoshima & Izumo, 1993).

Em outro trabalho de nosso laboratório o tratamento de 60 dias com Kefir foi capaz de reduzir a hipertrofia cardíaca encontrada em animais SHR (Friques *et al.*, 2015). No entanto, além do modelo de hipertensão experimental ser diferente, os resultados mostraram que apesar do Kefir diminuir a pressão dos ratos com hipertensão renovascular, os níveis pressóricos ainda se encontraram elevados quando comparados com animais normotensos. Logo, isso pode explicar o fato de não encontrarmos diminuição de hipertrofia nos animais tratados com Kefir.

Alguns trabalhos mostraram que animais onde a hipertensão renovascular foi mantida por mais de 4 semanas apresentaram uma diminuição no relaxamento dependente de endotélio em relação a animais normotensos (Touyz & Schiffrin, 2000; Navar *et. al.*, 2004; Guimarães, *et. al.*, 2010).

Observamos que a acetilcolina provocou resposta vasodilatadora, concentração-dependente, nos segmentos arteriais de animais de todos os grupos, porém, o relaxamento foi menor nos animais do grupo 2R1C veículo e no grupo kefir houve uma resposta semelhante ao grupo normotenso, mostrando que o kefir restaurou o relaxamento dependente do endotélio em ratos 2R1C.

De maneira semelhante, os resultados obtidos na curva com o nitroprussiato de sódio, doador de óxido nítrico, mostrou significativamente diferente entre os animais do grupo veículo com os normotensos, evidenciando que a hipertensão renovascular prejudicou o relaxamento independente do endotélio. Porém, o tratamento com kefir não foi capaz de restaurar a vasodilatação independente de endotélio. A avaliação independente do endotélio vascular corrobora com dados da literatura que demonstram que animais 2R1C apresentam alteração na resposta à curva concentração resposta ao nitroprussiato de sódio (Callera *et. al.*, 2004).

Além na diminuição do relaxamento dependente e independente do endotélio, nós encontramos aumento na contratilidade em aortas de animais hipertensos quando comparados a animais normotensos. Outros grupos também encontraram hipereatividade moderada ou acentuada em animais com hipertensão renovascular (Dias *et. al.*, 2014; Santuzzi *et. al.*, 2014). A disfunção encontrada em nosso trabalho provavelmente foi causada por um desequilíbrio nas vias de NO/ERO's, conforme os resultados de bloqueios dessas vias nos mostraram na reatividade. Nossos resultados mostram claramente que o tratamento com kefir foi capaz de diminuir a disfunção endotelial, aumentando o relaxamento com ACh.

As células endoteliais possuem o papel de atuar no controle do tônus vascular liberando substâncias vasoativas como o NO, EDHF, endotelina, Ang II e prostanóides derivados da via da ciclooxigenase-2. (Vasquez *et. al.*, 2016). Estes mediadores endoteliais participam nas respostas vasodilatadoras e na modulação das respostas vasoconstritoras. Anteriormente, foi descrito que a remoção do endotélio aumenta as respostas contráteis induzidas pela fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência (Briones *et. al.*, 2000; Xavier *et. al.*, 2004).

Uma das explicações para a disfunção endotelial dos animais hipertensos está associada com a diminuição da biodisponibilidade de NO pelo endotélio encontrada nesses animais. Alterações na via do NO, têm sido extensivamente descritas em estudos experimentais com hipertensão renovascular (Gava *et. al.*, 2008; Wu *et. al.*, 2012; Silva *et. al.*, 2014). Dentre os fatores vasoativos derivados do endotélio, o NO é o principal fator relaxante do endotélio que modula as respostas contráteis vasculares a diferentes agonistas (Li *et. al.*, 2014). Logo, avaliamos uma possível participação dessa via na melhora do relaxamento dependente de endotélio, fazendo uma curva concentração resposta à fenilefrina na presença de L-NAME, um inibidor inespecífico da síntese do NO. Este fármaco, ao inibir a eNOS, impede a síntese de NO e, conseqüentemente, a formação de GMPc na célula muscular. Nossos resultados mostraram que animais tratados com Kefir apresentaram maior biodisponibilidade de NO quando comparados com animais hipertensos, mostrando a participação dessa via como sendo uma das causas na melhora da disfunção endotelial.

