

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM PEPTÍDEO  
INIBIDOR DA ECA DERIVADO DO KEFIR NA HIPERTENSÃO  
DEPENDENTE DE ANGIOTENSINA EM CAMUNDONGOS**

**Rafaela Aires**

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas**

**Doutorado em Ciências Fisiológicas**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Agosto de 2021

**CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE UM PEPTÍDEO  
INIBIDOR DA ECA DERIVADO DO KEFIR NA HIPERTENSÃO  
DEPENDENTE DE ANGIOTENSINA EM CAMUNDONGOS**

Rafaela Aires

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Fisiológicas.

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Silvana dos Santos Meyrelles – Orientadora, UFES

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro – Co-Orientadora, UVV

---

Prof. Dr. Leonardo dos Santos – Membro interno, UFES

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Sônia Alves Gouvêa – Membro interno, UFES

---

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo – Membro externo, UNIMONTES

---

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira – Membro externo, UFES

---

Coordenadora do PPGCF Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sônia Alves Gouvêa

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Agosto de 2021

Aires, Rafaela 1990

Caracterização biológica de um peptídeo inibidor da ECA derivado do Kefir na hipertensão dependente de angiotensina em camundongos [Vitória] 2021

112p., (UFES, D. Sc., Ciências Fisiológicas, 2021)

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Silvana dos Santos Meyrelles

Co-Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro

Tese de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

“Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito”.

(Romanos 8:28)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda ciência e sabedoria, devo minha maior gratidão. Ele me capacitou e concedeu a paz e a direção em momentos de incertezas e de dificuldades. Deus é o dono desta conquista!

À minha família, agradeço ao apoio e a confiança deposita em mim. Especialmente minha mãe, sou grata por sempre me encorajar a confiar em mim e acima de tudo a acreditar nas promessas de Deus sobre a minha vida.

À minha orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup>. Silvana dos Santos Meyrelles, pela confiança depositada em mim desde o primeiro contato. Obrigada pela orientação, pelo convívio e por me preparar para ser uma futura pesquisadora e professora. Sempre serei grata pelo conhecimento e habilidades adquiridas durante minha passagem no laboratório.

À minha co-orientadora, Prof. Dr<sup>a</sup>. Bianca Prandi Campagnaro, agradeço pelo conhecimento compartilhado e pela disponibilidade em esclarecer minhas dúvidas. Seu apoio e ajuda foram essenciais para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Obrigada pela amizade!

À Dr<sup>a</sup>. Fernanda Amorim, sou grata pela parceira neste trabalho, pela orientação e por todo incentivo. A execução do projeto foi mais leve e divertida com você. Agradeço por todo apoio e amizade construída.

Aos membros do Laboratório de Fisiologia Translacional-UFES, especialmente aos alunos: Duda, Edgar, Thamires, Marcos, Eduardo, Ananda, Marcela e Andreia, obrigada pelo amigoso convívio e pelo conhecimento compartilhado.

Ao Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Translacional-UVV agradeço o acolhimento, pelas parcerias estabelecidas e por se tornar minha segunda casa. Especialmente, às alunas Glaucimeire e Larissa, obrigada pela amizade, que não se limita ao laboratório, mas que já faz parte da minha vida.

Aos professores Dr. Thiago Pereira e Dr. Elisardo Vasquez, obrigada pelo conhecimento compartilhado que contribuiu para a conclusão do trabalho e para o meu crescimento intelectual e pessoal.

À coordenadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sônia Alves Govêa e aos professores da Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, obrigada pela contribuição à minha formação acadêmica e pelo ensino ministrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida. “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

À FAPES e CNPq pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1. Hipertensão arterial .....	21
1.1.1. Características gerais e epidemiológicas .....	21
1.1.2. Fisiopatologia da hipertensão: sistema renina angiotensina (SRA) .....	24
1.1.3 Efeitos vasculares do SRA na hipertensão.....	27
1.2 Probióticos no tratamento da hipertensão arterial .....	31
1.3 Kefir .....	33
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	41
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	42
3.1 Objetivo geral .....	42
3.2 Objetivos específicos .....	42
<b>4. MÉTODOS</b> .....	43
4.1 Capacidade de inibição de Kef-1 sobre a ECA (in vitro) .....	43
4.2 Animais experimentais.....	43
4.3 Modelo de hipertensão 2-rins, 1-clip (2R1C) .....	44
4.4 Grupos experimentais e tratamento.....	44
4.5 Avaliação hemodinâmica: mensuração não-invasiva da PA por pletismografia de cauda .....	45
4.6 Eutanásia e coleta de sangue .....	47
4.7 Isolamento das células vasculares .....	47
4.8 Análise dos níveis intracelulares de ROS.....	48
4.9 Análise sistêmica da fragmentação de DNA: ensaio do cometa alcalino	49
4.10 Avaliação sistêmica da peroxidação lipídica plasmática.....	50
4.11 Análise da viabilidade e apoptose de células musculares lisas.....	51
4.12 Avaliação das vias oxidantes nas células musculares lisas .....	51
4.13 Análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM) nas células musculares lisas.....	52
4.14 Avaliação sistêmica dos níveis de citocinas inflamatórias.....	52

4.15	Avaliação plasmática da atividade da mieloperoxidase (MPO) .....	53
4.16	Quantificação de NO nas células musculares lisas .....	53
4.17	Avaliação morfométrica e quantificação de colágeno no arco aórtico ....	53
4.18	Avaliação ultraestrutural do endotélio aórtico .....	54
4.19	Análise estatística.....	55
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
5.1	Kef-1 exibe capacidade de inibição sobre a ECA <i>in vitro</i> .....	56
5.2	Kef-1 reduz PA e FC em camundongos hipertensos 2R1C.....	56
5.3	kef-1 reduz o estresse oxidativo sistêmico em camundongos hipertensos 2R1C .....	59
5.4	Efeitos de Kef-1 sobre a viabilidade de células musculares lisas .....	61
5.5	Kef-1 reduz o estresse oxidativo em células musculares lisas em camundongos hipertensos 2R1C .....	63
5.6	Kef-1 suprime a participação das vias oxidantes nas células musculares lisas de camundongos hipertensos 2R1C .....	64
5.7	Efeitos de Kef-1 sobre o PMM nas células musculares lisas de camundongos hipertensos 2R1C .....	66
5.8	Kef-1 reduz inflamação sistêmica em camundongos hipertensos 2R1C	67
5.9	Kef-1 reduz a atividade sistêmica de mieloperoxidase em células musculares lisas de camundongos hipertensos 2R1C.....	68

5.10 Kef-1 reduz os níveis de NO em células musculares lisas de camundongos hipertensos 2R1C .....	69
5.11 Kef-1 atenua espessamento aórtico em camundongos hipertensos 2R1C .....	70
5.12 Kef-1 reduz o dano estrutural no endotélio aórtico em camundongos hipertensos 2R1C.....	72
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Efeitos cardiovasculares da angiotensina II/AT1.....	26
<b>Tabela 2:</b> Estudos que demonstraram o efeito anti-hipertensivo do Kefir em modelos experimentais de hipertensão.....	38
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros hemodinâmicos nos grupos experimentais.....	58
<b>Tabela 4:</b> Níveis sistêmicos de citocinas inflamatórias no modelo experimental de hipertensão 2R1C.....	68

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Número total de óbitos por doenças cardiovasculares no Brasil e Espírito Santo no período entre 2000 e 2018 .....	22
<b>Figura 2:</b> Teoria do mosaico de Page .....	23
<b>Figura 3:</b> Componentes do sistema renina angiotensina e participação na regulação da pressão arterial (PA) .....	25
<b>Figura 4:</b> Ativação da via Ang II/AT1/NADPH oxidase e efeitos do aumento de ROS nas células musculares lisas vasculares .....	29
<b>Figura 5:</b> Curso temporal do número de publicações relacionadas aos termos “ <i>gut microbiota</i> ” e “ <i>microbiota and hypertension</i> ”, nas últimas duas décadas ...	32
<b>Figura 6:</b> Curso temporal do número de publicações relacionadas ao termo “ <i>probiotics</i> ”, nas últimas duas décadas. Crescimento no número de publicações sobre “ <i>kefir</i> ” nos períodos 2000-2010 e 2011-2021 .....	33
<b>Figura 7:</b> Etapas da preparação do leite fermentado do Kefir .....	35
<b>Figura 8:</b> Constituintes da bebida fermentada do Kefir .....	37
<b>Figura 9:</b> Delineamento experimental e métodos realizados no presente estudo .....	45
<b>Figura 10:</b> Sistema de mensuração não-invasiva da pressão arterial por pletismografia de cauda .....	46
<b>Figura 11:</b> Etapas do protocolo de cometa alcalino .....	49
<b>Figura 12:</b> Kef-1 é capaz de inibir em 59,6% a atividade <i>in vitro</i> da ECA em comparação ao captopril .....	56
<b>Figura 13:</b> As mensurações hemodinâmicas evidenciam que o tratamento agudo (3 horas) com Kef-1 reduz a pressão arterial e a frequência cardíaca no modelo experimental de hipertensão 2R1C .....	57

<b>Figura 14:</b> As mensurações hemodinâmicas evidenciam que o tratamento crônico (7 dias) com Kef-1 reduz a pressão arterial e a frequência cardíaca no modelo experimental de hipertensão 2R1C .....	55
<b>Figura 15:</b> Kef-1 reduz a produção sistêmica de ROS no modelo experimental de hipertensão 2R1C .....	59
<b>Figura 16:</b> Kef-1 reduz fragmentação de DNA em células sanguíneas no modelo experimental de hipertensão 2R1C .....	60
<b>Figura 17:</b> Kef-1 reduz peroxidação lipídica sistêmica no modelo experimental de hipertensão 2R1C .....	61
<b>Figura 18:</b> A expressão de $\alpha$ -SMA foi avaliada por citometria de fluxo para confirmar a presença de CML .....	62
<b>Figura 19:</b> Kef-1 reduz apoptose de células musculares lisas no modelo experimental de hipertensão 2R1C .....	63
<b>Figura 20:</b> Kef-1 reduz a produção de ROS nas células musculares lisas no modelo experimental de hipertensão 2R1C .....	64
<b>Figura 21:</b> No modelo experimental de hipertensão 2R1C, a produção de ROS é reduzida nas células musculares lisas após tratamento com Kef-1 pela redução da participação de NADPHox e mitocôndria .....	65
<b>Figura 22:</b> Efeito do tratamento com Kef-1 sobre o potencial de membrana mitocondrial nas CML no modelo experimental de hipertensão 2R1C .....	67
<b>Figura 23:</b> Kef-1 reduz atividade sistêmica da mieloperoxidase no modelo experimental de hipertensão 2R1C .....	69
<b>Figura 24:</b> No modelo experimental de hipertensão 2R1C, Kef-1 reduz o aumento dos níveis sistêmicos de NO .....	70
<b>Figura 25:</b> Kef-1 atenua o espessamento da camada média de arcos aórticos no modelo experimental de hipertensão 2R1C .....	71
<b>Figura 26:</b> Efeito de Kef-1 sobre a quantidade de colágeno aórtico no modelo de hipertensão 2R1C .....	72

**Figura 27:** Microscopia eletrônica de varredura da estrutura endotelial da aorta exibindo desorganização celular na hipertensão 2R1C e restauração parcial do dano estrutural após o tratamento com Kef-1..... 73

**Figura 28:** Resumo das ações biológicas sistêmicas e locais do peptídeo Kef-1 no modelo experimental de hipertensão dependente de angiotensina ..... 86

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

2R1C: 2-rins, 1-clip

7-AAD: 7-Aminoactinomicina D

$\alpha$ -SMA: alfa actina de músculo liso

A: alanina

Ang II: angiotensina

CML: células musculares lisas

Ca<sup>2+</sup>: cálcio

DAG: diacilglicerol

DCFDA: diclorofluoresceína

DCV: doenças cardiovasculares

DHE: di-hidroetidina

ECA: enzima conversora de angiotensina

F: fenilalanina

FC: frequência cardíaca

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

IFN- $\gamma$ : interferon gama

IL: interleucina

i.p.: intraperitoneal

IP3: trifosfato de inositol

K: lisina

M: metionina

MAPK: proteínas quinases ativadas por mitógeno

MDA: malondialdeído

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1

MEV: microscopia eletrônica de varredura

NADPHox: NADPH oxidase

NFκB: fator nuclear kappa B

NO: óxido nítrico

$\cdot\text{O}_2^-$ : ânion superóxido

OMS: Organização Mundial da Saúde

P: prolina

PA: pressão arterial

PAD: pressão arterial diastólica

PAM: pressão arterial média

PAS: pressão arterial sistólica

PKC: proteína quinase C

PLC: fosfolipase C

PTK: de proteínas tirosina quinases

PMM: potencial de membrana mitocondrial

R: arginina

RFU: unidades relativas de fluorescência

ROS: espécies reativas de oxigênio

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

SOD: superóxido dismutase

SRA: sistema renina angiotensina

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral

V: valina

VCAM-1: proteína-1 de adesão de células vasculares

W: Triptofano

Y: Tirosina

## RESUMO

Os benefícios do consumo do Kefir são decorrentes, em parte, da rica composição de moléculas bioativas liberadas na fermentação. No entanto, os componentes bioativos e os mecanismos de ação envolvidos no efeito anti-hipertensivo desse probiótico ainda precisam ser explorados. Um estudo prévio sequenciou 35 peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) no Kefir. No presente estudo, as ações *in vivo* de um peptídeo inibidor da ECA derivado do Kefir, o Kef-1, foram investigadas em um modelo experimental de hipertensão dependente de angiotensina. Primeiramente, a atividade inibitória de Kef-1 sobre a ECA foi avaliada *in vitro*. Nos camundongos com hipertensão 2-rins, 1-clip (2R1C), os efeitos hemodinâmicos a curto (3 horas) e longo prazo (7 dias) foram avaliados após administração oral de Kef-1 (10 mg/Kg/dia). Além disso, após 7 dias de tratamento, estresse oxidativo e inflamação sistêmica e local (células musculares lisas vasculares, CML) foram analisados nesses animais. As diferenças foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ . Kef-1 foi capaz de inibir em 59,6% a atividade da ECA *in vitro* em comparação ao captopril. Nos camundongos 2R1C, Kef-1 mostrou potente efeito anti-hipertensivo agudo e crônico. Após 3 horas, Kef-1 reduziu ( $p < 0,05$ ) pressão arterial sistólica (PAS), PA diastólica (PAD) e PA média (PAM) quando comparado aos demais grupos ( $-25,8 \pm 3,9$ ,  $-26,0 \pm 3,8$ ,  $-26,4 \pm 4,3$  mmHg, respectivamente). A PAS, PAD e PAM também foram reduzidas ( $p < 0,05$ ) após 7 dias de tratamento com Kef-1 ( $-22,2 \pm 3,9$ ;  $-31,6 \pm 2,6$ ;  $-24,3 \pm 3,2$  mmHg, respectivamente). Kef-1 reduziu ( $p < 0,05$ ) a frequência cardíaca (FC) em ambos tratamentos agudo (~13%) e crônico (~7%). Sete dias após tratamento, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxidação lipídica e danos ao DNA foram menores nas células sanguíneas ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos camundongos 2R1C controle (~10%, ~23%, ~54%, respectivamente). Nas CML, Kef-1 foi capaz de reduzir ( $p < 0,05$ ) a produção de ROS (~22%) através da redução da participação das vias oxidantes (NADPH oxidase e mitocôndria). Além disso, Kef-1 reduziu apoptose de CML (59%,  $p < 0,05$ ). O efeito anti-inflamatório de Kef-1 foi evidenciado na redução ( $p < 0,05$ ) dos níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$ : ~34%, IFN $\gamma$ : ~22%, MCP1: ~33%, IL-6:

~16%), e da atividade da mieloperoxidase (~57%). Nas CML, Kef-1 reduziu em 75% os níveis intracelulares de óxido nítrico (NO). A aorta de camundongos hipertensos tratados com Kef-1 apresentou menor espessura de parede (~28%,  $p < 0,05$ ) e restauração parcial da estrutura endotelial. Em conclusão, este estudo revelou o potencial anti-hipertensivo do heptapeptídeo Kef-1 através de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias em um modelo experimental de hipertensão dependente de Ang II. Essas novas descobertas ajudam a esclarecer os mecanismos envolvidos nos benefícios do consumo da bebida do Kefir na hipertensão.

**Palavras-chave:** hipertensão; peptídeos bioativos; probióticos; estresse oxidativo; inibidores da ECA

## ABSTRACT

The benefits of Kefir consumption are due, in part, to the rich composition of bioactive molecules released from fermentation. However, the bioactive components and mechanisms of action involved in the antihypertensive effect of this probiotic still need to be explored. A previous study sequenced 35 angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides in Kefir. Here, the *in vivo* actions of the Kef-1 peptide, an ACE inhibitor derived from Kefir, was evaluated in an angiotensin II-dependent hypertension model. Firstly, Kef-1 inhibitory activity on ACE was evaluated *in vitro*. In mice with 2-kidney, 1-clip (2K1C) hypertension, the short (3 days) and long-term (7 days) hemodynamic effects were evaluated after oral administration of Kef-1. For *in vivo* protocols, C57Bl/6 male mice were submitted to clipping of the left renal artery to produce 2K1C hypertension. The short (3 days) and long-term (7 days) hemodynamic effects were evaluated after oral administration of Kef-1. Furthermore, after 7 days of treatment, systemic and local (vascular smooth muscle cells, SMC) oxidative stress and inflammation were analyzed. Kef-1 was able to inhibit at 59.6% the *in vitro* activity ACE in comparison to captopril. After 3 hours, Kef-1 reduced ( $p < 0.05$ ) systolic BP (SBP), diastolic BP (DBP) and media BP (MBP) when compared with vehicle treatments ( $-25.8 \pm 3.9$ ,  $-26.0 \pm 3.8$ ,  $-26.4 \pm 4.3$  mmHg, respectively). SBP, DBP and MBP also were reduced ( $p < 0.05$ ) after 7 days of Kef-1 treatment ( $-22.2 \pm 3.9$ ;  $-31.6 \pm 2.6$ ; MBP:  $-24.3 \pm 3.2$  mmHg, respectively). Kef-1 reduced ( $p < 0.05$ ) HR in both short ( $\sim 13\%$ ) and long-treatment ( $\sim 7\%$ ). At 7 days following Kef-1, ROS production, lipidic peroxidation and DNA damage was lower in blood cells ( $p < 0.05$ ) when compared to the 2K1C group ( $\sim 10\%$ ,  $\sim 23\%$ ,  $\sim 54\%$ , respectively). In SMC, Kef-1 was able to reduce ( $p < 0.05$ ) ROS production ( $\sim 22\%$ ) and cellular apoptosis ( $\sim 58\%$ ) in comparison to the 2K1C group. Kef-1 contributed to attenuate NADPHox and mitochondrial participation in SMC. Furthermore, Kef-1 reduced SMC apoptosis (59%,  $p < 0.05$ ). The anti-inflammatory effect of Kef-1 was evidenced in the reduction ( $p < 0.05$ ) of the systemic levels of pro-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ :  $\sim 34\%$ , IFN $\gamma$ :  $\sim 22\%$ , MCP1:  $\sim 33\%$ , IL-6:  $\sim 16\%$ ) and the activity of myeloperoxidase ( $\sim 57\%$ ). In SMC, Kef-1 reduced by 75% ( $p < 0.05$ ) the intracellular levels of NO. The aorta of hypertensive

mice treated with Kef-1 showed lower thickness of wall (~28%,  $p < 0.05$ ) and partial restoration of endothelial structure. In conclusion, this study revealed the anti-hypertensive potential of the Kef-1 heptapeptide through its antioxidant and anti-inflammatory properties in an experimental model of Ang II-dependent hypertension. These new findings help to clarify the mechanisms involved in the benefits of Kefir beverage in the hypertension.