Um estudo recente avaliou os efeitos de dois probióticos, *Lactobacillus fermentum* CECT5716 (LC40) e *L. coryniformis* (K8) mais *L. gasseri* (LC9), em ratos SHR. Esse estudo mostrou que, observando as curvas com bloqueio L-NAME, ambos os tratamentos probióticos melhoraram a biodisponibilidade de NO em animais SHR. Além disso, a atividade basal da eNOS foi aumentada após o tratamento crônico com K8/LC9 crônico, mostrando que o probiótico aumentou a fosforilação no sítio ativador Ser-1177. Sendo assim, as alterações funcionais observadas no relaxamento dependente do endotélio podem ser em partes atribuídas a uma

alteração na síntese de NO e/ou sua biodisponibilidade (Gómez-Guzmán *et al.*, 2015).

Outra explicação para a disfunção endotelial encontrada em nosso trabalho pode ser devido ao aumento de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ , conforme foi visto com a citometria, pois a formação excessiva dessas ERO's resulta em alterações estruturais e funcionais nos vasos, que são comuns na hipertensão e outras patologias (Paravicini, Touyz, 2006; Álvarez *et al.*, 2007; Bell *et al.*, 2009). O aumento de  $O_2^{\cdot-}$  pode ser explicado pela ação da Ang II na NADP(H) oxidase, pois esse peptídeo possui efeitos não-hemodinâmicos, atuando no aumento de apoptose através do aumento de fatores de crescimento, aumento de citocinas e consequente imunomodulação, e por fim níveis elevados de Ang II age aumentando a atividade da NADP(H) oxidase que é geradora de ERO's. Existem cada vez mais evidências que essas ações não-hemodinâmicas da Ang II lavam aos danos causados nos órgãos-alvo pela hipertensão (Wolf, 1998; Luft, 2001; Ruiz-ortega *et al.*, 2001).

Nossos resultados mostram que, em anéis de aorta de animais hipertensos com disfunção endotelial onde era feito bloqueio com apocinina, um fármaco responsável por bloquear NADP(H) oxidase, houve uma melhora significativa no relaxamento com ACh, como pode ser visto na área abaixo da curva. Mostrando, conforme esperado, que esses animais apresentavam níveis elevados de ERO's. O tratamento com Kefir não resultou em diferença no relaxamento dos anéis antes e depois do bloqueio com apocinina, mostrando que o probiótico agiu também na diminuição de ERO's na aorta desses animais. Friques e colaboradores (2015) encontraram resultados semelhantes ao usar kefir para o tratamento de ratos SHR.

Gomez-Guzman e colaboradores (2015) mostraram que o tratamento com probióticos reduziu  $O_2^{\cdot-}$  e diminuiu atividade da NADP(H) oxidase em ratos SHR. Além disso, eles avaliaram qual o mecanismo pelo qual esses probióticos agiram na diminuição da atividade da NADP(H) oxidase, e observaram que a expressão da subunidade catalítica NOX-1 que estava aumentada nos animais hipertensos foi reduzida pelo uso dos probióticos e isso poderia estar envolvido na redução dos

níveis de ERO's vascular induzida por esses probióticos. Nesse trabalho, encontramos dados semelhantes no aumento de ERO's e, apesar de não termos avaliado a expressão da NADP(H) oxidase, podemos dizer que esse mesmo mecanismo de redução da subunidade catalítica NOX-1 também possa estar envolvido nos mecanismos do kefir em nosso modelo experimental estudado.

Outra via que teve sua participação investigada na disfunção endotelial foi a dos prostanóides. Os prostanóides derivados da via da ciclooxigenase agem no leito vascular promovendo vasoconstrição e vasodilatação, logo, estão relacionados ao controle do tônus vascular em condições fisiológicas e patológicas. A produção destes prostanóides depende da disponibilidade de ácido araquidônico e da atividade das ciclooxigenases e das sintases das prostaglandinas (Davidge, 2001; Adeagbo *et. al.*, 2005; Alvarez *et. al.*, 2007).

Sabe-se que existem duas isoformas da ciclooxigenase, denominadas ciclooxigenase-1 (COX -1) e 2 (COX-2) que são responsáveis por realizar a síntese das prostaglandinas (PG) e do tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). As isoformas da COX convertem o ácido araquidônico em Prostaglandina H<sub>2</sub> e esta por ação de sintases específicas é convertida em prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α), prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) ou TXA<sub>2</sub> (Mardini & Fitzgerald, 2001).

Atualmente é bem conhecida a implicação dos prostanóides derivados desta via no processo patológico de várias doenças, além da participação da COX na manutenção de condições fisiológicas (Vane *et al.*, 1994). Em modelos experimentais de hipertensão, foi encontrada uma maior expressão da COX-2 e maior participação dos prostanóides contráteis derivados desta via na resposta vascular a fenilefrina (Alvarez *et. al.*, 2007).