**Keywords:** hypertension; bioactive peptide; probiotic; oxidative stress; ACE inhibitor

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Hipertensão arterial**

#### **1.1.1. Características gerais e epidemiológicas**

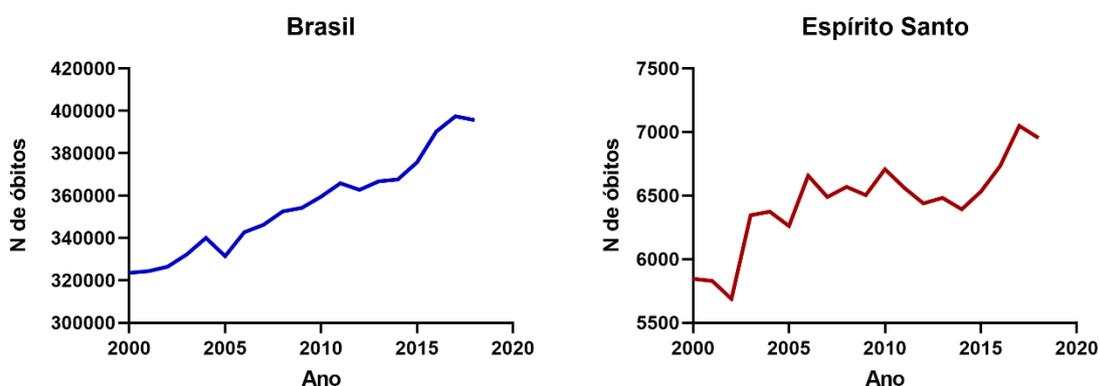
A hipertensão arterial, definida como pressão arterial sistólica (PAS)  $\geq 140$  mmHg e/ou diastólica (PAD)  $\geq 90$  mmHg, é o principal fator de risco modificável para doenças cardiovasculares (DCV), como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico, que compreendem a maior causa de mortalidade e incapacidade funcional no mundo (Oparil et al., 2019; Mills et al., 2020; Roth et al., 2020). Diante disso, apesar dos avanços em medidas preventivas e terapêuticas (por ex.: medicamentosas), atualmente a hipertensão é considerada um problema global de saúde pública, gerando importantes impactos socioeconômicos e elevados gastos públicos referentes às internações, tratamentos, aposentadorias por invalidez, entre outros (Wierzejska et al., 2020; Curado et al., 2021).

Globalmente, a prevalência da hipertensão vem aumentando exponencialmente em consequência do envelhecimento da população e ao aumento da exposição a fatores de risco associados aos hábitos de vida (Mills et al., 2020). Entre os anos de 1990 e 2015, o número de indivíduos com PA elevada aumentou consideravelmente em aproximadamente 40% (Oparil et al., 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2015, 1,3 bilhões de adultos eram hipertensos, comparado a 594 milhões em 1975. Aproximadamente, 1 em cada 4 adultos apresenta PAS  $\geq 140$  mmHg (OMS, 2021). No entanto, essas mudanças na prevalência não são uniformes em todo o mundo. Nas últimas duas décadas, os países de alta renda apresentaram uma sutil redução na prevalência da hipertensão, enquanto os países de baixa e média renda mostraram aumentos significativos em razão da maior exposição aos fatores de risco para a hipertensão (Burnier e Egan, 2019).

Particularmente no Brasil, a prevalência da hipertensão chega a aproximadamente 30% (Malta et al., 2018; Curado et al., 2021), podendo-se inferir seu impacto ao aumento do número de óbitos por DCV, como observado no período

entre 2000-2018 (Fig. 1A). Em 2018, contabilizou-se 395.699 mortes por DCV em comparação a 323.593 em 2000, um crescimento de 22%. Especificamente, no Estado do Espírito Santo é observado semelhante perfil de crescimento de mortes por DCV, apresentando um aumento de 19% entre aos anos 2000 e 2018 (Fig. 1B).

### Óbitos por doenças cardiovasculares

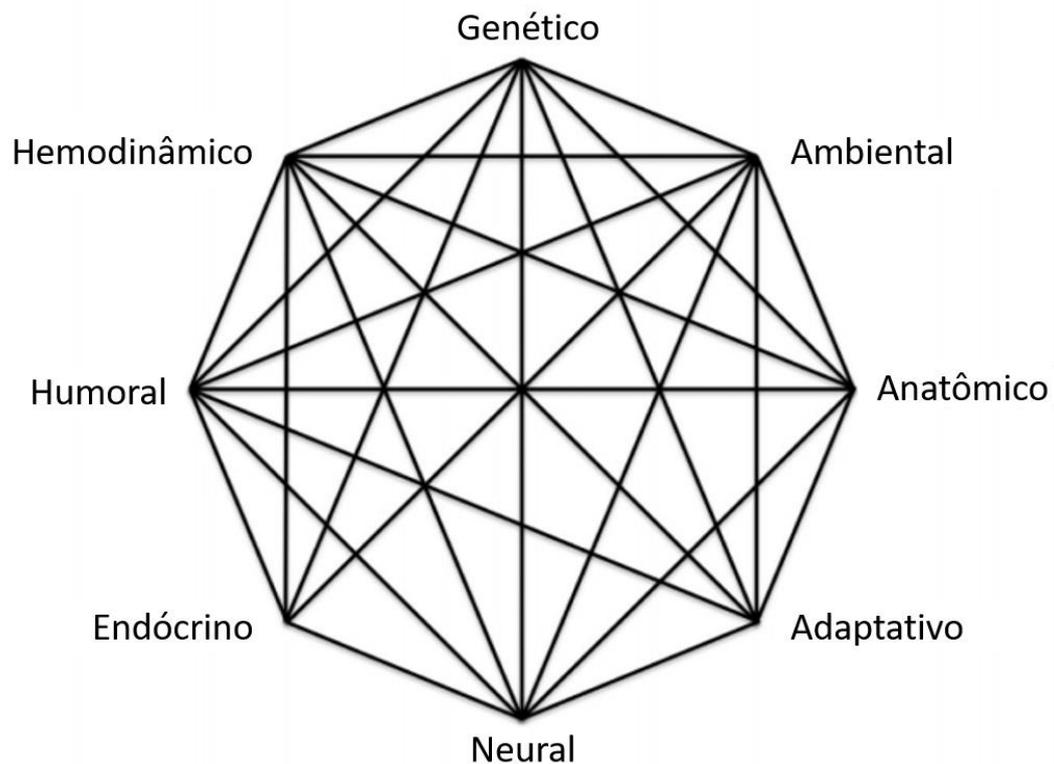


**Figura 1: Número total de óbitos por doenças cardiovasculares no Brasil e Espírito Santo no período entre 2000 e 2018.** Fonte: Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), Ministério da Saúde (<http://www.cardiometro.com.br>).

Quanto à etiologia, a hipertensão apresenta duas principais classificações: hipertensão essencial, ou primária, e hipertensão secundária. A hipertensão primária é caracterizada pela elevação crônica da PA sistêmica devido a etiologia desconhecida, enquanto que a hipertensão secundária apresenta uma causa identificável, representando 5-10% da população hipertensa (Beevers et al., 2001; Jordan et al., 2018). As multifatoriais causas da hipertensão primária incluem predisposição genética (hereditariedade) e estilo de vida, como os hábitos alimentares não saudáveis (alta ingestão de sódio e baixa ingestão de potássio), sedentarismo, obesidade, tabagismo e alto consumo de álcool (Carretero e Oparil, 2000; Chen, 2012). Já na hipertensão secundária, apneia obstrutiva do sono e estenose da artéria renal compreendem as principais causas (Rimoldi et al., 2013). A hipertensão é considerada uma doença “silenciosa”, ou seja, o indivíduo por

muitas vezes apresenta-se assintomático, principalmente na hipertensão idiopática, e assim, o diagnóstico e início da intervenção terapêutica anti-hipertensiva são postergados (Bennett, 2017; Singh et al., 2017).

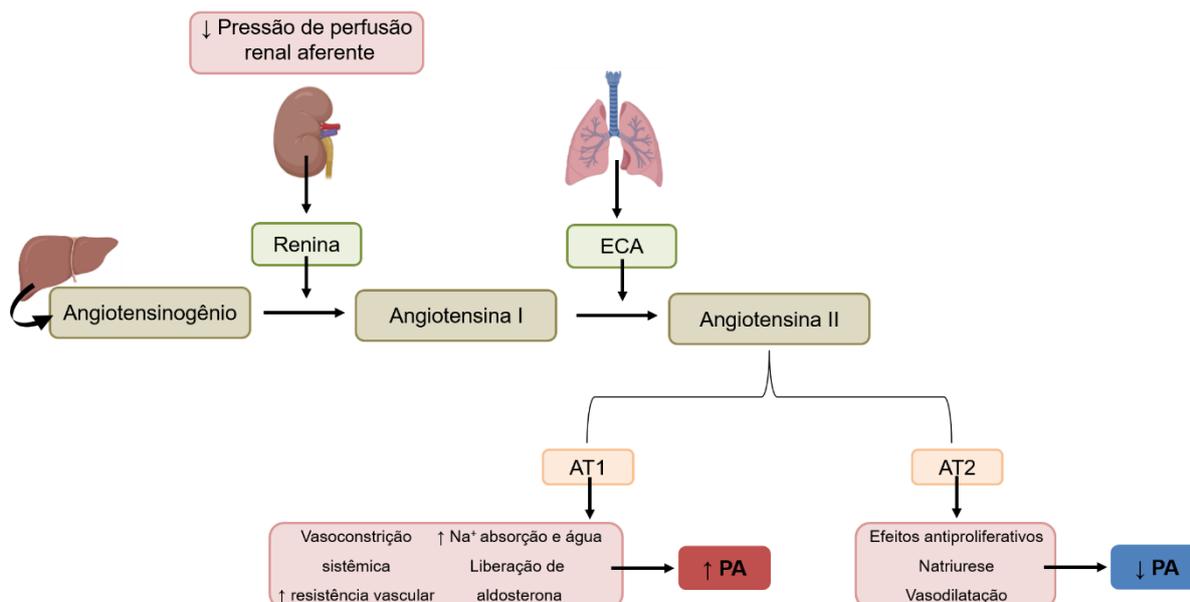
A desregulação de diversos fatores implica no desenvolvimento, manutenção e progressão da hipertensão. Neste caso se incluem os fatores ambientais e genéticos, os sistemas neurais (sistema nervoso autônomo), endócrino (sistema renina angiotensina, SRA) e imunológico, além de alterações anatômicas e hemodinâmicas (Harrison, 2013; Jordan et al., 2018; Oparil et al., 2019), fundamentados pela Teoria do mosaico de Page (Fig. 2), em 1949 (Page, 1949; Harrison, 2013). Em relação ao SRA, a hipertensão caracteriza-se por aumento da atividade de Ang II, o principal componente efetor desse sistema, que implica em diversas alterações hemodinâmicas e não-hemodinâmicas em decorrência de suas ações endócrinas, parácrinas e autócrinas (Beevers et al., 2001; Kawai et al., 2017).



**Figura 2: Teoria do mosaico de Page.** Componentes causais envolvidos no desenvolvimento da hipertensão, fundamentados na Teoria do Mosaico de Page. (Adaptado de Harrison, 2013).

### 1.1.2. Fisiopatologia da hipertensão: o sistema renina angiotensina (SRA)

O SRA desempenha papel fundamental na manutenção da PA em níveis fisiológicos através da regulação da resistência vascular periférica e do balanço fluídico e eletrolítico. No entanto, em condições fisiopatológicas crônicas, como a hipertensão, os efeitos do SRA mediados pela Ang II se intensificam desencadeando inflamação e remodelamento estrutural e assim, promovendo danos cardíacos e vasculares (Mehta e Griendling, 2007; Oparil et al., 2019; Paul et al., 2020). A Figura 3 apresenta os componentes do SRA envolvidos na formação de Ang II e regulação da PA.



**Figura 3: Componentes do sistema renina angiotensina e participação na regulação da pressão arterial (PA).** ECA: enzima conversora de angiotensina; AT1: receptor tipo AT1; AT2: receptor tipo AT2. Figura de autoria própria.

A redução da pressão de perfusão renal é um dos fatores estimuladores da liberação da enzima renina. A queda significativa da PA estimula as células granulares do aparelho justaglomerular a secretarem renina, a qual atua a nível sistêmico na fragmentação do pro-hormônio angiotensinogênio (liberado pelo fígado). A clivagem desse glicopeptídeo na sua porção N-terminal forma o decapeptídeo angiotensina I (Ang I) que apresenta ínfima atividade biológica. Subsequentemente, células endoteliais, predominantemente presentes nos pulmões, sintetizam a ECA que cliva o dipeptídeo no C-terminal da Ang I resultando na liberação do octapeptídeo Ang II, detentor de potente ação vasoconstritora (Mehta e Griendling, 2007; Paul et al., 2020; Ocaranza et al., 2020; Su et al., 2021). A ECA também atua na catalisação e inativação do vasodilatador bradicinina através da clivagem dipeptídica no C-terminal. Essa enzima está presente em células endoteliais vasculares, predominantemente nos pulmões, além de células epiteliais de túbulos proximais renais, no trato gastrointestinal, tecido cardíaco e regiões cerebrais (Mehta e Griendling, 2007; Paul et al., 2020; Ocaranza et al., 2020; Su et al., 2021). Desse modo, a ECA é um importante modulador da PA e por sua vez é

um dos principais alvos para manejo e controle terapêutico na hipertensão (Oh et al., 2016; Jordan et al., 2018).

Ang II é formada na circulação (plasma) e tecidos, principalmente na parede arterial. Suas ações são mediadas pela ligação a dois principais receptores acoplados à proteína G, tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2), que apresentam respostas antagônicas. Enquanto o estímulo do receptor AT1 desencadeia respostas vasoativas levando ao aumento da PA, a ativação do receptor AT2 resulta em efeitos anti-hipertensivos, como natriurese e vasodilatação (Beerves et al., 2001; Paul et al., 2020) (Fig. 3). Os efeitos biológicos de Ang II são em maior parte mediados pela ligação ao receptor AT1, o qual está expresso em diversos tecidos como músculo liso vascular, endotélio, glândula adrenal, coração, rins e sistema nervoso central e periférico. Cronicamente, a ativação desses receptores pela Ang II plasmática ou tecidual, produzem respostas cardiovasculares, como remodelamento e disfunção, associadas ao crescimento e proliferação celular, inflamação e estresse oxidativo (Tabela 1) (Mehta e Griending, 2007; Kawai et al., 2017).

**Tabela 1:** Efeitos cardiovasculares da angiotensina II/AT1.

<b>Local</b>	<b>Efeitos</b>
<b>Células musculares lisas vasculares</b>	Hiperplasia; hipertrofia; migração; contração; oxidação lipídica; fibrose.
<b>Células endoteliais</b>	Disfunção endotelial; desequilíbrio de NO; adesão de monócitos.
<b>Células cardíacas</b>	Hipertrofia; remodelamento; desregulação do sistema de condução.
<b>Matriz extracelular</b>	Síntese; degradação; ativação de metaloproteinases; aumento de citocinas.

Em situações hipotensivas, a contribuição de Ang II para a manutenção de níveis fisiológicos da PA procede da vasoconstrição a partir da ligação aos receptores AT1 presentes na membrana de CML de artérias de resistência; a nível central medeia o aumento da atividade do sistema nervoso simpático levando a vasoconstrição pela ação da noradrenalina; promove o aumento do volume de fluido corporal por estimular a secreção do hormônio aldosterona no córtex adrenal, que por sua vez, reduz a excreção de sódio e água pelos rins (Jordan et al., 2018; Oparil et al., 2019; Ocaranza et al., 2020) (Fig. 2).

### **1.1.3. Efeitos vasculares do SRA na hipertensão**

A parede arterial é composta por três camadas: túnica íntima, túnica média e túnica externa. A túnica íntima está em contato com o lúmen vascular e é formada predominantemente por uma única camada de células endoteliais que sintetizam colágeno IV e laminina, além de participarem da regulação tônica das CML. Já a túnica externa ou adventícia, está situada mais externamente, contendo fibroblastos, adipócitos, tecido conjuntivo e matriz extracelular rica em colágeno que desempenha o papel de sustentação estrutural. Localizada entre as túnicas íntima e externa, está a túnica média formada por várias camadas de células de músculo liso, alinhadas circunferencialmente e dispostas entre uma rede de fibras elásticas e colágenas (Beenakker et al., 2012; Brown et al., 2018; Mozafari et al., 2019). Particularidades das CML, como a alta plasticidade e a capacidade de sofrer diferenciação fenotípica, tornam a camada média o sítio de maiores alterações vasculares na hipertensão (Touys et al., 2018), embora também existam evidências de grandes mudanças fenotípicas e funcionais no endotélio e na adventícia vasculares.

As CML vasculares, um dos principais componentes da parede de artérias de resistência e condutância, são responsáveis pelo controle do fluxo sanguíneo e da PA, regulando o diâmetro do lúmen dos vasos em resposta a vários estímulos, incluindo a sinalização Ang II/AT1 (Brown et al., 2018). De fato, a sustentada ativação do receptor AT1, presente na hipertensão, resulta em alterações vasculares de grandes e pequenas artérias caracterizando-se por disfunção endotelial, aumento

da contração e remodelamento arterial, que conduzem ao aumento persistente da resistência vascular periférica (Taubman, 2003; Mondaca-Ruff et al., 2019).

Ang II/AT1 regula a contração muscular pela ativação de Fosfolipase C (PLC), levando à geração dos segundo mensageiros trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). A produção de IP3 estimula a liberação de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular a partir do retículo sarcoplasmático e o DAG causa ativação da proteína quinase C (PKC) que estimula os canais iônicos de  $\text{Ca}^{2+}$ , em conjunto levando à interação actina/miosina e geração de contração (Touyz et al., 2018).

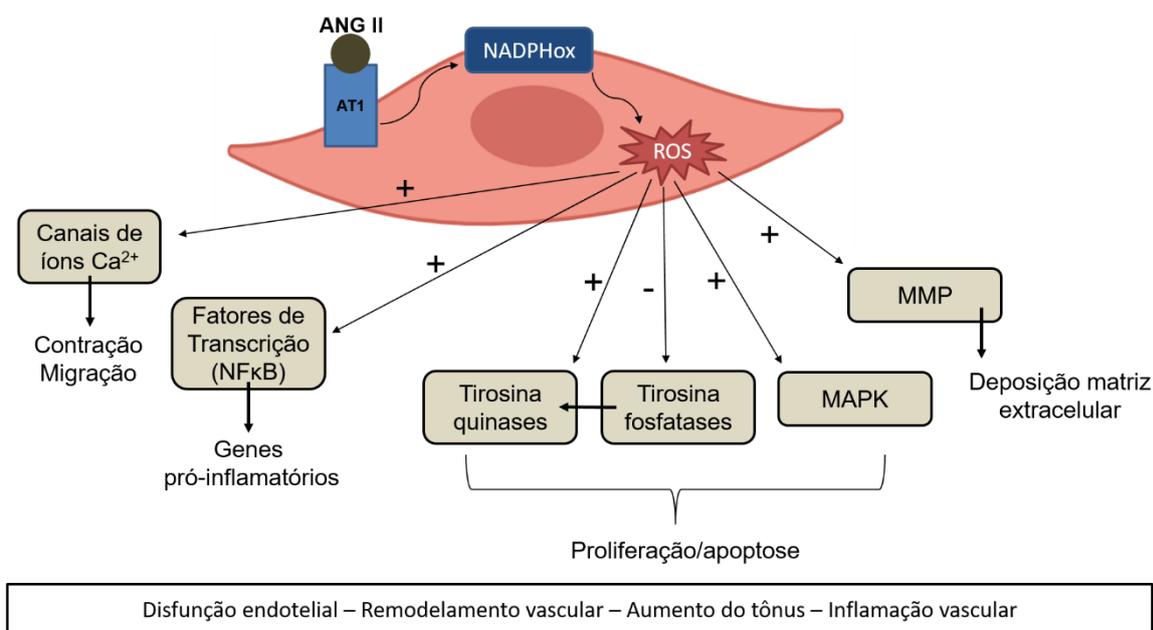
Além de seu papel vasoconstritor direto, Ang II tem importante ações inflamatórias e oxidativas que são mecanismos-chave da disfunção endotelial e dano arterial na hipertensão (Wenzel et al., 2011; Crowley, 2014; Maneesai et al., 2017). O aumento de estresse oxidativo, induzido por Ang II, implica na ativação de diversas cascatas celulares que culminam em remodelamento vascular. Nestas se incluem deposição de colágeno e pela liberação de citocinas e fatores de transcrição pró-inflamatórios (Ruiz-Ortega et al., 2000; Intengan e Schiffrin, 2001; Mondaca-Ruff et al., 2019).

As ROS, como ânion superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), atuam como importantes segundos mensageiros nas células do músculo liso vascular levando a mudanças na transcrição de genes e síntese de proteínas e, conseqüentemente, na função celular (Touys, 2004; Montezano e Touys, 2014). Nessas células, NADPH oxidase (NADPHox) é a principal fonte de produção de  $\cdot\text{O}_2^-$ , sendo a Ang II um dos principais reguladores de sua atividade (Rajagopalan et al., 1996; Landmesser et al., 2002). A mitocôndria também é importante produtora de ROS vascular através da liberação de  $\cdot\text{O}_2^-$  resultante da atividade da cadeia respiratória. Interessantemente, existe uma interação bilateral (cross-talk) entre essas fontes oxidantes, onde a ROS mitocondrial aumenta a atividade da NADPHox, e vice-versa, em um ciclo vicioso (Dikalov, 2011; Daiber et al., 2017).

Sob condições fisiológicas, a modulação redox assegura que a formação de ROS seja de maneira controlada, mantendo baixos níveis intracelulares através do equilíbrio entre as vias oxidantes e a capacidade antioxidante. A taxa de produção de ROS pelas vias oxidantes é contrabalanceada pela taxa de eliminação coordenada pelos agentes antioxidantes endógenos, como as enzimas superóxido

dismutase (SOD) e catalase. Por outro lado, o excesso intracelular de ROS desencadeado por estímulos crônicos de origem endógena ou exógena implicam na desregulação redox, estresse oxidativo e consequente lesão e disfunção celular (Dröge, 2002; Mueller et al., 2005).

As ROS são altamente reativas e podem rapidamente oxidar lipídeos (peroxidação lipídica) e proteínas constituintes da membrana celular, expondo o material genético ao dano (mutação ou degradação) (Vasdev et al., 2006). Na hipertensão, Ang II/AT1 estimula cronicamente NADPHox principalmente via PKC, levando a maior biodisponibilidade de ROS. Em consequência, o desequilíbrio do sistema redox e ativação de diversas moléculas sinalizadoras modulam aumento no tônus e as alterações estruturais vasculares (Touyz, 2004; Montezano e Touyz, 2012; Paul et al., 2020) (Fig. 4).



**Figura 4: Ativação da via Ang II/AT1/NADPH oxidase e efeitos do aumento de ROS nas células musculares lisas vasculares.** Ang II: angiotensina II; NADPHox: NADPH oxidase; ROS: espécies reativas de oxigênio; Ca<sup>2+</sup>: cálcio; NFκB: fator nuclear kappa B; MAPK: e proteínas quinases ativadas por mitógeno; MMP: metaloproteinases. Figura de autoria própria.

As ROS medeiam parte do efeito vasoconstritor e hipertrófico da Ang II pelo aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  através da estimulação da via  $\text{IP}_3$  e inibição da SERCA e por ativação dos canais iônicos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, as ROS estimulam a atividade de proteínas tirosina quinases (PTK) e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) que controlam proliferação e apoptose celular. Componentes da matrix extracelular, como as enzimas metaloproteinases, também são alvos das ROS, contribuindo para o remodelamento vascular, caracterizado por degradação da matriz extracelular. Adicionalmente, o aumento de estresse oxidativo modifica a expressão gênica e proteica por ativação de diversos fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), o qual é responsável pela transcrição de muitos genes envolvidos na inflamação e crescimento vascular, como interleucinas (IL) e moléculas de adesão (Touys, 2004; Garrido e Griending, 2009; Sun et al., 2016; Paul et al., 2020) (Fig. 4).

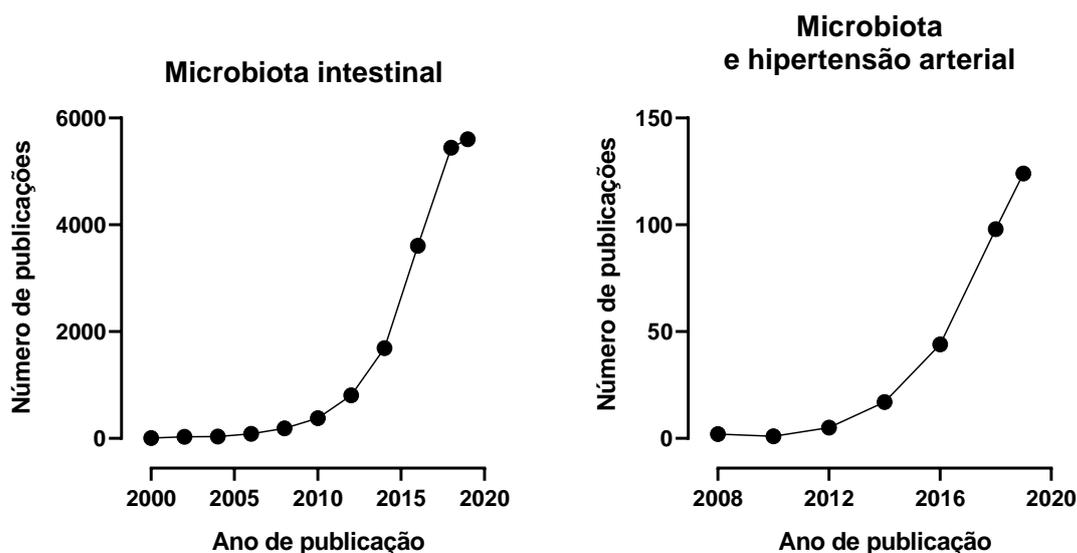
Os efeitos pró-inflamatórios de Ang II mediados pelo estresse oxidativo, decorrem do recrutamento de células imunes, como linfócitos T e macrófagos, e da liberação de citocinas pró-inflamatórias. O principal mecanismo é a translocação de NF $\kappa$ B para o núcleo que induz a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), e de quimiocinas (proteína quimiotática de monócitos-1, MCP-1) (Ruiz-Ortega et al., 2000; Marchesi et al., 2008; Crowley, 2014; Tanase et al., 2019). Ademais, são ativadas moléculas de adesão endotelial, como P-selectina, e proteína-1 de adesão de células vasculares (VCAM-1) que aumentam excessivamente o extravasamento, adesão e migração de leucócitos propiciando o remodelamento da matriz extracelular através do aumento da fibrose, hipertrofia e apoptose (Vaziri e Rodríguez-Iturbe, 2006; Marchesi et al., 2008).

A persistência desses estímulos dependentes de estresse oxidativo resulta em dano vascular caracterizado por vasoconstrição, disfunção endotelial, hipertrofia e hiperplasia de CML e inflamação (Touys, 2004). Afirmando esses mecanismos, é demonstrado que terapias com atenuadores da atividade do SRA, como bloqueadores dos receptores AT1 e inibidores da ECA, reduzem o estresse oxidativo e inflamação independentemente da redução da PA (Dandona et al., 2007).

Embora existam inúmeras classes de medicamentos anti-hipertensivos disponíveis, o controle e manutenção da PA em níveis fisiológicos ainda é um desafio atual. Neste sentido, os recursos naturais, particularmente os alimentos funcionais, tem despertado interesse da comunidade científica como uma alternativa de tratamento auxiliar e não farmacológico para os pacientes hipertensos. Nesta vertente os probióticos, vêm se destacando como uma estratégia terapêutica de grande valia, uma vez que compreende uma fonte natural de moléculas bioativas com atividade anti-hipertensiva e inibitória da ECA (Priyanto et al., 2015; Mirzapour et al., 2017; Chen et al., 2018; Paisansak et al., 2020).

## **1.2. Probióticos no tratamento da hipertensão arterial**

É recente, mas expressivo, o despertar da comunidade científica pelo estudo da microbiota intestinal a fim de compreender o papel deste complexo nicho, composto por trilhões de microrganismos, na manutenção do equilíbrio fisiológico e no desenvolvimento de doenças (Fig. 5). As novas evidências apontam a crucial contribuição desse microbioma na regulação da PA e, por sua vez, no desenvolvimento e progressão da hipertensão (Yang et al., 2018; Vasquez et al., 2020) (Fig. 5).



**Figura 5: Curso temporal do número de publicações relacionadas aos termos “*gut microbiota*” e “*microbiota and hypertension*”, nas últimas duas décadas.**

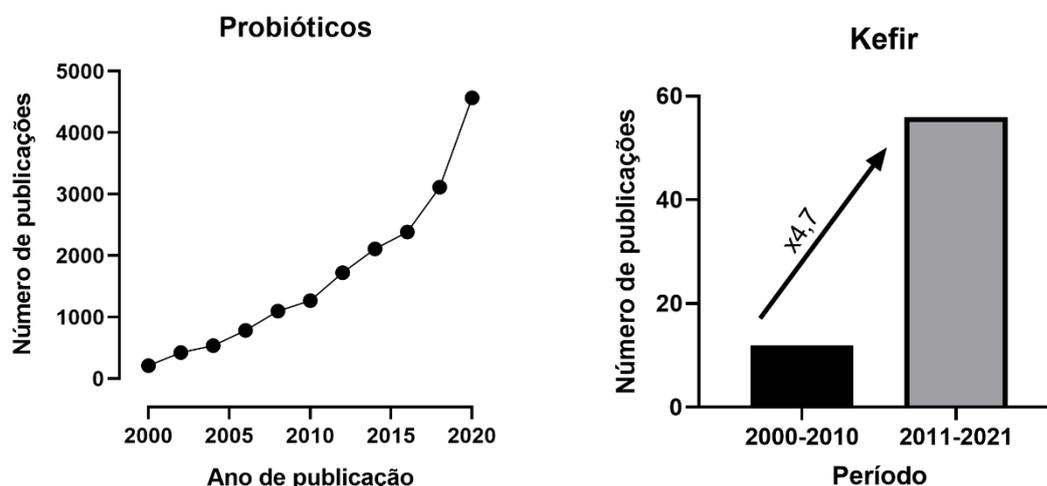
Fonte: Plataforma PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

A disbiose intestinal, que se caracteriza pelo desequilíbrio de componentes e da função da microbiota, tem sido apontada como um importante fator das gêneses do aumento da PA em modelos experimentais de hipertensão (Santisteban et al., 2017; Yang et al., 2015; Mell et al., 2015; Stewart et al., 2016) e indivíduos hipertensos (Li et al., 2017; Dan et al., 2019; Mushtaq et al., 2019). Deste modo, a modulação da microbiota intestinal, visando um estado mais próximo do equilíbrio intestinal (simbiose), é uma estratégia promissora para o manejo da hipertensão. Neste sentido, os alimentos funcionais, como os probióticos, têm se revelado como uma viável terapia coadjuvante, não farmacológica, de controle da PA.

Os probióticos são preparações contendo microorganismos vivos ou seus componentes que podem conferir um benefício à saúde do hospedeiro (Lopitz-Otsoa et al., 2006). Nas últimas duas décadas é notável o crescimento de estudos com probióticos visando a compreensão de seus efeitos sobre diversas doenças e disfunções (Fig. 6A). No tocante à hipertensão, já tem sido demonstrada a eficácia da utilização de probióticos na redução da PA, em animais e indivíduos hipertensos,

através dos seus efeitos cardiovasculares e propriedade anti-hipertensiva (Chen et al., 2014; Yap et al., 2016; Ahtesh et al., 2018; Ganesh et al., 2018).

As propriedades funcionais desses alimentos são atribuídas, em parte, ao conteúdo de componentes bioativos, como os peptídeos com potente atividade inibitória da ECA, os quais tem impactado na manutenção da pressão arterial sem efeitos colaterais. Em concomitância, essas recentes investigações sinalizam para o impacto da modulação da PA pelo probiótico Kefir (Kanbak et al., 2014; Friques et al., 2015; Monteiro et al., 2020), refletindo nos últimos anos no aumento expressivo de estudos visando a compreensão de suas propriedades funcionais e componentes (Fig. 6B).



**Figura 6: Curso temporal do número de publicações relacionadas ao termo “probiotics”, nas últimas duas décadas. Crescimento no número de publicações sobre “kefir” nos períodos 2000-2010 e 2011-2021.** Fonte: Plataforma PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

### 1.3. Kefir

O Kefir é uma bebida láctea probiótica detentora de diversas propriedades funcionais, que incluem: atividade anti-inflamatória, antioxidante e antiproliferativa, efeito anti-hipertensivo, hipoglicemiante, antialérgico e antiulcerativo, entre outras (Bourrie et al., 2016; Rosa et al., 2017; Peluzio et al., 2021). Nas montanhas do Cáucaso do Tibet, em 2000 a.C., o Kefir era considerado uma riqueza familiar e seus

grãos eram tradicionalmente ofertados de geração em geração. O nome “kefir” origina-se do eslavo “*keif*”, significando "bem-estar" ou “viver bem”, em razão da sensação geral de saúde e benefícios que proporcionava ao organismo de quem o consumia (Bourrie et al., 2016). Particularmente, o Kefir se difere dos demais leites fermentados, pois apresenta como cultura iniciadora os grãos de Kefir, que consistem em um complexo e específico microbioma envolto por uma matriz de polissacarídeos denominada kefiran (Ahmed et al., 2013; Nejati et al., 2020).

Os grãos de Kefir são estruturas globulares irregulares e gelatinosas, brancas ou levemente amareladas, com tamanho variando entre 0,3 e 3,5 cm de diâmetro. A matriz kefiran é formada a partir da ação de *Lactobacillus kefiranofaciens* e *Lactobacillus kefiri* e auxilia na relação simbiótica entre os microorganismos presentes nos grãos (Prado et al., 2015). O microbioma é formado por uma ampla diversidade de bactérias fermentadoras do ácido láctico e ácido acético, bem como de leveduras. Entretanto, os tipos e quantidade variam de acordo com a origem geográfica dos grãos, assim como as condições que foram cultivados, como a temperatura, tipo de leite e tempo de incubação (Rosa et al., 2017; Nejati et al., 2020). A partir da incubação dos grãos com leite integral e pausterizado (vaca, cabra, camelo, entre outros), é formada uma bebida fermentada de aspecto viscoso,

pH de 4,6, levemente carbonada e de sabor ácido (Frag et al., 2020). As etapas de preparo do leite fermentado do Kefir são detalhadas na Figura 7.