A COX-2 é positivamente responsável pela disfunção endotelial em condições hipertensivas (Wong *et. al.*, 2010; Wong *et. al.*, 2011). Isso está relacionado à produção excessiva de vasoconstritores e ROS derivados da sobreativação da COX-

2 (Sirker *et. al.* 2011). O papel fundamental da *up-regulation* da COX-2 no desenvolvimento da disfunção endotelial na hipertensão está sendo cada vez mais reconhecido.

O bloqueio com indometacina, que é um inibidor inespecífico da cicloxigenase 1 e 2, teve como intuito principal à inibição de prostanóides contráteis derivados da COX-2. Foi observado que os animais veículo apresentaram uma resposta vasodilatadora maior quando foi adicionado a indometacina no banho de Krebs com os anéis de aorta, mostrando que nesses animais houve um aumento dos prostanóides contráteis que também parecem estar envolvidos na disfunção encontrada nesses animais. Os animais kefir, assim como os animais normotensos não apresentaram diferenças significativas quando comparamos as curvas com e sem esse bloqueio, logo isso nos indica que o kefir agiu nesses animais impedindo que houvesse aumento dos prostanóides contráteis.

Li e colaboradores (2016), demonstraram que a enzima pró-inflamatória COX-2 seja um contribuinte importante para a disfunção endotelial na hipertensão, como evidenciado pela ação protetora do inibidor de COX-2, celecoxibe, que proporcionou maior percentual de relaxamento e menor contração em relação ao grupo SHR que não recebeu o bloqueio, além também de mostrar a expressão de COX-2 aumentada em SHR. Esses resultados se assemelham com os nossos achados, apesar de termos usado um modelo de hipertensão e bloqueador distintos.

Outro estudo avaliou a relação existente entre Ang II e COX-2, onde foi evidenciado que culturas de células incubadas com Ang II (100 nmol/L) durante 8 horas, apresentaram *up-regulation* de COX-2. Esses resultados foram primeiro obtidos a partir da cultura de células endoteliais de ratos, mas também foram confirmados em um modelo animal *in vivo* de ratos hipertensos infundidos por Ang II e estendidos à cultura de artérias humanas (Wong *et. al.*, 2011). Como em nosso trabalho, ao dosarmos Ang II nos animais hipertensos e vimos que a mesma se encontra a níveis elevados nos rins, podemos inferir que esse também pode ser um mecanismo pelo qual os animais hipertensos apresentaram altos níveis de prostanóides. E o

fato do grupo tratado com kefir ter reduzido os níveis de Ang II e se assemelhar ao grupo normotenso em relação aos níveis de prostánoídes, nos confirma essa relação entre AngII/COX-2.

Em nosso estudo, com o objetivo de avaliar a participação do SRAA na hipertensão renovascular e um possível efeito do kefir sobre esse sistema, foi mensurada a atividade da ECA e dosagem de Ang I, II e 1-7 no soro e nos rins dos animais. Conforme o esperado e descrito anteriormente, foi possível verificar um aumento da atividade dessa enzima no soro de animais hipertensos em comparação com os animais normotensos e o tratamento nos animais tratados com kefir a atividade da enzima foi normalizada. Yahya e colaboradores (2017), mostraram resultados semelhantes usando ratos SHR, que apresentaram maior atividade da ECA no plasma em comparação com animais normotensos e animais hipertensos tratados com leite fermentado de camelo apresentaram diminuição da atividade da enzima. Nos rins, quando observamos a atividade da enzima no rim clipado não encontramos nenhuma diferença significativa entre os grupos, porém no rim contralateral houve aumento significativo nos animais hipertensos e, assim como no soro, o tratamento com kefir normalizou a atividade da enzima.

Nas dosagens das angiotensinas, o tratamento com kefir foi capaz de reduzir os níveis de Ang II nos rins clipado e contralateral, enquanto que a Ang I foi reduzida apenas no rim contralateral. O kefir não alterou os níveis renais de Ang 1-7 e no plasma houve até mesmo diminuição desse peptídeo, mostrando que seus mecanismos para produzir efeitos benéficos aparentemente não envolvem a participação desse peptídeo.

Em um trabalho de nosso grupo que utilizou o mesmo modelo experimental em camundongos 28 dias após a cirurgia para indução da hipertensão, os níveis intra-renais de Ang II no rim clipado encontraram-se maiores nos animais hipertensos (Dias *et. al.*, 2014). Neste trabalho utilizamos ratos e as dosagens foram feitas 60 dias após a clipagem, o que pode explicar não encontramos os mesmos resultados.