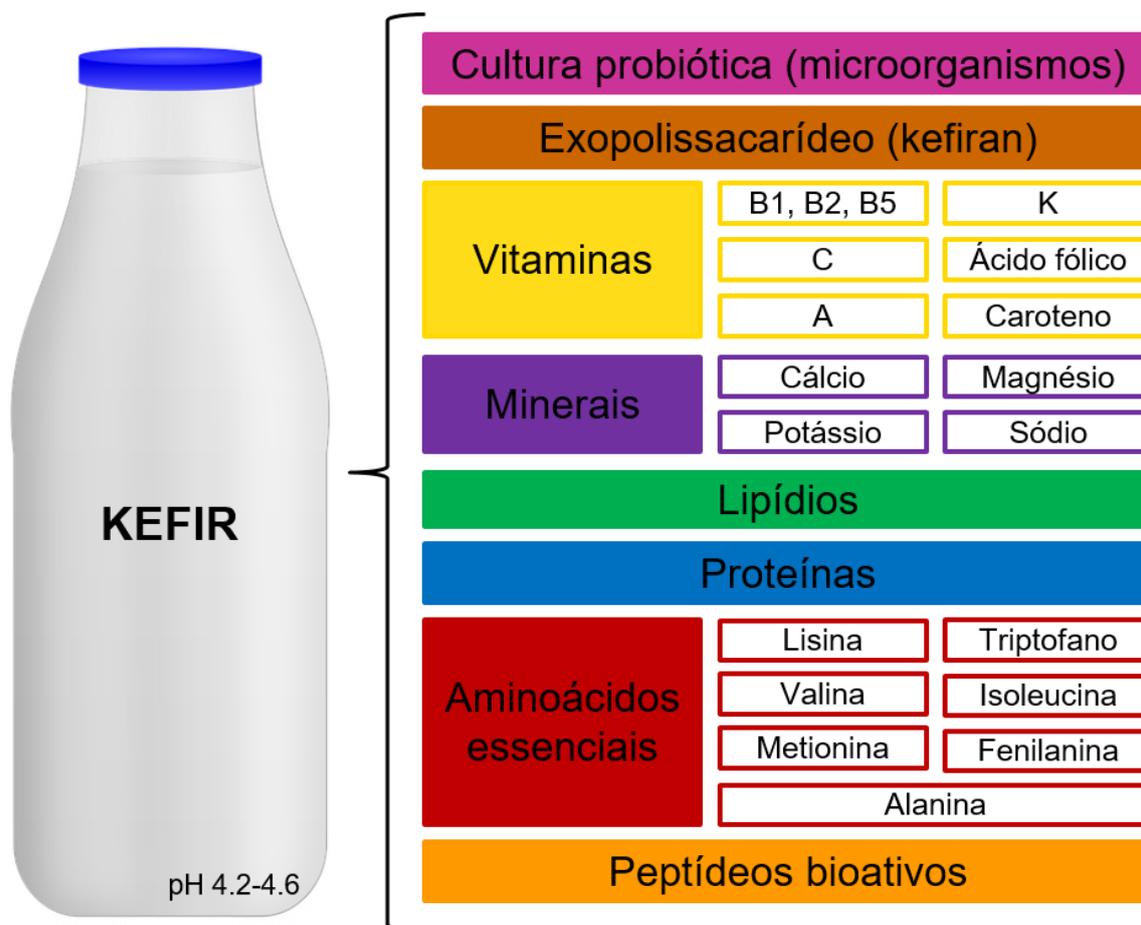
**Figura 7: Etapas da preparação do leite fermentado do Kefir.** Na primeira etapa de fermentação, os grãos de Kefir são incubados com leite integral pasteurizado de origem animal, em temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, o conteúdo fermentado é separado (coado) dos grãos e armazenado a 4°C (geladeira) por mais 24 horas para a segunda etapa de fermentação. Essa fase é crucial para que todo conteúdo de lactose seja consumido. Após, o produto final pode ser armazenado a 4°C até o consumo. Figura de autoria própria.

Os microorganismos presentes no Kefir apresentam potencial probiótico. Já foram isoladas diversas espécies de microorganismos no Kefir dos quais apresentam resistência a baixos pH e sais biliares do trato gastrointestinal além da capacidade de se aderir à mucosa do intestino (Golowczyc et al., 2008). Adicionalmente, a microbiota do Kefir produz substâncias antagonistas como ácidos

orgânicos e bacteriocinas (Silva et al., 2009) e interferem na adesão de bactérias patogênicas na mucosa intestinal, contribuindo assim para a melhora da saúde do intestino e do organismo (Xie et al., 2012; Rosa et al., 2017).

Além da propriedade probiótica direta, os inúmeros benefícios do Kefir à saúde são atribuídos aos nutrientes e aos compostos com atividade biológica que são liberados durante a fermentação do leite e no trato gastrointestinal (Guzel-Seydim et al., 2011; Ahmed et al., 2013; Farag et al., 2020). Com relação ao processo de fermentação, esse é um fator crucial para o enriquecimento da composição do leite fermentado, sendo a qualidade e a quantidade de constituintes do produto final alterada por diversos fatores, como a origem animal do leite, temperatura e tempo de incubação (Rosa et al., 2017; Farag et al., 2020).

O Kefir é uma bebida de alto valor nutricional devido à sua rica composição química formada por vitaminais, minerais, carboidratos, proteínas, aminoácidos, peptídeos e lipídeos (Fig. 8). Além disso, ácido láctico, peptídeos bioativos, exopolissacarídeos, antibióticos e numerosas bacteriocinas são produzidos pela atividade das bactérias lácticas durante a fermentação. Esse processo também propicia o enriquecimento do conteúdo de vitaminas B1, B12, K, ácido fólico, cálcio e aminoácidos (Guzel-Seydim et al., 2011; Bourrie et al., 2016; Farag et al., 2020).



**Figura 8: Constituintes da bebida fermentada do Kefir.** Figura de autoria própria.

Recentes estudos em modelos experimentais de hipertensão arterial explicitaram a ação do Kefir sobre a microbiota intestinal impactando no sistema cardiovascular e na redução da PA (Tabela 1). Em estudos realizados com ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e com hipertensão renovascular, o consumo crônico de Kefir atenuou a elevação anormal da PA e FC (Frigues et al., 2015; Klippel et al., 2016; Silva-Cutini et al., 2019; Amorim et al., 2019; Monteiro et al., 2020). Adicionalmente, esses animais apresentaram redução da hipertrofia cardíaca, melhora da função cardíaca, redução da disfunção endotelial e da vasodilatação (Frigues et al., 2015; Silva-Cutini et al., 2019). Esses efeitos podem ser atribuídos aos peptídeos anti-hipertensivos do Kefir (Amorim et al., 2019; Monteiro et al., 2020).

**Tabela 2: Estudos que demonstraram o efeito anti-hipertensivo do Kefir em modelos experimentais de hipertensão.**

<b>Modelo</b>	<b>Duração do tratamento</b>	<b>Referência</b>
SHR	7, 15, 30 e 60 dias	Friques et al., 2015
SHR	60 dias	Klippel et al., 2016
SHR	60 dias	Brasil et al., 2017
SHR	60 dias	Silva-Cutini et al., 2019
Dieta hipersódica	30 dias	Kanbak et al., 2014
Camundongos 2R1C	60 dias	Monteiro et al., 2020
Ratos 2R1C	14 dias	Amorim et al., 2019

SHR: ratos espontaneamente hipertensos; 2R1C: 2 rins, 1 clip.

Diversos compostos bioativos, como os peptídeos, são componentes de fontes naturais (alimentos, plantas, animais ou microrganismos) e apresentam uma ampla variedade de efeitos em outro organismo (Fernandes et al., 2019; Grajek et al., 2005). O leite fermentado do Kefir representa uma mistura complexa da qual podem ser obtidos diversos fragmentos biologicamente ativos, liberados a partir da proteólise (Guzel-Seydim et al., 2011; Izquierdo-González et al., 2019; Nejati et al., 2020), que exercem múltiplas ações, como papel imunomodulador, antitumoral, antioxidante e antihipertensivo (Quirós et al., 2005; Amorim et al., 2019; Nejati et al., 2020; Chen et al., 2020). O Kefir tem uma concentração maior de peptídeos bioativos e aminoácidos livres comparado ao leite e, portanto, detém maiores propriedades funcionais (Amorim et al., 2019). A proteólise pode ocorrer de diversas maneiras (Nejati et al., 2020):

- a) Enzimas proteolíticas de bactérias lácticas na fermentação;
- b) Enzimas digestivas (como tripsina e proteases) no trato gastrointestinal;
- c) Enzimas proteolíticas de microrganismos no trato gastrointestinal.

No processo de fermentação, a acidificação do pH pela atividade proteolítica das bactérias lácticas resulta na desnaturação e coagulação das proteínas do leite, liberando estruturas menores de proteínas (oligo, di ou tripeptídeos). Esses fragmentos, por sua vez, são hidrolisados por endopeptidases e aminopeptidases em aminoácidos e peptídeos livres, que são facilmente absorvidos promovendo atividade biológica e efeitos fisiológicos locais (no trato gastrointestinal) e sistêmicos (após absorção pela mucosa intestinal) (Adolfsson et al., 2004; Fernandez et al., 2017). Vale ressaltar, que esse processo de proteólise e liberação de moléculas funcionais ocorre de maneira semelhante no trato gastrointestinal.

Estudos têm demonstrado que a maioria dos peptídeos identificados no Kefir exibem atividades anti-hipertensiva e inibitória sobre a ECA e são derivados da caseína e proteínas do soro (Quirós et al., 2005; Amorim et al., 2019). Um estudo proteopeptidômico realizado com a bebida Kefir sequenciou 35 peptídeos com potencial atividade anti-hipertensiva devido à propriedade de inibição sobre a ECA (Amorim et al., 2019). Dentre esses, o heptapeptídeo AVYPYQR, derivado da  $\beta$ -caseína, destacou-se na análise de docking molecular quanto à sua forte interação contra o sítio catalítico da ECA, evidenciando assim seu possível expressivo efeito inibitório. A sua ação hipotensora se baseou nas características físico-químicas que podem estar relacionadas a uma melhor afinidade com a ECA (Lunow et al., 2015; Rai et al., 2017), sendo elas:

- Presença de 2-12 aminoácidos com dois sítios ativos da ECA no domínio N e C;
- Presença de aminoácidos hidrofóbicos, como Tirosina (Y), Fenilalanina (F), Triptofano (W), Alanina (A), Valina (V) e Metionina (M);
- Presença de aminoácidos carregados positivamente, como Arginina (R) e lisina (K)
- Aminoácido Prolina (P) na posição C terminal dos peptídeos.

Adicionalmente, nas análises *in silico*, AVPYPQR apresentou ótima solubilidade em água e não apresentou sítios de clivagem para as enzimas gástricas (tripsina, quimotripsina e pepsina), o que poderia interferir na biodisponibilidade oral (Amorim et al., 2019). Ademais, ensaios *in vitro* avaliaram a permeabilidade celular através da passagem apical/basolateral e observaram que esse peptídeo foi capaz de atravessar a monocamada epitelial de células Caco-2 alcançando o compartimento basolateral (Tonolo et al., 2018). Portanto, AVPYPQR, o qual denominamos de Kef-1, apresenta um potencial ação como um inibidor da ECA devido às diversas características físico-químicas e funcionais que evidenciam sua forte influência nas propriedades anti-hipertensivas atribuídas ao Kefir.

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços farmacológicos para o tratamento da hipertensão arterial, a manutenção da PA em valores fisiológicos ainda permanece um desafio para a ciência. Embora os valores normais de PA são atingidos, muitos pacientes permanecem em risco para desenvolver um evento cardiovascular, devido aos níveis elevados de estresse oxidativo e inflamação.

Atualmente há uma busca constante por estratégias que auxiliem no tratamento de doenças de grande incidência na população, como a hipertensão arterial. Nesta vertente, destacam-se os alimentos funcionais, entre eles os probióticos e seus compostos bioativos que atuam como importantes moduladores da PA. O probiótico Kefir vem ganhando visibilidade como uma promissora estratégia de terapia adjuvante na hipertensão. O efeito anti-hipertensivo direto do Kefir parece ser devido à presença de peptídeos inibidores da ECA. Por outro lado, indiretamente, o efeito anti-hipertensivo do Kefir também pode estar associado à sua ação antioxidante e anti-inflamatória.

Desta forma, estudos que visam a identificação e caracterização de peptídeos bioativos presentes no Kefir são importantes para a compreensão dos benefícios associados ao consumo deste probiótico de baixo custo e fácil acesso. Portanto, fazem-se necessários estudos capazes de demonstrar, além do efeito anti-hipertensivo, as ações antioxidante e anti-inflamatória, de moléculas bioativas isoladas do Kefir de leite, para assim justificar o consumo deste probiótico como adjuvante no tratamento de doenças como a hipertensão.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar a atividade anti-hipertensiva, antioxidante e anti-inflamatória do peptídeo Kef-1, um inibidor da ECA derivado do Kefir, no modelo experimental de hipertensão 2- rins, 1- clip.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar a capacidade de inibição da ECA pelo peptídeo Kef-1 *in vitro*.
- Avaliar o efeito da administração oral do peptídeo Kef-1 (tratamento agudo) sobre as alterações hemodinâmicas.
- Avaliar o efeito da administração oral diária do peptídeo Kef-1 (tratamento crônico) sobre:
  - As alterações hemodinâmicas;
  - O estresse oxidativo sistêmico e vascular;
  - A inflamação sistêmica e vascular;
  - A viabilidade e apoptose das CML da aorta;
  - As vias pró-oxidantes nas CML da aorta;
  - O potencial de membrana mitocondrial de CML da aorta;
  - O remodelamento de aortas;
  - A camada endotelial de aortas.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Capacidade de inibição de Kef-1 sobre a ECA (*in vitro*)

Primeiramente, o peptídeo Kef-1 foi sintetizado pela empresa AminoTech (<http://www.aminotech.net.br/>, SP, Brasil), com grau de pureza superior a 95%. A capacidade de inibição do peptídeo Kef-1 sobre a ECA *in vitro* foi avaliada utilizando Técnica de Transferência de Energia de Fluorescência por Ressonância, descrita por Alves e colaboradores (2005). O peptídeo sintético Abz-FRK (Dnp) P-OH (Aminotech, SP, Brasil) foi utilizado como substrato para quantificar a atividade da ECA no homogenato de pulmão de camundongo, utilizado como fonte da enzima. A hidrólise Abz-FRK (Dnp) P-OH pela enzima resulta na liberação do produto Abz-FR, emitindo fluorescência.

Resumidamente, Kef-1 foi ressuspendido em água e avaliado de acordo com o IC50 previamente descrito na literatura (Pihlanto-Leppälä et al., 1998; Perpetuo et al., 2003). Os testes foram realizados a 37°C em tampão Tris-HCl (0,1 M pH 7) contendo NaCl (50 mM) e ZnCl<sub>2</sub> (10 mM), por 90 minutos. A taxa de hidrólise do substrato Abz-FRK (Dnp) P-OH (10 µM) foi avaliada para obter a atividade inibitória sobre a ECA. O ensaio foi adaptado a um leitor de placas de 96 poços e a fluorescência foi mensurada a 320 nm de excitação e emissão de 420 nm, em um leitor de microplacas LUX Varioskan Multimode (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A atividade da ECA foi apresentada como unidades relativas de fluorescência (RFU) vs tempo de reação e a inibição foi calculada como porcentagem de inibição em relação ao controle positivo (captopril).

### 4.2. Animais experimentais

Os experimentos foram conduzidos em camundongos C57BL/6J machos (10 semanas de idade, ~23g) provenientes de colônia de criação própria do Biotério do Biopráticas da Universidade Vila Velha (ES, Brasil). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade Vila Velha (protocolo #489-2018) e conduzidos dentro dos preceitos éticos para estudo em animais, de acordo com o Guia para o Cuidado e

Uso de Animais de Laboratório (NIH- No. 85-23, revisado em 1996). Os animais foram alojados em gaiolas plásticas individuais com livre acesso à água e ração (Labina®, Purina) durante todo o período experimental e foram submetidos a um ciclo circadiano padrão de 24 horas (12 h claro/12 h escuro) em sala com controle de temperatura (22-23°C) e umidade (60%).

### **4.3. Modelo de hipertensão 2-rins, 1-clip (2R1C)**

No intuito de avaliar os efeitos de Kef-1 sobre a hipertensão dependente de Ang II, o modelo 2R1C foi produzido. Primeiramente, os camundongos foram anestesiados com uma solução de cetamina (91 mg/kg, i.p.) e xilazina (9,1 mg / kg, i.p.). Após assepsia da área (álcool 70%), uma incisão no flanco esquerdo foi realizada para exposição do rim. Com auxílio de uma lupa cirúrgica, a artéria renal esquerda foi cuidadosamente dissecada dos tecidos adjacentes. Posteriormente, um clipe de aço inoxidável em forma de U (abertura de 0,12 mm) foi colocado ao redor da artéria renal, próximo à aorta abdominal. Alguns animais foram submetidos à cirurgia Sham, que consiste na realização dos mesmos procedimentos cirúrgicos, exceto a colocação do clipe.

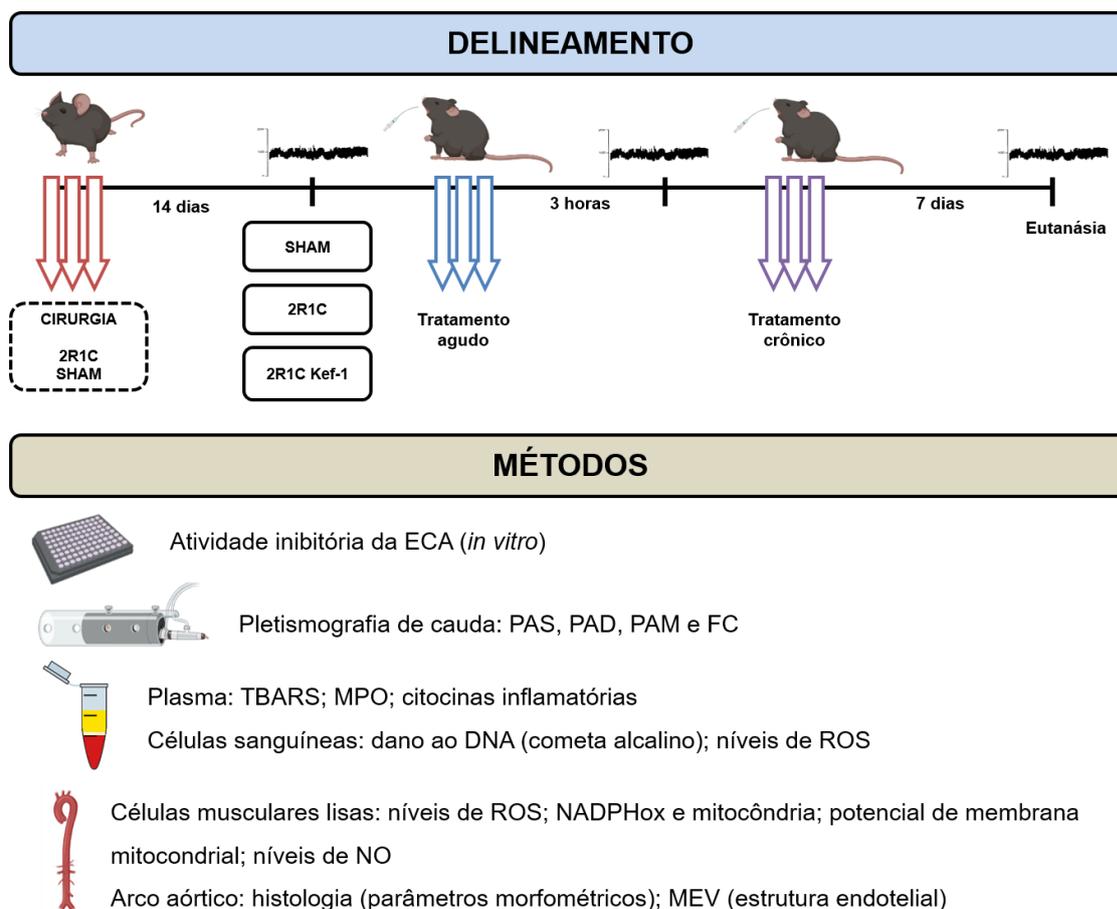
Após 14 dias de clipagem ou cirurgia Sham, a PAS foi mensurada, em camundongos conscientes, por pletismografia de cauda (CODA Mouse Tail-Cuff Blood Pressure System, Kent Scientific Co., Connecticut, EUA) para confirmação da efetividade da indução do modelo de hipertensão 2R1C.

### **4.4. Grupos experimentais e tratamento**

Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais (Fig. 9):

- SHAM: recebeu veículo (água);
- 2R1C: recebeu veículo (água);
- 2R1C Kef-1: recebeu o peptídeo Kef-1 (10 mg/kg/dia).

Os tratamentos foram realizados via gavagem, no período de 7 dias.



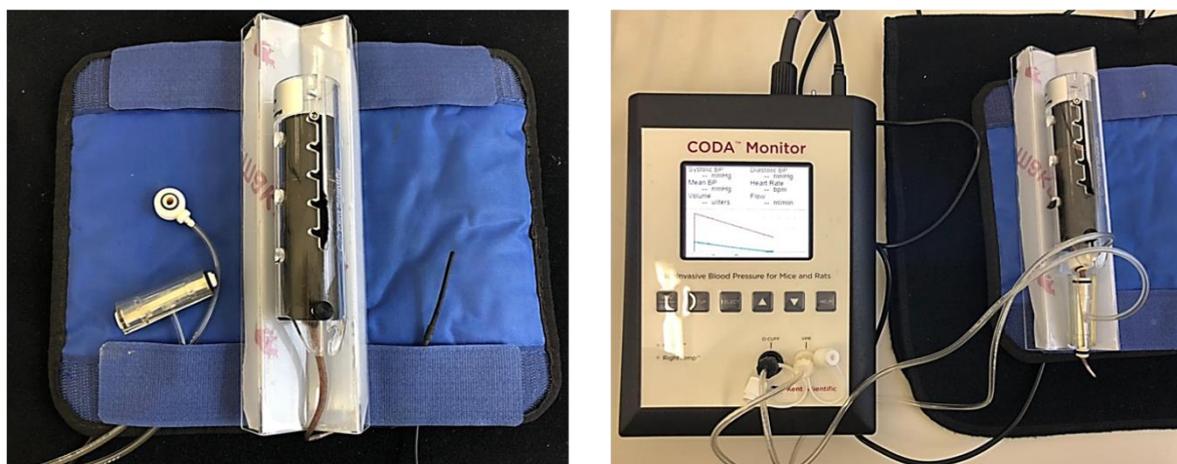
**Figura 9: Delineamento experimental e métodos realizados no presente estudo.** Figura de autoria própria.

#### 4.5. Avaliação hemodinâmica: mensuração não-invasiva da PA por pletismografia de cauda

A PA e FC foram mensuradas em camundongos conscientes por pletismografia de cauda (CODA Mouse Tail-Cuff Blood Pressure System, Kent Scientific Co., Connecticut, EUA) em três tempos diferentes: 14 dias após a cirurgia, 3 horas e 7 dias após os tratamentos. É importante ressaltar, que os animais foram adaptados a esse procedimento por um período de 3 dias antes dos registros pressóricos e todos os pulsos de pressão foram registrados somente após atingir um estado hemodinâmico estável. Os animais foram acondicionados em um tubo de contenção sob uma manta aquecida, com um *cuff* de pulso pneumático acoplado na

região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinsuflado automaticamente e os valores pressóricos e de FC foram obtidos através dos sinais do transdutor acoplado a um computador (Fig. 10). Vinte medidas válidas foram obtidas de cada animal e o valor das variáveis foram dadas como a média dessas medidas.

### AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA NÃO-INVASIVA/PLETISMOGRAFIA DE CAUDA



Coda Non-Invasive Blood Pressure System												
		Accepted	Rejected									
Time	Cycle #	Animal	Animal Type	Channel	Regular Cycle	Accepted	Systolic	Diastolic	Mean	Rate	Flow	Volume
08-05-2...	2	Mouse1	Mouse	1	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	170	136	147	574.00	19.76	43.66
08-05-2...	3	Mouse1	Mouse	1	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	129	112	117	586.00	11.68	25.23
08-05-2...	4	Mouse1	Mouse	1	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	134	114	120	609.00	10.24	23.46
08-05-2...	7	Mouse1	Mouse	1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	125	108	113	273.00	7.56	8.32
08-05-2...	11	Mouse1	Mouse	1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	124	102	109	299.00	1.90	2.48
08-05-2...	12	Mouse1	Mouse	1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	125	95	105	131.00	2.08	5.85
08-05-2...	13	Mouse1	Mouse	1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	125	71	89	353.00	5.25	21.66
08-05-2...	14	Mouse1	Mouse	1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	138	119	125	541.00	8.37	15.90
08-05-2...	17	Mouse1	Mouse	1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	175	118	137	457.00	6.69	26.72
08-05-2...	20	Mouse1	Mouse	1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	162	141	148	546.00	22.89	47.83
08-05-2...	22	Mouse1	Mouse	1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	161	141	147	475.00	21.89	51.89
08-05-2...	24	Mouse1	Mouse	1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	176	130	145	383.00	16.20	52.00
08-05-2...	26	Mouse1	Mouse	1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	171	131	144	530.00	17.21	47.85
08-05-2...	28	Mouse1	Mouse	1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	180	140	153	464.00	15.49	49.27

**Figura 10: Sistema de mensuração não-invasiva da pressão arterial por pletismografia de cauda.** A: Camundongo no interior do tubo de contenção sobre uma manta aquecida; cuffs de pulso pneumático; B: Cuffs posicionados na cauda do animal e acoplados ao sistema CODA; C: Planilha gerada ao final dos registros de pulsos pressóricos apresentando os valores de pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca. Figura de autoria própria.

O efeito anti-hipertensivo agudo (3 horas após tratamento) e crônico (7 dias após tratamento) foi avaliado pela variação da diferença (delta) entre as medidas de PAS, PAD e PAM antes e após os tratamentos. O delineamento experimental do estudo é apresentado na Figura 10.

#### **4.6. Eutanásia e coleta de sangue**

Após 7 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.). O sangue venoso foi coletado por punção cardíaca e armazenado (4°C) para análises posteriores. O plasma foi separado por centrifugação (3500 rpm, 10 min) e armazenado (-20°C) até o momento dos ensaios. Após, os camundongos foram perfundidos com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4; glicose 01M) para remoção da aorta torácica.

#### **4.7. Isolamento das células vasculares**

Para o isolamento das CML, a aorta torácica foi cuidadosamente retirada e colocada em placa de Petri sobre o gelo, banhada em solução Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; SigmaAldrich, Saint Louis, MO, USA), para a remoção de todo o tecido conjuntivo, adiposo e a adventícia. Posteriormente, a aorta foi cortada em pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e assim, as células foram mecanicamente isoladas por trituração utilizando um homogeneizador (ultra-turrax– Ultra Stirrer). Uma alíquota da suspensão de células foi contada em uma câmara Neubauer. As amostras foram consideradas viáveis quando  $\geq 80\%$  das células estavam vivas.

Após o isolamento celular, a presença de CML na amostra foi confirmada pela expressão da proteína alfa-actina de músculo liso avaliada por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, EUA). As seguintes etapas foram realizadas:

- 1)  $1 \times 10^5$  de células foram fixadas e permeabilizadas com solução Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences, EUA) por 20 minutos, no gelo e protegido da luz;

2) As células foram centrifugadas (10 minutos, 1200 rpm) e lavadas 2x com tampão Perm/Wash™ (BD Biosciences, EUA);

3) As amostras foram incubadas com solução de albumina (5%) por 60 minutos em temperatura ambiente, objetivando o bloqueio de ligações inespecíficas;

4) O anticorpo primário anti-alfa actina de musculo liso ( $\alpha$ -SMA; Sigma-Aldrich, EUA) foi incorporado à amostra (1:200) overnight, a 4°C;

5) As células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Alexa fluor 488 (1:200; Invitrogen, Invitrogen Life Technologies, EUA) por 45 minutos, em temperatura ambiente e protegido da luz;

6) Após lavagem (3x) com PBS, as amostras foram incubadas durante 20 min a 4°C com 7-Aminoactinomicina D (7-AAD, BD Biosciences, EUA), um agente intercalante de DNA.

Os dados foram adquiridos no FACSCanto II (BD) e analisados no software FACSDiva (BD Biosciences, EUA).

#### **4.8. Análise dos níveis intracelulares de ROS**

O efeito antioxidante de Kef-1 foi avaliado nas células sanguíneas e CML através da análise por citometria de fluxo da produção de ROS. Previamente, nas amostras de sangue, a lise de hemácias foi induzida pela adição de cloreto de amônio (10 minutos, a 37°C). Ânion superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) intracelular foram mensurados por mudanças na mediana da intensidade de fluorescência (MIF) emitida por di-hidroetidina (DHE, Sigma-Aldrich, EUA) e diclorofluoresceína (DCFDA, Sigma-Aldrich, EUA), respectivamente.  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com 160 mmol/L de DHE e 20 mmol/L de DCFDA a 37 °C por 30 minutos, protegido da luz. As células foram lavadas, ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (10.000 eventos; FACSCanto II, BD). Os histogramas de sobreposição foram analisados com o software FlowJo (Tree Star, LLC, Ashland, OR, EUA).

#### 4.9. Análise sistêmica da fragmentação de DNA: ensaio do cometa alcalino

O dano ao DNA foi avaliado em células sanguíneas utilizando o ensaio de cometa alcalino (eletroforese em gel de célula única), baseado em Singh et al. (1988) após pequenas adaptações estabelecidas em nosso laboratório (Tonini et al., 2013) (Fig. 11).



Figura 11: Etapas do protocolo de cometa alcalino. Figura de autoria própria.

##### 1) Preparo das lâminas

Previamente, lâminas histológicas de bordas lapidadas foram pré-revestidas com agarose com ponto de fusão normal (*Normal Melting Point Agarose*, Sigma-Aldrich, EUA) a 1,5% em PBS a 65°C (banho-maria). Posteriormente, uma segunda camada de agarose foi incorporada à lâmina. Foi adicionado em um microtubo 10 µL ( $\sim 2 \times 10^4$ ) de suspensão de células e 110µl de agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point Agarose*, Sigma-Aldrich, EUA) a 1% em PBS a 37°C. Após homogeneização, a solução foi distribuída nas lâminas pré-revestidas, revestidas com lamínulas e resfriadas a 4°C até a polimerização da agarose.

## **2) Lise, desenovelamento e eletroforese**

A etapa de lise tem como objetivo o rompimento das membranas celulares. Após gelatinização da segunda camada, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram incubadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100 e 10 % DMSO, pH 10,0-10,5) durante 1 hora a 4°C. Em seguida, as lâminas foram retiradas da solução de lise e lavadas com água gelada e posteriormente com PBS, com objetivo de inibir as enzimas reparadoras do DNA. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese (Biorad) preenchida com tampão alcalino (em mmol/L: 300 NaOH e 1 EDTA, pH> 13) por 40 min a 4 °C e conduzidas a 300 mA e 32 V (1 V/cm) por 20 min. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4 mol/L, pH 7,5) por 5 min (3 vezes) e, por fim, fixadas com álcool metílico para fixação por 20 minutos.

## **3) Análise citológica**

A migração de fragmentos de DNA em direção ao cátodo cria uma “cauda” de cometa, visualizada por coloração com brometo de etídio (20 µg/mL, Sigma-Aldrich, EUA). Em seguida, as imagens foram obtidas com aumento de 20x em microscópio óptico de fluorescência (Eclipse TI, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA) equipado com filtros de excitação (420-490 nm) e barreira (520 nm). As imagens codificadas foram adquiridas com câmera CCD (Nikon) e analisadas com o programa CASP (domínio público). Utilizamos o parâmetro momento da cauda (tail moment) para quantificação da extensão do dano ao DNA. As imagens de 50 nucleoides de cada amostra, selecionados aleatoriamente, foram analisadas para cada animal.

### **4.10. Avaliação sistêmica da peroxidação lipídica plasmática**

A peroxidação lipídica plasmática foi determinada medindo as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com base na reação entre o malondialdeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (TBA). Para a reação, amostra de plasma foi adicionada a solução de ácido perclórico 7% (Merck Millipore, Massachusetts, EUA)

e homogeneizada em vórtex por 1 minuto. Após centrifugação, o sobrenadante foi incubado com 0,06% de TBA a 95 °C por 60 min, protegido da luz. A leitura foi realizada a 532 nm em um leitor de microplaca (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). O nível de MDA foi expresso em mM.

#### **4.11. Análise da viabilidade e apoptose de células musculares lisas**

As CML viáveis e apoptóticas foram quantificadas pelo kit de detecção de apoptose anexina V-FITC/PI (BD Biosciences, EUA). No estágio de apoptose inicial, a anexina se liga ao fosfolípido fosfatidilserina que está externalizado à membrana plasmática. Já na fase de apoptose tardia, a desintegração da membrana celular possibilita a entrada de iodeto de propídeo (PI) no núcleo celular e sua intercalação. A suspensão de  $10^5$  células foram ressuspensas em tampão de ligação e posteriormente incubadas com Anexina V – FITC (2  $\mu$ L) e PI (2  $\mu$ L) por 15 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, EUA) para quantificar a taxa de viabilidade em Q3 (anexina/PI duplo negativo) e apoptose em Q2 (anexina/PI duplo positivo, que indica células apoptóticas tardias) e Q4 (anexina positiva, mas PI negativo, que indica células apoptóticas precoces). Então, a taxa apoptótica foi determinada como a porcentagem de Q2 + Q4.

#### **4.12. Avaliação das vias oxidantes nas células musculares lisas**

Para investigar o efeito de Kef-1 sobre as principais vias pró-oxidantes, a produção de ROS pela NADPH oxidase (NADPHox) e mitocôndria foi avaliada nas CML na presença dos inibidores específicos. As CML foram incubadas com 600  $\mu$ M de apocinina (inibidor da NADPHox) por 10 min e 1  $\mu$ M de cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona (CCCP, inibidor da mitocôndria) por 45 min. Em seguida, a produção de ROS foi analisada por citometria de fluxo utilizando as sondas fluorescentes DHE e DCF, conforme descrito anteriormente. A contribuição relativa de NADPHox e mitocôndrias foi determinada pela diferença ( $\Delta$ ) entre a produção de ROS antes e após a inibição específica.

#### **4.13. Análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM) nas células musculares lisas**

Para determinar o PMM, as CML (10<sup>6</sup>) foram incubadas por 60 min (37 °C, no escuro) com uma solução contendo o corante JC-10 (Sigma-Aldrich, EUA). JC-10 é um corante catiônico e lipofílico que ao penetrar na mitocôndria polarizada forma agregados em forma de polímeros vermelhos fluorescentes, sendo analisado no canal de fluorescência FL2 ( $\lambda_{ex} = 540/\lambda_{em} = 590$  nm). Quando há o colapso do PMM, a concentração de JC-10 aumenta no citosol, formando monômeros emitindo fluorescência verde e analisados no canal de fluorescência FL1 ( $\lambda_{ex} = 490/\lambda_{em} = 525$  nm) (Fig. 13). Células não marcadas (somente veículo) e células tratadas com CCCP foram consideradas como controle negativo e positivo, respectivamente, e utilizadas para as configurações de compensação da fluorescência no FACSDiva software (BD). Os dados foram analisados pelo software FCS Express (De Novo) e expressos como porcentagem de emissão de fluorescência vermelha e verde. O PMM foi determinado pela razão de fluorescência vermelha para verde.

#### **4.14. Avaliação sistêmica dos níveis de citocinas inflamatórias**

Os níveis das citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e MCP-1 foram determinados no plasma por citometria de fluxo utilizando o kit Cytometric Bead Array (CBA) - Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences). O princípio do método de dosagem com o kit CBA consiste na ligação de anticorpos com as citocinas de interesse. O kit oferece cinco grupos de microesferas, apresentando intensidades de fluorescência diferentes, revestidas com anticorpos específicos para cada tipo de citocina, denominadas “esferas de captura”. Para as dosagens, as esferas de captura específicas para cada citocina, foram agrupadas e posteriormente misturadas com 25  $\mu$ L de cada amostra a fim de permitir a ligação das esferas de captura com as possíveis citocinas presentes na amostra. Em seguida, foram adicionados a essa mistura anticorpos monoclonais anti-citocinas de camundongos, conjugados com o fluorocromo ficoeritrina (PE). Após esta etapa (de marcação), a fluorescência de um total de 5000 microesferas por amostra foi lida em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD), com base em gráficos de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Curvas de calibração estabelecidas separadamente são usadas para determinar a

concentração de cada analito na amostra de teste, usando software de análise FCAP Array™. Os resultados foram expressos em pg/mL.

#### **4.15. Avaliação plasmática da atividade da mieloperoxidase (MPO)**

Para a determinação da atividade da MPO plasmática, 12 µL de plasma e 236 µL de solução de o-dianisidina (Sigma-Aldrich, EUA) foram adicionadas em microplaca de 96 poços. A leitura foi realizada a 460nm em um leitor de microplacas (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) em 0 e 15 minutos. O resultado foi expresso em u.a./mg proteína. A quantificação da proteína foi realizada usando o método de Bradford (Bradford, 1976).

#### **4.16. Quantificação de NO nas células musculares lisas**

As CML foram incubadas com diaminofluoresceína (DAF-2T, SigmaAldrich, EUA) para medir os níveis intracelulares de NO. 10<sup>6</sup> C foram incubadas com 2 µmol/L de DAF-2T a 37 °C por 180 minutos, protegido da luz. Então, as CML foram lavadas e ressuspendidas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences, EUA). Os dados foram adquiridos utilizando o software FACSDiva (BD Biosciences, EUA) e os gráficos *dot plot* (DAF-2T x FCS) foram analisados usando o software FlowJo (Tree Star, LLC, Ashland, OR, EUA). Os dados são expressos como porcentagem de células positivas para DAF-2T.