Apesar de não encontrarmos o mesmo resultado neste estudo, encontramos aumento desses níveis nos rins contralaterais.

Em outro trabalho, também de nosso grupo, que utilizou camundongos e fez as dosagens de Ang I, II e 1-7 no 14º dia após a cirurgia no plasma, houve aumento de todas as angiotensinas avaliadas no grupo hipertenso (Nogueira *et. al.*, 2012). Nós não encontramos os mesmos resultados, mas outro trabalho que assim como este utilizou ratos e fez as dosagens de Ang II plasmática no mesmo período, mostrou que os níveis de Ang II estavam iguais em ambos os grupos (Qin *et. al.*, 2009).

Com os dados das dosagens de angiotensinas, podemos perceber o kefir interfere nos níveis de Ang I e Ang II nos rins, o que provavelmente pode estar relacionado com as suas ações antihipertensiva e antioxidante observadas nos animais tratados.

Na hipertensão arterial podemos observar de forma significativa o aumento da produção de ERO's e o complexo enzimático da NADPH oxidase é uma importante fonte na produção de  $O_2^{\cdot-}$  nos processos patológicos de hipertensão e que contribui significativamente para o estresse oxidativo (Witko-sarsat *et. al.*, 1996).

O presente estudo mostra um aumento exacerbado de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  no sangue e aortas de animais com hipertensão renovascular. Logo, o aumento das ERO's provavelmente é um dos mecanismos pelos quais a hipertensão 2R1C provoca disfunção endotelial e modula outras alterações estruturais e funcionais, como hipertrofia e disfunção cardíaca (Fraga *et. al.*, 2013). Campagnaro e colaboradores (2012) mostraram que os níveis de  $\cdot O_2^-$  e  $H_2O_2$  em camundongos 2R1C estavam maiores nos animais hipertensos quando comparado aos animais normotensos.

Nós observamos que tratamento com kefir exerceu efeitos positivos diminuindo os níveis dessas ERO's. Resultados semelhantes foram encontrados por Friques e colaboradores (2015), onde o tratamento com kefir durante 60 dias reduziu os níveis de  $\cdot O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , e  $ONOO^-$  nas células endoteliais da aorta.



Como citado anteriormente acreditamos que os efeitos antioxidantes do kefir encontrados em nosso trabalho estão associados com a diminuição da atividade da ECA encontrada. Quirós e colaboradores (2005), encontraram uma potente atividade inibitória da ECA *in vitro* de kefir comercial feito a partir de leite caprino. Os peptídeos de baixa massa molecular liberados durante a fermentação foram os principais responsáveis por esta atividade. Foram identificados dezesseis peptídeos por espectrometria de massa, sendo que dois desses peptídeos, com seqüências PYVRYL e LVYPFTGPIP, apresentaram potentes propriedades inibitórias de ECA. Interessantemente, que o impacto da digestão gastrointestinal sobre a atividade inibitória da ECA de peptídeos de kefir também foi avaliado e alguns desses peptídeos foram resistentes à incubação com pepsina seguida de hidrólise com Corolase PP. A atividade inibitória da ACE após a digestão simulada foi semelhante ou ligeiramente inferior à dos peptídeos não hidrolisados, com exceção do peptídeo  $\beta$ -caseína f (47-52) (DKIHPPF), que exibiu uma atividade 8 vezes maior após a hidrólise.

Analisando os resultados encontrados nesse trabalho, podemos inferir que as propriedades antihipertensivas e a capacidade de restauração da função endotelial do kefir podem ser explicadas pela atenuação do estresse oxidativo, melhora na biodisponibilidade de NO, diminuição de prostanóides contráteis e diminuição da ativação do SRAA em animais com hipertensão renovascular.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram os efeitos benéficos do kefir na hipertensão renovascular em ratos. Demonstrando que o tratamento com Kefir foi eficaz na redução da PAM, além de diminuir a atividade da ECA.

O Kefir agiu melhorando a função endotelial dos animais hipertensos e os mecanismos envolvidos na melhora da função vascular envolvem a redução do estresse oxidativo e o aumento da biodisponibilidade do NO, além de uma maior participação das prostaciclina no relaxamento de aortas.

Houve diminuição do estresse oxidativo no soro e aorta, além da diminuição da atividade da ECA no sangue e nos rins contralaterais de animais clipados tratados com Kefir. A dosagem Ang I e Ang II também foram reduzidas no rim contralateral dos animais tratados.