#### **4.17. Avaliação morfométrica e quantificação de colágeno no arco aórtico**

Primeiramente, o arco aórtico foi dissecado do tecido conjuntivo adjacente e fixado em formaldeído (4%). As amostras foram desidratadas com banhos sequenciais de 30 minutos em soluções de etanol 70%, 95% e 100%. Em seguida, o arco aórtico foi incorporado à Historesina (Leica, Alemanha) e, após a polimerização, foram confeccionados cortes de 5 µm no micrótomo (Leica RM 2125, Alemanha). Após secagem, os cortes fixados nas lâminas foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise morfométrica e picrosirius red para quantificação de colágeno. As imagens foram capturadas com aumento de 4x, 20x

e 40x por meio de uma câmera de vídeo (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss, Germany) acoplada a um microscópio óptico (AX70, Olympus Corporation). As análises foram realizadas no software ImageJ (NIH, EUA). As análises morfométricas foram calculadas de acordo com a metodologia proposta por Ceron et al. (2012):

- Área da seção transversal (AST) = área interna do lúmen ( $A_i$ ) - área externa ( $A_e$ );
- Diâmetro externo (DE) =  $4A_e/\pi$ ;
- Diâmetro interno (DI) =  $4A_i/\pi$ ;
- Espessura da média (M) =  $(DE-DI)/2$ .

#### **4.18. Avaliação ultraestrutural do endotélio aórtico**

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada seguindo uma modificação dos métodos descritos anteriormente (Frigues et al., 2020). As aortas foram removidas e dissecadas do tecido conjuntivo adjacente. Imediatamente, as aortas foram fixadas em solução de *Karnovsky* (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% e tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2) por 24 horas e longitudinalmente abertas no estereomicroscópio (Leica Microsystems). Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1,25% (Sigma-Aldrich, EUA) por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram desidratadas em etanol (30, 50, 70, 90 e 100% - 30 minutos cada), secadas ao ponto crítico de CO<sub>2</sub> líquido (Autosandri-815, Tousimis), e revestido com 10 nm de ouro puro em um metalizador (Desk V, Denton Vacuum). A análise foi realizada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEM-6610 LV, Jeol Inc., USA). Para cada amostra, quatro fotomicrografias foram tiradas aleatoriamente com ampliação de 330x e 1000x.

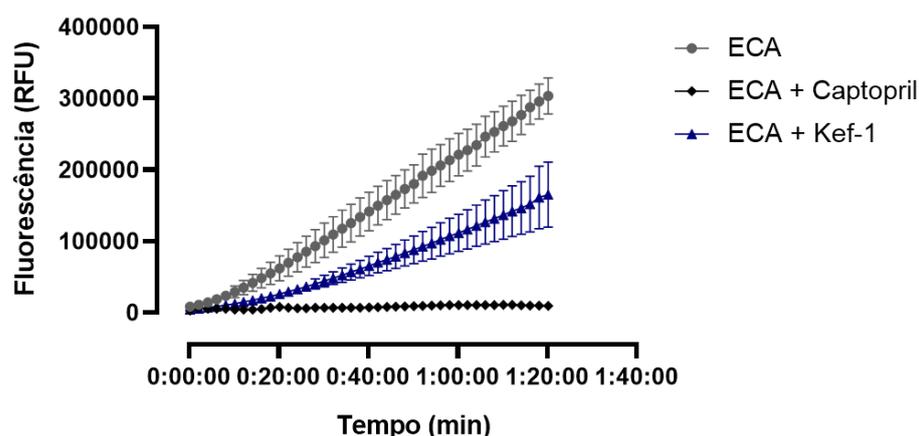
#### **4.19. Análise estatística**

Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov - Smirnov. Análise de variância uma via (ANOVA- uma via) seguida pelo teste *post hoc* de Tukey foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 8 (Prism 8, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Kef-1 exibe capacidade de inibição sobre a ECA *in vitro*

Primeiramente, a capacidade inibitória de Kef-1 sobre a ECA foi avaliada em homogenatos de pulmão de camundongos utilizando Abz-FRK (Dnp) P-OH como substrato. O teste foi realizado comparando a emissão de fluorescência após a clivagem do Arg-Lys (Dnp) pela ECA presente no homogenato de pulmão. A reação mostrou uma redução da detecção de fluorescência representando inibição da ECA por Kef-1 ou Captopril (controle positivo). Kef-1 foi capaz de inibir em 59,6% a atividade *in vitro* da ECA em comparação ao captopril, fornecendo um suporte adicional de que esse peptídeo é um potente inibidor da ECA (Fig.12).

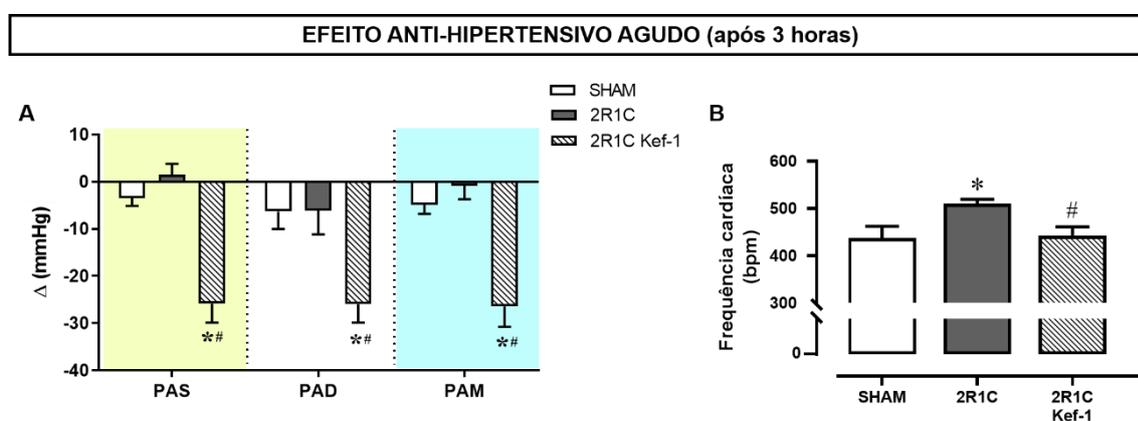


**Figura 12: Kef-1 é capaz de inibir em 59,6% a atividade *in vitro* da ECA em comparação ao captopril.** A capacidade inibitória de Kef-1 sobre a ECA (*in vitro*) foi confirmada utilizando homogenato de pulmão de camundongo como fonte da enzima. A atividade da ACE é apresentada como unidades relativas de fluorescência (RFU) vs tempo de reação.

### 5.2. Kef-1 reduz PA e FC em camundongos hipertensos 2R1C

O primeiro conjunto de análises *in vivo* determinou o efeito anti-hipertensivo de Kef-1 no modelo de hipertensão 2R1C. Quatorze dias após clipagem e cirurgia sham os tratamentos foram iniciados. O efeito anti-hipertensivo agudo induzido pela

administração de Kef-1 é apresentado na Figura 13. Após 3 horas, Kef-1 foi capaz de reduzir significativamente a PAS ( $-25,8 \pm 3,9$  mmHg), PAD ( $-26,0 \pm 3,8$  mmHg) e PAM ( $-26,4 \pm 4,3$  mmHg) em comparação com os grupos SHAM e 2R1C (Fig. 13A). A Figura 13B apresenta os valores médios da FC nos três grupos experimentais após as 3 horas de administração do Kef-1. Como esperado, os animais hipertensos apresentaram um significativo aumento ( $\sim 17\%$ ) da FC em comparação com o grupo SHAM. Já no grupo tratado com Kef-1, a FC foi significativamente reduzida ( $\sim 13\%$ ) em relação ao grupo 2R1C não tratado.



**Figura 13: As mensurações hemodinâmicas evidenciam que o tratamento agudo (3 horas) com Kef-1 reduz a pressão arterial e a frequência cardíaca no modelo experimental de hipertensão 2R1C. (A) Alterações da PAS, PAD e PAM; (B) Média da frequência cardíaca. PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey); \*p <0,05 vs SHAM; #p <0,05 vs 2R1C.**

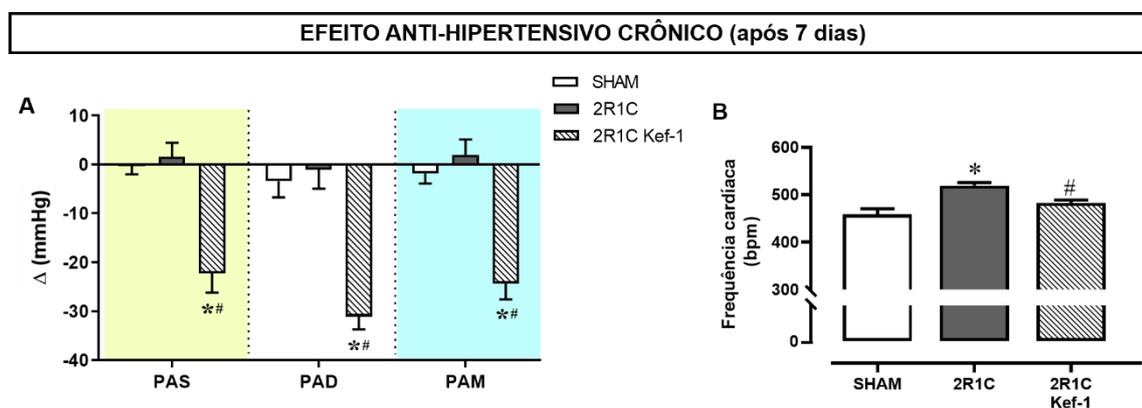
Os parâmetros hemodinâmicos avaliados após tratamento crônico (7 dias) com Kef-1 são apresentados na tabela 3 e figura 14. Os animais 2R1C apresentaram valores significativamente maiores de PAS e PAM quando comparados ao grupo SHAM e o tratamento com Kef-1 foi capaz de reduzir de maneira significativa esses parâmetros hemodinâmicos (tabela 3).

**Tabela 3:** Parâmetros hemodinâmicos nos grupos experimentais.

PARÂMETROS	SHAM	2R1C	2R1C Kef-1
PAS (mmHg)	115 ± 3	141 ± 1*	132 ± 2**
PAM (mmHg)	99 ± 2	123 ± 1*	113 ± 1**

Os dados são apresentados como média ± EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey). \*p <0,05 vs SHAM; #p <0,05 vs 2R1C.

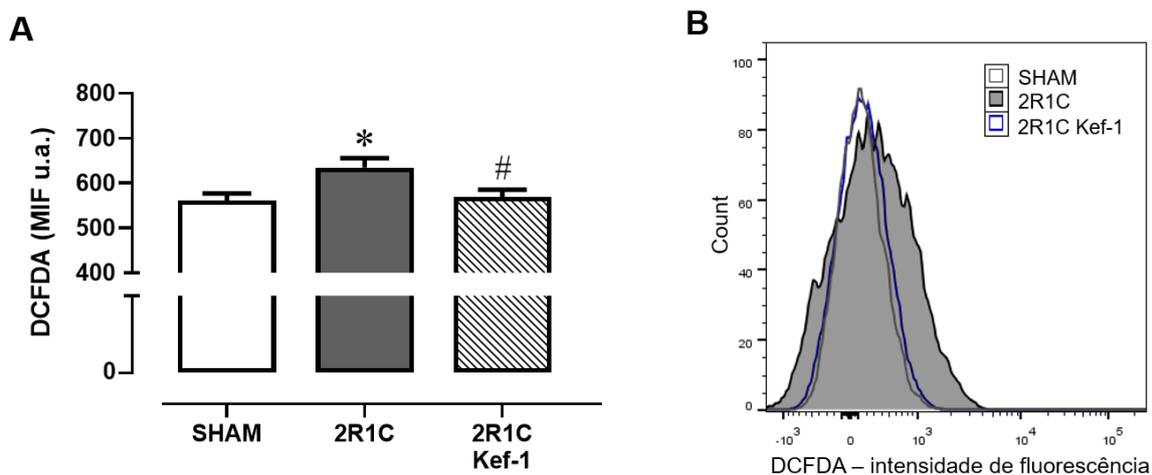
Kef-1 reduziu significativamente a PAS (-22,2 ± 4,0 mmHg), PAD (-31,0 ± 2,6 mmHg) e PAM (-24,3 ± 3,2 mmHg) em comparação com os grupos SHAM e 2R1C (Fig. 14A). Concomitantemente, uma redução significativa (~7%) da FC foi observada no grupo 2R1C Kef-1 (Fig. 14B) comparado com o grupo 2R1C. Esses resultados destacam a ação anti-hipertensiva aguda e crônica do peptídeo Kef-1.



**Figura 14:** As mensurações hemodinâmicas evidenciam que o tratamento crônico (7 dias) com Kef-1 reduz a pressão arterial e a frequência cardíaca no modelo experimental de hipertensão 2R1C. (A) Alterações da PAS, PAD e PAM; (B) Média da frequência cardíaca. PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PAM: pressão arterial média. Os dados são apresentados como média ± EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey); \*p <0,05 vs SHAM; #p <0,05 vs 2R1C.

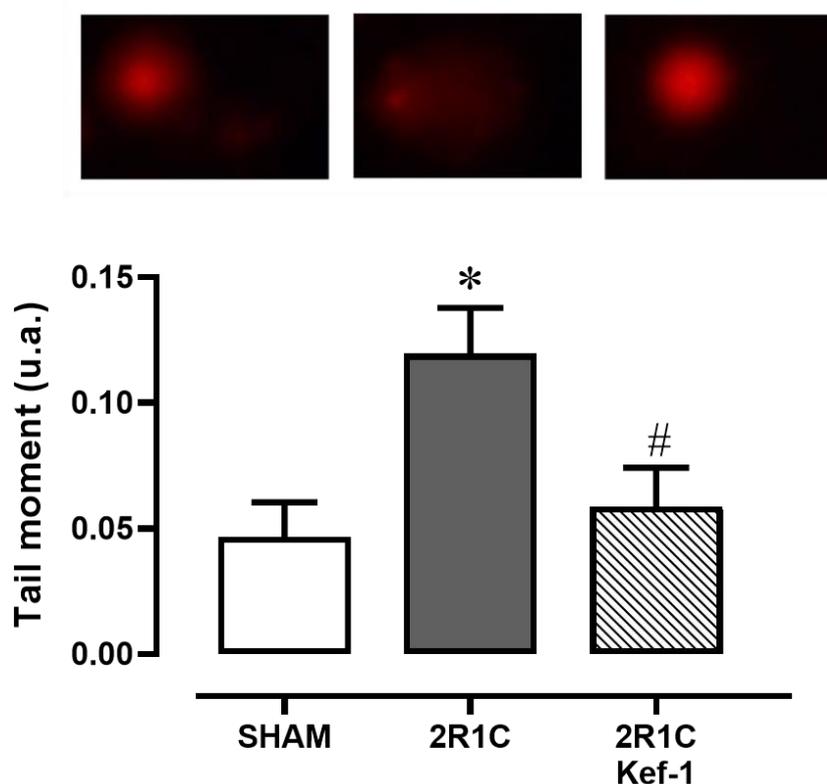
### 5.3. Kef-1 reduz o estresse oxidativo sistêmico em camundongos hipertensos 2R1C

Uma vez que o efeito antioxidante *in vitro* desse peptídeo já é demonstrado na literatura (Há et al., 2015; Tonolo et al., 2018), nós investigamos sua ação sobre o estresse oxidativo sistêmico no modelo hipertensão dependente de Ang II (Fig. 15). A produção de ROS nas células sanguíneas foi determinada pela fluorescência emitida por DCFDA, inferindo os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 15A). Os animais hipertensos apresentaram altos níveis de ROS (13%) comparado com o grupo SHAM, enquanto o tratamento por 7 dias com Kef-1 reduziu (~10%) significativamente esse aumento a níveis semelhantes ao grupo SHAM. Esses achados são representados nos histogramas típicos de intensidade de fluorescência (Fig. 15B). Os animais 2R1C apresentaram um notável desvio para a direita na curva de intensidade de fluorescência. Já os animais 2R1C Kef-1 mostraram uma curva DCF semelhante ao grupo SHAM.



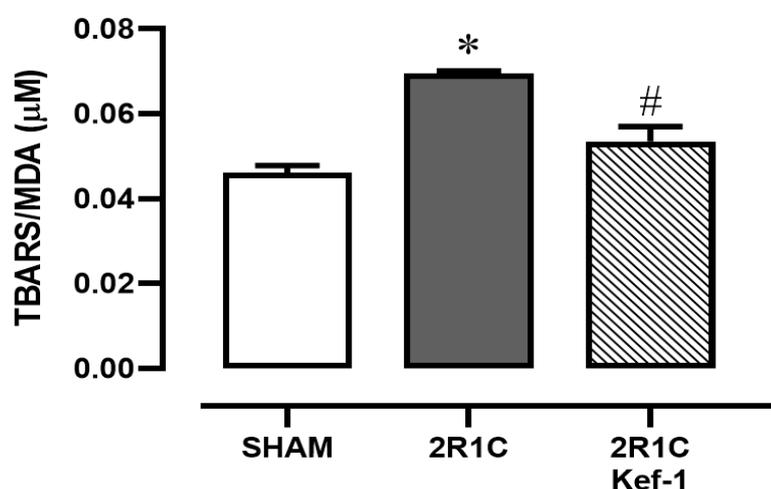
**Figura 15: Kef-1 reduz a produção sistêmica de ROS no modelo experimental de hipertensão 2R1C.** (A) Níveis de DCFDA em células sanguíneas; (B) Histogramas típicos da intensidade de fluorescência de DCFDA. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey); \* $p < 0,05$  vs SHAM; # $p < 0,05$  vs 2R1C.

Com a finalidade de avaliar o efeito de Kef-1 sobre o dano oxidativo ao DNA, foi realizado o ensaio do cometa alcalino nas células sanguíneas (Fig. 16). Nesse ensaio, quanto maior o tamanho da cauda, maior é a fragmentação do DNA. Como observado nas figuras representativas, o grupo de animais hipertensos caracterizou-se por um comprimento da cauda maior que os demais grupos. Quantitativamente, o momento da cauda expressou que o grupo 2R1C apresentou intensidade de fluorescência maior na cauda quando comparado a ambos grupos SHAM e 2R1C Kef-1 (SHAM:  $0,04 \pm 0,01$ , 2R1C:  $0,11 \pm 0,01$ , 2R1C Kef-1:  $0,05 \pm 0,01$  u.a.). Assim, esses dados demonstram que o tratamento com Kef-1 significativamente reduziu (~54%) o dano oxidativo ao DNA em células sanguíneas observado no modelo de hipertensão 2R1C.