Logo, nosso estudo evidencia o kefir como sendo uma importante alternativa de tratamento complementar as terapias medicamentosas da hipertensão secundária e de suas consequências. Porém, mais estudos são necessários para verificar sua eficácia em humanos.

## REFERÊNCIAS

- Adeagbo AS, Zhang X, Patel D. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens.* 2005; 23:1025-36.
- Almeida AP, Frábregas BC, Madureira MM, Santos RJS, Campagnole-Santos MJ & Santos RAS. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2000; 33: 709-713.
- Álvarez Y, Perez-giron JV, Hernanz R. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 321:381-8.
- Antoniades C, Tousoulis D, Tountas C, Tentolouris C, Toutouza M, Vasiliadou C, Tsioufis C, Toutouzas P, Stefanadis C. Vascular endothelium and inflammatory process, in patients with combined Type 2 diabetes mellitus and coronary atherosclerosis: the effects of vitamin C. *Diabet. Med.*, 2004; 21(6), 552- 558.
- Arq. Bras. Cardiol. vol.94 no.5 São Paulo, 2010.
- Balarini C, et al. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *J Transl Med. Journal of Translational Medicine.* 2013; 11, 3.
- Baldo TM, Casarini DE, Meyrelles SS, Vasquez EC. Granulocyte colony stimulating factor prevents kidney infarction and attenuates renovascular hypertension. *Cell Physiol. Biochem.* 2012; 29(1-2), 143-152.
- Barros EP. Efeitos benéficos da rusvastatina na estrutura renal de ratos espontaneamente hipertensos. Dissertação. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro biomédico, 2011.
- Batlouni M. Endotélio e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens.* 2001; 8: 328-38.
- Baumgartner I, Lerman L. O. Renovascular hypertension: screening and modern management. *European Heart Journal.* 2011; 32(13): 1590–1598.
- Bell R, Deane R, Chow N, Long X, Sagare A, Singh I, Streb J, Guo H, Rubio A, Van Nostrand W, Miano J, Zokovic B. SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nat Cell Biol.* 2009;11:143–153.
- Bendall JK, Alp NJ, Wrrick N, Cai S, Adlam D, Rockett K, Yokoyama M, Kawashima S, Channon KM. Stoichiometric relationships between endothelial

tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. *Circ. Res.* 2005; 97(9), 864-871.

Bolisetty & Jaimes. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 2013; 19;14(3):6306-44.

Borelli FAO. O Tratamento da Hipertensão Renovascular Frente aos Resultados dos Novos Estudos. *Revista da Sociedade de Cardiologia de São Paulo.* 2015;25(1):32-7.

Borges HP, et al. Associação entre hipertensão arterial e excesso de peso em adultos, Belém, Pará, 2005. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia.* 2008; v.91, n.2, p.110-18.

Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Balfagón G, Salaices M. Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology.* 2000; 131(2):185-194.

Callera GE. et. al. Changes in the vascular b-adrenoceptor-activated signalling pathway in 2Kidney-1Clip hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology.* 2004;141: 1151–1158.

Campagnaro BP, et al. Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells. *DNA Cell Biol.* 2013; v. 32, n.8, p. 458-466.

Campagnaro BP. Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre células hematopoiéticas e endoteliais de camundongos. Tese de Doutorado. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2012.

Carvalho LS, Panzoldo N, Santos SN, Modolo R, Almeida B, Quinaglia e Silva JC, Nadruz-Jr W, de Faria FC, Sposito AC. HDL levels and oxidizability during myocardial infarction are associated with reduced endothelial-mediated vasodilation and nitric oxide bioavailability. *Atherosclerosis.* 2014; 237(2), 840-846.

Carvalho MHT, et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Revista Brasileira de Hipertensão.* 2001; vol 8(1): 76-88.

Castro MM. et. al. Doxycycline ameliorates 2K1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. *Nitric Oxide.* 2012; 26(3):162-8.

Cau SBA. Pyrrolidine dithiocarbamate down-regulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodelling in renovascular hypertension. *British Journal of Pharmacology.* 2011; 164: 372–381.

Ceron CS. et. al. Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. *British Journal of Pharmacology*. 2010.

Dautzenberg M, Just A. Temporal characteristics of nitric oxide-, prostaglandin-, and EDHF-mediated components of endothelium dependent vasodilation in the kidney. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013; 305(9), R987-R998.

Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res.* 2001; 89:650–660.

Dias AT, Rodrigues BP, Porto ML, Gava AL, Balarini CM, Freitas FP, Palomino Z, Casarini DE, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. *J. Transl. Med.* 2014; 12, 35.