**Figura 16: Kef-1 reduz fragmentação de DNA em células sanguíneas no modelo experimental de hipertensão 2R1C.** Imagens representativas do DNA fragmentado (cometa) nos três grupos experimentais com respectivas quantificações do dano (momento da cauda). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA-uma via, teste *post hoc* de Tukey); \* $p < 0,05$  vs SHAM; # $p < 0,05$  vs 2R1C.

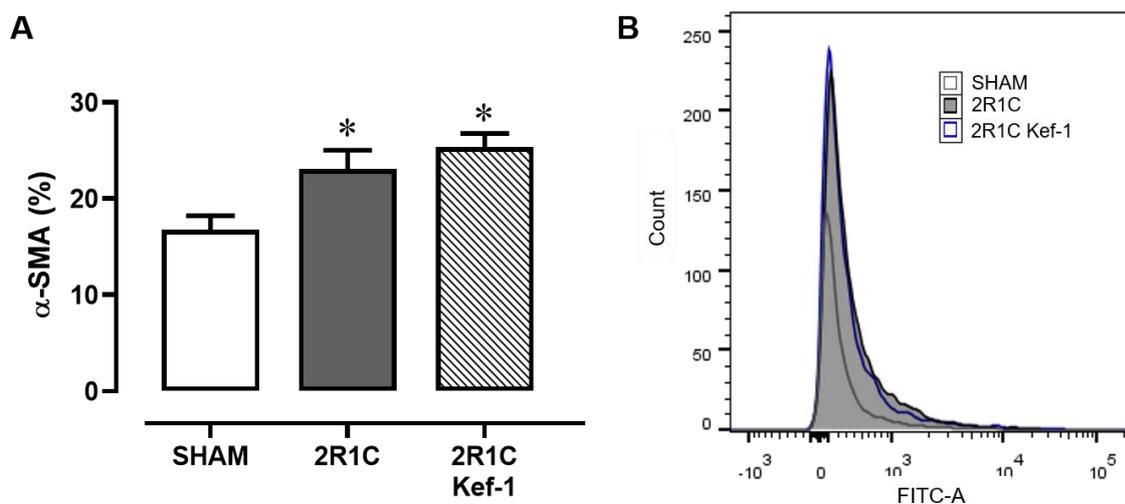
O dano aos lipídeos também foi avaliado utilizando o ensaio TBARS como biomarcador sérico para peroxidação lipídica (Fig. 17). Os animais 2R1C mostraram um aumento (50%) significativo nos níveis de peroxidação lipídica em comparação com os animais SHAM e o tratamento com Kef-1 reduziu (23%) significativamente esses níveis em comparação com o grupo 2R1C. Esse conjunto de achados destacou a atividade antioxidante sistêmica do peptídeo Kef-1 em um modelo de hipertensão dependente de Ang II.



**Figura 17: Kef-1 reduz peroxidação lipídica sistêmica no modelo experimental de hipertensão 2R1C.** Níveis sistêmicos de TBARS/MDA. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey); \* $p < 0,05$  vs SHAM; # $p < 0,05$  vs 2R1C.

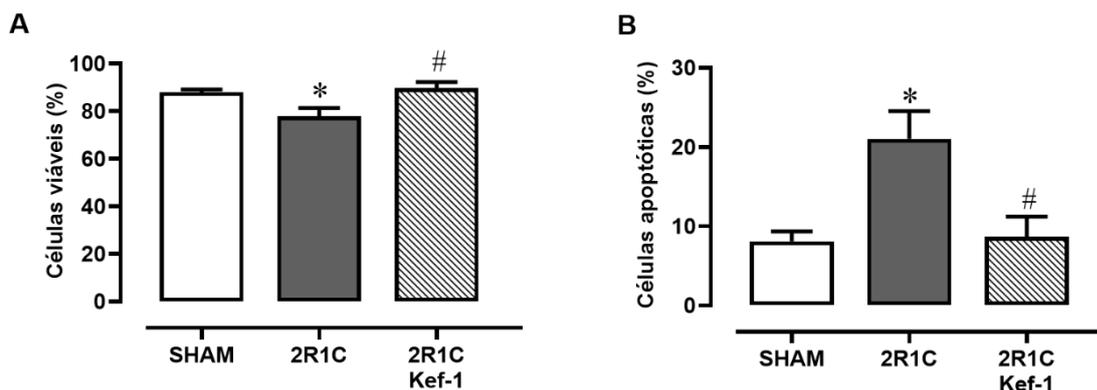
#### 5.4. Efeitos de Kef-1 sobre a viabilidade de células musculares lisas

Na citometria de fluxo, a expressão de  $\alpha$ -SMA confirmou a presença de CML vasculares nas amostras de células isoladas da aorta (Fig. 18). A porcentagem de CML foi significativamente maior no grupo 2R1C (~37%) comparado com o grupo SHAM, enquanto o tratamento com Kef-1 não apresentou significativo efeito sobre esse parâmetro (Fig. 18A e 18B).



**Figura 18: A expressão de  $\alpha$ -SMA foi avaliada por citometria de fluxo para confirmar a presença de CML. (A) Porcentagem de  $\alpha$ -SMA. (B) Sobreposição dos histogramas de fluorescência representativos dos grupos experimentais. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey); \* $p < 0,05$  vs SHAM.**

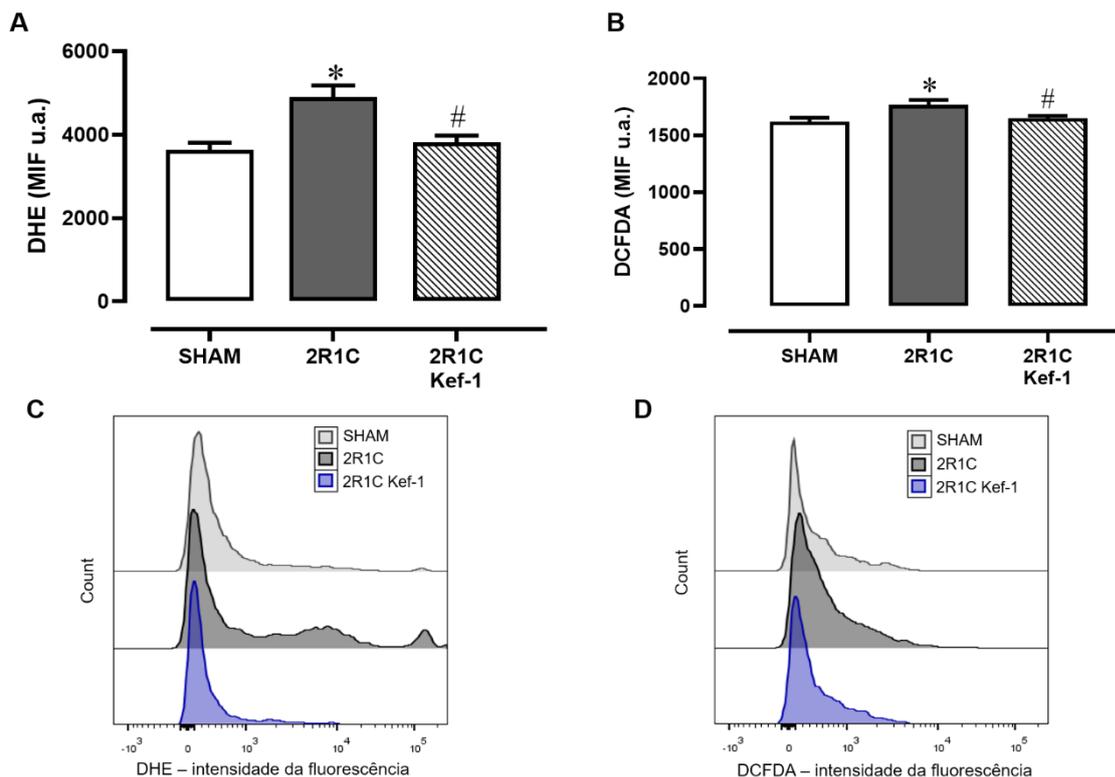
A viabilidade de CML foi determinada nos três grupos experimentais utilizando a marcação com anexina/PI. Observou-se nos animais 2R1C uma significativa redução (~11%) da viabilidade celular (Fig. 19A) e, em paralelo, um aumento (162%) da porcentagem de células apoptóticas (Fig. 19B) quando comparado aos animais SHAM. Por outro lado, esse perfil foi significativamente revertido após tratamento com Kef-1, apresentando maior viabilidade celular (15%) e redução de apoptose celular (59%).



**Figura 19: Kef-1 reduz apoptose de células musculares lisas no modelo experimental de hipertensão 2R1C.** (A) Porcentagem de células viáveis. (B) Porcentagem de células apoptóticas. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey); \* $p < 0,05$  vs SHAM; # $p < 0,05$  vs 2R1C.

### 5.5. Kef-1 reduz o estresse oxidativo em células musculares lisas em camundongos hipertensos 2R1C

Considerando que a hipertensão dependente de Ang II desencadeia estresse oxidativo vascular (Martins-Oliveira et al., 2018), nosso próximo objetivo foi avaliar as ações antioxidantes do Kef-1 nas CML da aorta (Fig. 20). A hipertensão 2R1C foi associada com maior produção de ROS em CML (35% DHE e 9% DCFDA), enquanto Kef-1 exibiu significativo efeito antioxidante (-22% DHE e -6,6% DCFDA) (Figs. 20A e 20B) Esses resultados são expressados nos histogramas típicos de intensidade de fluorescência de DHE (Fig. 20C) e DCFDA (Fig. 20D) que evidenciam maior deslocamento para a direita no grupo 2R1C, indicando que os grupos SHAM e 2R1C Kef-1 apresentaram menor marcação e conseqüentemente menores níveis intracelulares de ROS.

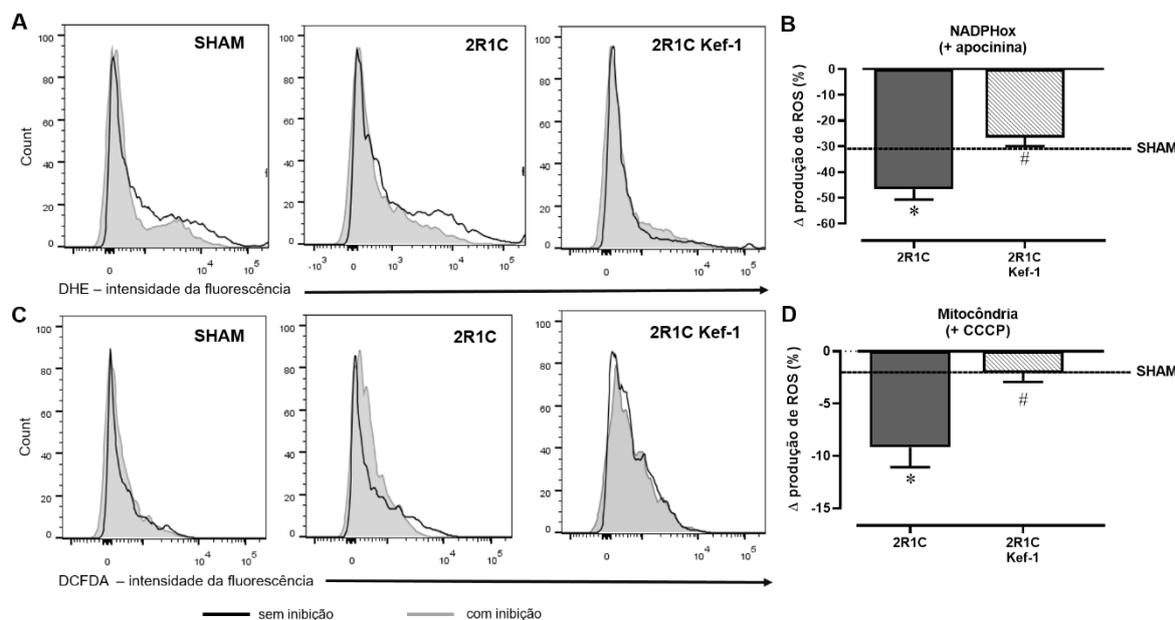


**Figura 20: Kef-1 reduz a produção de ROS nas células musculares lisas no modelo experimental de hipertensão 2R1C.** (A) Níveis de DHE e (B) DCFDA em CML; Histogramas típicos da intensidade de fluorescência de DHE (C) e (D) DCFDA. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey); \* $p < 0,05$  vs SHAM; # $p < 0,05$  vs 2R1C.

### 5.6. Kef-1 reduz a participação das vias pró-oxidantes nas células musculares lisas de camundongos hipertensos 2R1C

Esses resultados levaram a investigar quais prováveis vias que Kef-1 promove seu efeito antioxidante nas CML. Deste modo, avaliamos a participação de NADPHox e mitocôndria, as principais fontes de ROS em DCV. A Figura 19 apresenta os histogramas típicos de intensidade de fluorescência e as variações médias na produção de ROS após a inibição de NADPHox, pela apocinina, (Fig. 21A, 21B) e desacoplamento mitocondrial, por CCCP (Fig. 21C, 21D). Os animais 2R1C exibiram maior queda na produção de ROS após a inibição pela apocinina ( $-46,7 \pm 4,0\%$ ) e CCCP ( $-9,1 \pm 1,8\%$ ) em comparação com o grupo SHAM ( $-31,8 \pm 5,0$ ;  $-2,8 \pm 1,2\%$ , respectivamente). O tratamento com Kef-1 significativamente

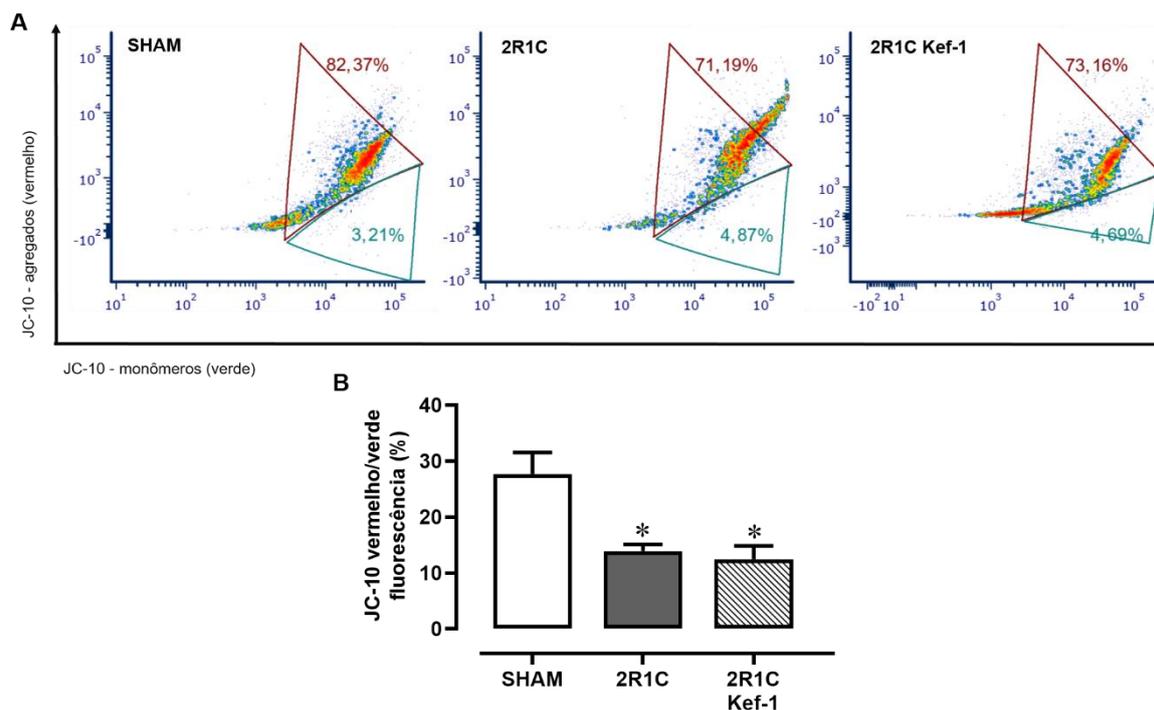
reduziu a produção de ROS após ambas as inibições farmacológicas, evidenciando a redução da participação das vias NADPHox e mitocondriais ( $-26,6 \pm 3,3\%$ ;  $-2,0 \pm 0,8\%$ , respectivamente).



**Figura 21: No modelo experimental de hipertensão 2R1C, a produção de ROS é reduzida nas células musculares lisas após tratamento com Kef-1 pela redução da participação de NADPHox e mitocôndria.** (A) Sobreposição dos histogramas de citometria de fluxo típicos da intensidade de fluorescência de DHE antes e após inibição por apocinina; (B) Variação média da produção de ROS após a inibição por apocinina; (C) Sobreposição dos histogramas de citometria de fluxo típicos da intensidade de fluorescência de DCF antes e após inibição por CCCP; (D) Variação média da produção de ROS após a inibição por CCCP. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey); \* $p < 0,05$  vs SHAM; # $p < 0,05$  vs 2R1C.

### **5.7. Efeitos de Kef-1 sobre o PMM nas células musculares lisas de camundongos hipertensos 2R1C**

Para investigar o mecanismo envolvido na redução da participação mitocondrial após tratamento com Kef-1, avaliamos o MMP com a sonda JC-10 (Fig. 22). Na citometria, o gráfico *dot plot* representativo do grupo SHAM (Fig. 22A) mostrou maior porcentagem de células positivas para a fluorescência vermelha, indicando maior quantidade de agregados e assim, PMM polarizado e integridade da membrana mitocondrial. Por outro lado, a hipertensão 2R1C ocasiona um aumento de células positivas para fluorescência verde (monômeros), apontando redução do PMM e despolarização da membrana mitocondrial. No grupo 2R1C Kef-1 um gráfico *dot plot* de padrão semelhante é apresentado, evidenciando que o tratamento com Kef-1 não foi capaz de atuar sobre a despolarização da membrana mitocondrial. Afirmando essas observações, a Figura 22B apresenta o percentual resultante da proporção de fluorescência de vermelho para verde significativamente menor em ambos os grupos 2R1C e 2R1C Kef-1 comparado com o grupo SHAM.