Dilauro M, Burns KD. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. *Scientific World Journal*. 2009; v.9, p.522-535.

Diosma G, Romanin DE, Rey-Burusco MF, Londero A, Garrote GL. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2014; 30: 43-53.

Dusse LMS; et al. Revisão sobre o Óxido Nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2003; v. 39, n. 4, p. 343-350.

Farnworth ER. Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technology bulletin: Functional Foods*. 2005; 2 (1): 1-17.

Förstermann & Sessa . Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012 Apr;33(7):829-37.

Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012; 33(7):829–837.

Fraga-Silva RA, Costa-Fraga FP, Murça TM, Moraes PL, Martins Lima A, Lautner RQ, Castro CH, Soares CM, Borges CL, Nadu AP, Oliveira ML, Shenoy V, Katovich MJ, Santos RA, Raizada MK, Ferreira AJ. Angiotensin-converting enzyme 2 activation improves endothelial function. *Hypertension*. 2013; 61(6):1233–8.

Frohlich ED, et al. The heart in hypertension. *The New England Journal Medicine*. 1992; 327:998-1007.

Furchgott, RFE, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; v.288, n.5789, Nov 27, p.373-6.

Garrote GL, Abraham AG, DE Antoni GL. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *J Food Prot.* 2000; 63(3):364-9.

Gava AL, Peotta VA, Cabral AM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Overexpression of eNOS prevents the development of renovascular hypertension in mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008; 86(7):458-64.

Ghiadoni L, Taddei S, Virdis A. Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2012; 10(1), 42-60.

Gómez-Guzmán M, Toral M, Romero M, Jiménez R, Galindo P, Sánchez M. Antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in spontaneously hypertensive rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015; 59, 2326–2336.

Gorelik G, Carbini LA, Scicli AG. Angiotensin 1-7 induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998; 286:403–410.

Guan S, Fox J, Mitchell KD, Navar LG. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension.* 1992; 20:763–767.

Guimarães DA. et. al. Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? *Revista Brasileira de Hipertensão.* 2010; 17 (4): 226-230.

Quirós A. et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Caprine Kefir. *Journal of Dairy Science.* 2005, 88 (10): 3480 – 3487.

Guyton AC, Hall JE, Lohmeier TE, Jackson TE, Kastner PR. Blood pressure regulation: basic concepts. *Federation Proceedings.* 1981; 40:2252-2256.

Halliwell B, Gutteridge JCM. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3 ed. Oxford University Press, 1999.

Hamet MF, et al. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains. *Food Microbiol.* 2013; 36(2):327–34.

Hertzler SR, Clancy SM. kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association.* 2003; v. 103, p. 582-587.

Hong W, Chen Y, Chen M. The antiallergic effect of kefir lactobacilli. *Journal of Food Science.* 2010; 75 (8): H244-H253.

HU L, CATANZARO DF, PITARRESI TM. Identical hemodynamic and hormonal responses to 14-day infusions of rennin or angiotensin II in conscious rats. *Journal of Hypertension*, v.16, p.1285-1298, 1998.

la Batide Alanore A, Perdu J, Plouin PF. Dysplasie fibromusculaire artérielle. *Presse Med* 2007;36(6 Pt 2):1016-23.

Jakala P., Pere E., Lehtinen R., Turpeinen A., Korpela R., Vapaatalo H. (2009). Cardiovascular activity of milk casein-derived tripeptides and plant sterols in spontaneously hypertensive rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 60, 11–20.

Jascolka TL, et al. Kefir Supplementation Improves Lipid Profile and Oxidative Stress but does not Reduce Atherosclerotic Lesion in apoE Deficient Mice. *Journal of Food & Nutritional Disorders*. 2013, 2:3.

Jauhiainen T, Collin M, Narva M. Effect of long-term intake of milk peptides and minerals on blood pressure and arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Milchwissenschaft*. 2005; 60: 358-362.

Kanbak G, Uzuner K, Kuşat OIK, Oğlakçı A, Kartkaya K, Şentürk H. Effect of kefir and low-dose aspirin on arterial blood pressure measurements and renal apoptosis in unihypertensive rats with 4 weeks salt diet. *Clin Exp Hypertens*. 2014;36(1):1-8.

Klippel BF, Duemke LB, Leal MA, Friques AGF., Dantas EM, Dalvi RF, Vasquez EC. Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Frontiers in Physiology*. 2016; 7, 211.

Leal, M.A.; Balarini, C.M.; Dias, A.T.; Porto, M.L.; Gava, A.L.; Pereira, T.M.; Meyrelles, S.S.; Vasquez, E.C. Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of atherosclerosis: The beneficial effects of sildenafil. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2015; 16(6), 517-530.

Leite AMO, Miguel MAL, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT. Paschoalin V. M. F. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013; 44 (2): 341-349.

Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014; 237(1): 208-219.

Li Y, Tian D, Zhu C, Ren L. Demethoxycurcumin Preserves Renovascular Function by Downregulating COX-2 Expression in Hypertension. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:9045736.

Lincevicius GS. et. al. Aldosterone Contributes to Sympathoexcitation in Renovascular Hypertension. *American Journal of Hypertension*. 2015.

- Lincoln T, Dey N, Sellak H. Signal Transduction in smooth muscle. Invited review: cGMP-dependent protein Kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal Applied Physiology*. 2001; 91:2001.
- Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J. Kefir: a symbiotic yeastsbacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micologia*. 2006; 23: 67-74.
- Luft FC. Workshop: mechanisms and cardiovascular damage in hypertension. *Hypertension*. 2001; 37: 594-598.
- Maeda H, et al. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *BioFactors*. 2004; 22(1-4):197-200.
- Maldonado MM. Pathophysiology of Renovascular Hypertension. *Hypertension*. 1991; 17(5): 707-719.
- Mansur AP; Favarato, D. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo. *Arq Bras Cardiol*. São Paulo, 2012.
- Marc Dilauro and Kevin D. Burns. Angiotensin-(1-7) and Its Effects in the Kidney. *The Scientific World Journal*. 2009; vol. 9, pp. 522-535.
- Mardini IA, FitzGerald GA. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a growing class of anti-inflammatory drugs. *Mol Interv*. 2001; 1:30–8.
- Matlung HL, Bakker, EN, Vanbavel, E. Shear stress, reactive oxygen species, and arterial structure and function. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009; v. 11, n. 7, p. 1699-1709.
- Meneghini R. A alta toxicidade do oxigênio. *Ciência Hoje*, vol. 5, número 28, 1987.
- Meyrelles SS, et al . Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in Health and Disease*. 2011 Nov 14;10:211.
- Moncada S, Palmer RM. Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Semin. Perinatol, Beckenham*.1991; v.15, n.1, p.16-19.
- Mukai T, et al. Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Lactobacillus kefiranofaciens* K1. *Carbohydr Res*, 1990.
- Najafipour H, et. al. Investigation of changes in apelin receptor mRNA and protein expression in the myocardium and aorta of rats with two-kidney, one-clip (2K1C) Goldblatt hypertension. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2015; 71(2):165-75.



- Navar LG, Nishiyama A. Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004; 13(1):107-15.
- Nielsen B, Gürakan G C, Ünlü G. Kefir: A multifaceted fermented dairy product. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. 2014; 6: 123-135.
- Nobre F. et. al. Hipertensão arterial sistêmica primária. *Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP*. 2013; 46(3):256-72.
- Nogueira BV, Palomino Z, Porto ML, et al. Granulocyte colony stimulating factor prevents kidney infarction and attenuates renovascular hypertension. *Cell Physiol Biochem* 2012; 29:143-152.
- O'brien KV.; et al. The effects of postexercise consumption of a kefir beverage on performance and recovery during intensive endurance training. *J Dairy Sci*. 2015; 98(11):7446-9.
- Oliveira-sales EB, et. al. Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. 2009; 22(5):484-92.
- Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2006 Jul 15;71(2):247-58.
- Phillips MI, Schmidt-Ott KM. The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News Physiol Sci* 1999;14: 271-4
- Praxedes JN. Hipertensão renovascular: epidemiologia e diagnóstico. *Rev Bras Hipertens*. 2002; 9: 148-153
- Punaro GR. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. *Nitric Oxide*. 2014; 37:53-60.
- Qin XP, Zeng SY, Tian HH, Deng SX, Ren JF, Zheng YB, Li D, Li YJ, Liao DF, Chen SY. Involvement of prolylcarboxypeptidase in the effect of rutaecarpine on the regression of mesenteric artery hypertrophy in renovascular hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2009; 36: 319–324.
- Raja SG, Nayak SH. Sildenafil: emerging cardiovascular indications. *Ann Thorac Surg*. 2004; 78: 1496–1506
- Roscioni SS, Heerspink HJL, De Zeeuw, D. The effect of RAAS blockade on the progression of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. Nature Publishing Group; Dec, 2013.
- Rossi M, et al. Cutaneous vasodilation to acetylcholine in patients with essential hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1997; v. 29, n. 3, p. 406-411.

Ruiz-ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension*. 2001; 38: 1382-1387.

Sadoshima JI, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT1 receptor subtype. *Circulation Research*. 1993; 73:413-423.

Salvemini D, Kim SF, Mollace V. Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2013; 304(7), R473-487.

Santos AS dos; et. al. Efeitos Cardiovasculares e Renais do sistema renina-angiotensina. *Rev Bras Hipertens*. 2000; 3: 227-36.

Santuzzi CH, et. al. Combined aliskiren and L-arginine treatment has antihypertensive effects and prevents vascular endothelial dysfunction in a model of renovascular hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2015; 48(1): 65-76.

Silva BR, Pernomian L, Grando MD, Bendhack LM. Phenylephrine activates eNOS Ser 1177 phosphorylation and nitric oxide signaling in renal hypertensive rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 2014; 738:192-9.

SILVERTHORN DU. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. Cap.19, p.581-583.

Sirker A., Zhang M., Shah A. M. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Research in Cardiology*. 2011;106(5):735–747.

Stocker & Keaney. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004 Oct;84(4):1381-478.

Sun J, Lawrence J, Druhan J, Zweier L. Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010; 494: 130137.

Touyz RM, Schiffrin EL. 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000 Dec;52(4):639-72.

Turpeinen AM, Ehlers PI, Kivimäki AS, Järvenpää S, Filler I, Wiegert E, et al. Ile-Pro-Pro and ValPro-Pro tripeptide-containing milk product has acute blood pressure lowering effects in mildly hypertensive subjects. *Clin. Exp. Hypertens*. 2011.

Unger T. The role of the renin–angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* Jan 2002; 89, 3A–9A.

Vanhoutte PM. Endothelial Dysfunction - The First Step Toward Coronary Arteriosclerosis. *Circulation Journal.* 2009; 73(4):595–601.

Vasquez EC, et. al. Novel Therapeutic Targets for Phosphodiesterase 5 Inhibitors: Current State-of-the-art on Systemic Arterial Hypertension and Atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2016.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 2010; 95 (1 supl.1): 1-51.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, vol. 107, n. 3, supl 3. São Paulo, 2016.

WHO, Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 1-4 Outubro, 2001.

WHO. A Global Brief on Hypertension. Geneva, World Health Organization, 2015.

Witko-sarsat V, Nguyen-khoa T, Jungers P, Drüeke TB, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress en uremia. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1999; 14[suppl 1]: 76-78.

Wolf G. Angiotensin II is involved in the progression of renal disease: importance of non-hemodynamic mechanisms. *Nephrologie*, 1998; 19: 451-456.

Wong W. T., Tian X. Y., Chen Y., et al. Bone morphogenic protein-4 impairs endothelial function through oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2 upregulation: implications on hypertension. *Circulation Research.* 2010;107(8):984–991.

Wong S. L., Lau C. W., Wong W. T., et al. Pivotal role of protein kinase C $\delta$  in angiotensin II-induced endothelial cyclooxygenase-2 expression: a link to vascular inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2011;31(5):1169–1176.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.

Wszolek M, Kupiec-Teahan B, Guldager HS, Tamine AY. Production of kefir, koumiss and other related products. *Ucrânia: Blackwell Science Ltd.*, 2006; Cap. 8, p. 174-2016.

Wu XQ, Kong X, Zhou Y, Huang K, Yang JR, LI XL. Sesamin exerts renoprotective effects by enhancing NO bioactivity in renovascular hypertensive rats fed with high-fat-sucrose diet. *Eur J Pharmacol.* 2012; 683(1-3):231-7.

Xue H. et. al. Hydrogen Sulfide Improves the Endothelial Dysfunction in Renovascular Hypertensive Rats. *Physiological Reserch.* 2015.

Yahya MA, Alhaj AO, Al-khalifah AS. Antihypertensive effect of fermented skim camel (*Camelus dromedarius*) milk on spontaneously hypertensive rats. *Nutr Hosp.* 2017; 34(2):416-421.

Yener AU, Sehitoglu MH, Ozkan MTA, Bekler A, Ekin A, Cokkalender O, Deniz M, Sacar M, Karaca T, Ozcan S, Kurt T. Effects of kefir on ischemia-reperfusion injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015, 19 (5): 887-896.

Yu et al. Effects of traditional Chinese medicine Xin-Ji-Er-Kang formula on 2K1C hypertensive rats: role of oxidative stress and endothelial dysfunction .*BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2013; 13:173.

Zimmerman D, Burns KD. Angiotensin-(1-7) in kidney disease: a review of the controversies. *Clinical Science* Sep 2012; 123(6)333-346.