**Figura 22: Efeito do tratamento com Kef-1 sobre o potencial de membrana mitocondrial nas CML no modelo experimental de hipertensão 2R1C.** (A) Gráficos *dot plot* representativos de citometria de fluxo apresentando a porcentagem de células musculares lisas coradas com o corante JC-10; (B) Avaliação percentual da razão fluorescência vermelha/fluorescência verde. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey). \* $p < 0,05$  vs SHAM.

### 5.8. Kef-1 reduz inflamação sistêmica em camundongos hipertensos 2R1C

A atividade anti-inflamatória *in vivo* de Kef-1 foi avaliada através dos níveis de citocinas circulantes e atividade de MPO, demonstrados na Tabela 4 e figura 23, respectivamente. Em comparação com o grupo SHAM, os níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e MCP-1 foram significativamente mais elevados ( $\sim 1,3x$ ) no grupo 2R1C. Após o tratamento com Kef-1, essas citocinas apresentaram níveis significativamente mais baixos comparado com grupo 2R1C, exceto para IL-6.

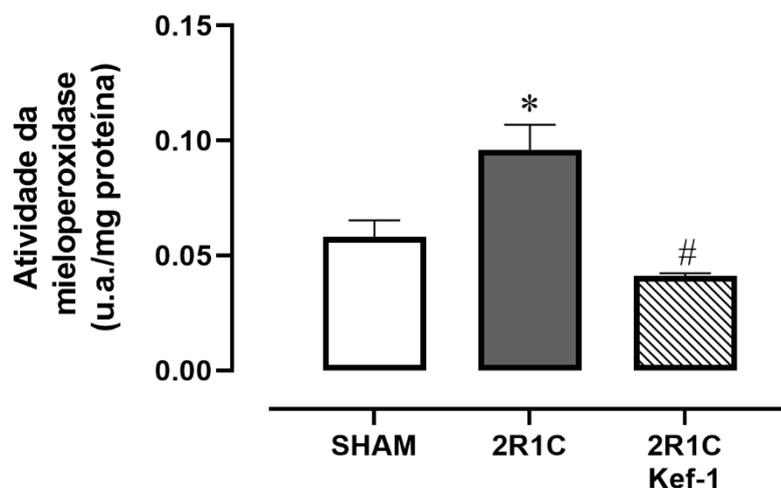
**Tabela 4: Níveis sistêmicos de citocinas inflamatórias no modelo experimental de hipertensão 2R1C.**

PARÂMETROS	SHAM	2R1C	2R1C Kef-1
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	35.5 $\pm$ 3.5	49.07 $\pm$ 4.3*	32.2 $\pm$ 1.6#
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	11.6 $\pm$ 0.5	13.7 $\pm$ 0.4*	10.5 $\pm$ 0.7#
MCP-1 (pg/mL)	166.2 $\pm$ 9.8	220.0 $\pm$ 6.9*	145.2 $\pm$ 9.7#
IL-6 (pg/mL)	14.4 $\pm$ 1.1	17.0 $\pm$ 1.9	15.7 $\pm$ 0.8

Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey). \*p <0,05 vs SHAM; #p <0,05 vs 2R1C.

### **5.9. Kef-1 reduz a atividade sistêmica de mieloperoxidase em células musculares lisas de camundongos hipertensos 2R1C**

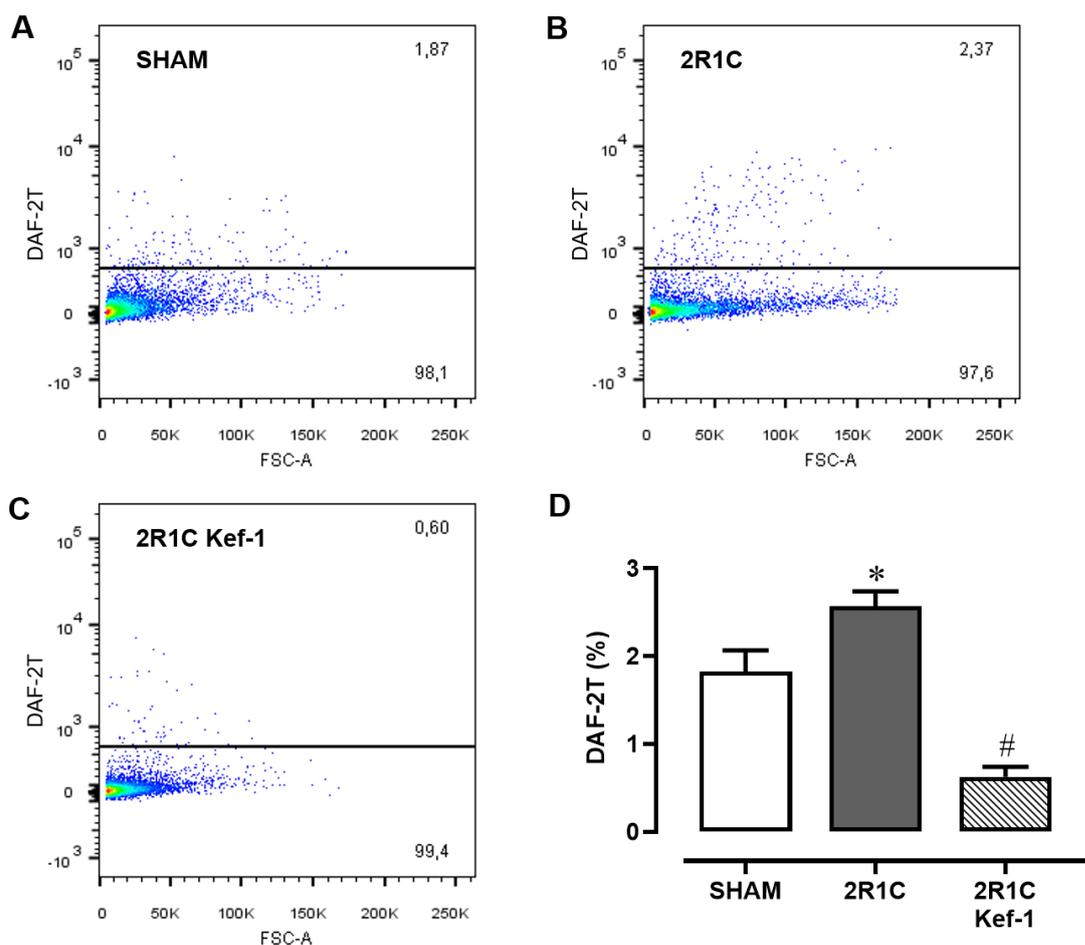
A atividade de MPO (Fig. 23) foi significativamente maior (80%) nos animais do grupo 2R1C comparado com o grupo SHAM, sendo significativamente atenuada (-57%) nos animais que receberam o peptídeo Kef-1. Esses dados revelam a atividade anti-inflamatória do peptídeo Kef-1 no modelo experimental de hipertensão dependente de Ang II.



**Figura 23: Kef-1 reduz atividade sistêmica da mieloperoxidase no modelo experimental de hipertensão 2R1C.** Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey); \* $p < 0,05$  vs SHAM; # $p < 0,05$  vs 2R1C.

#### **5.10. Kef-1 reduz os níveis de NO em células musculares lisas de camundongos hipertensos 2R1C**

Os gráficos *dot plot* representativos dos grupos experimentais (Fig. 24A, 24B e 24C) mostram que no grupo 2R1C há maior porcentagem de células positivas para DAF-2T, ou seja, neste grupo os níveis intracelulares de NO estão maiores que o grupo SHAM. Já no grupo 2R1C Kef-1 esse perfil é alterado, exibindo menor positividade para DAF-2T. No gráfico de barras (Fig. 22D) observamos que porcentagem média de fluorescência de DAF-2T no grupo 2R1C aumentou significativamente em 40% quando comparada a SHAM, enquanto o grupo 2R1C Kef-1 apresentou redução significativa de 75%. Assim, Kef-1 foi capaz de suprimir os níveis aumentados de NO encontrados nas CML na hipertensão dependente de Ang II.

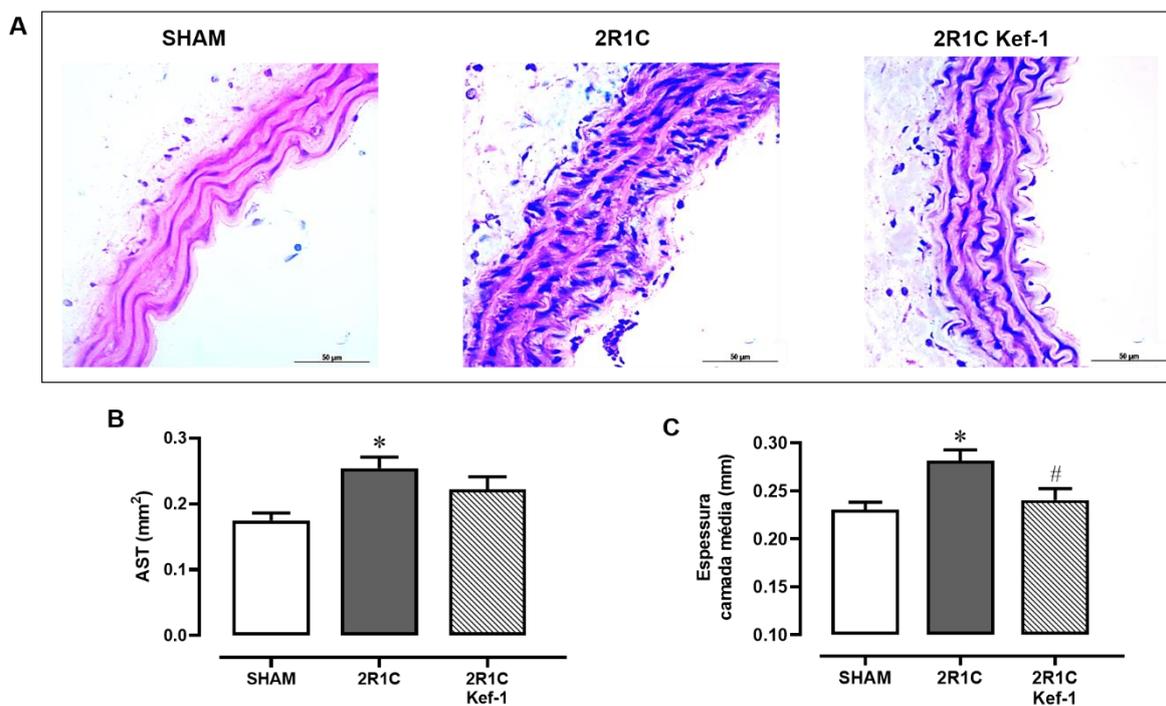


**Figura 24: No modelo experimental de hipertensão 2R1C, Kef-1 reduz o aumento dos níveis sistêmicos de NO. (A), (B), (C) Gráficos *dot plot* típicos de citometria de fluxo apresentando a porcentagem de DAF-2T nos três grupos experimentais, respectivamente; (D) Porcentagem média de DAF-2T. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey). \*p <0,05 vs SHAM; #p <0,05 vs 2R1C.**

### 5.11. Kef-1 atenua espessamento aórtico em camundongos hipertensos 2R1C

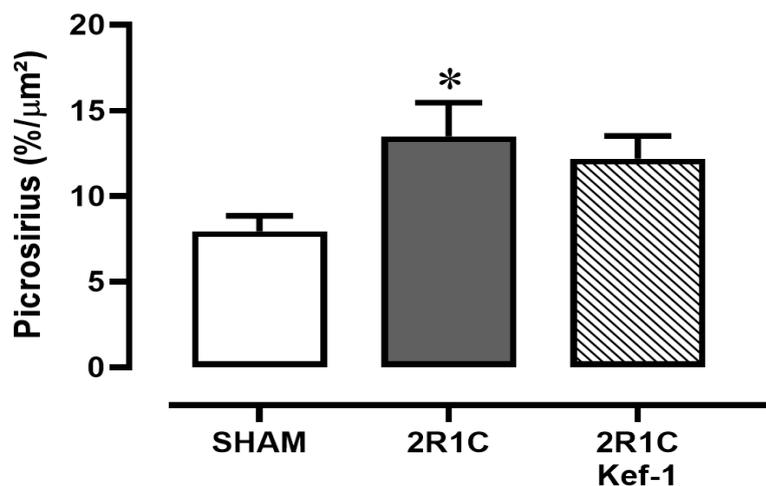
A Figura 25A apresenta fotomicrografias típicas de cortes transversais de arcos aórticos corados com H&E, sendo possível observar que o grupo 2R1C apresentou maior espessura da parede aórtica comparado a ambos grupos SHAM e 2R1C. Quantitativamente, as análises morfométricas mostraram um aumento

significativo da AST (Fig 25B, 47%) e espessura da camada média (Fig 25C, ~22%) nos arcos aórticos dos animais hipertensos. Os animais tratados com Kef-1 apresentaram redução significativa (-14%) da espessura da camada média quando comparado ao grupo 2R1C.



**Figura 25: Kef-1 atenua o espessamento da camada média de arcos aórticos no modelo experimental de hipertensão 2R1C.** (A) Microfotografias típicas de corte transversal de arcos aórticos corados com hematoxilina e eosina (40x, escala: 50µm); (B) Média da área de secção transversa aórtica (AST); (C) Quantificação da espessura da camada média aórtica. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey). \* $p < 0,05$  vs SHAM; # $p < 0,05$  vs 2R1C.

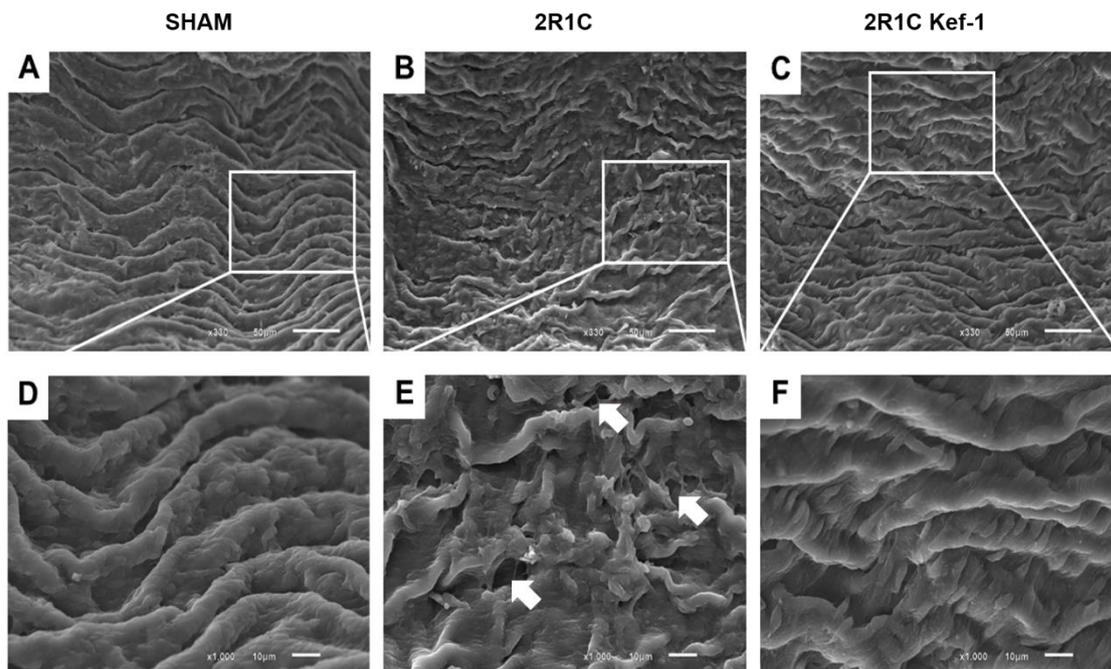
A análise do *picrosirius red* determinou a quantidade de colágeno aórtico nos três grupos experimentais (Fig. 26). O grupo 2K1C apresentou maior deposição de colágeno do que o grupo SHAM, enquanto nenhuma alteração significativa foi observada após o tratamento com Kef-1.



**Figura 26: Efeito de Kef-1 sobre a quantidade de colágeno aórtico no modelo de hipertensão 2R1C.** Quantificação de picrosirius red. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA- uma via, teste *post hoc* de Tukey). \* $p < 0,05$  vs SHAM.

### 5.12. Kef-1 reduz o dano estrutural no endotélio aórtico em camundongos hipertensos 2R1C

A Figura 27 apresenta imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura da camada endotelial aórtica. As Figuras 27A e 27D evidenciam a camada endotelial do grupo SHAM com aspecto confluyente e sem a presença de alterações estruturais. No entanto, o grupo 2R1C caracterizou-se por alterações estruturais importantes com presença de lacunas entre as células, além de uma expressiva e nítida desorganização endotelial (Fig. 27B e 27E). Por outro lado, no grupo tratado com Kef-1, apesar do endotélio levemente desorganizado, não foi observada a presença de gaps entre as células (Fig. 27C e 27F).



**Figura 27: Microscopia eletrônica de varredura da estrutura endotelial da aorta exibindo desorganização celular na hipertensão 2R1C e restauração parcial do dano estrutural após o tratamento com Kef-1. (A), (B), (C) Fotomicrografias representativas da camada endotelial aórtica com ampliação de 330x (escala: 50  $\mu\text{m}$ ); (D), (E), (F) Fotomicrografias representativas da camada endotelial aórtica com ampliação de 1000x (escala: 10  $\mu\text{m}$ ). Seta vermelha: presença de lacunas entre as células.**

## 6. DISCUSSÃO

O consumo de probióticos lácteos tem sido associado com a promoção de diversos benefícios à saúde, como efeitos antihipertensivos, anti-inflamatórios, imunomoduladores, antimicrobianos, antidiabéticos, anticâncer, antioxidantes e antitrombóticos (Grajek et al., 2005; Marcone et al., 2017; Fernandez et al., 2017). O interesse científico e as perspectivas de inserção dos probióticos na rotina alimentar justificam-se pela abundante diversidade de compostos bioativos neles presentes, entre eles os peptídeos, que fortemente contribuem para as propriedades funcionais associadas a estes alimentos (Amorim et al., 2019).

Os peptídeos bioativos podem ser produzidos *in vivo*, por exemplo pela digestão gastrointestinal, e *in vitro* por processos químicos, como aquecimento ou fermentação (Nejati et al., 2020). A proteólise libera peptídeos ou aminoácidos livres criptografados dentro da sequência primária de proteínas maduras, os quais apresentam ações biológicas distintas do seu precursor, sendo denominados “criptídeos”. Uma vez liberados, os produtos da proteólise entram na corrente sanguínea podendo exercer seus efeitos sistêmicos (Adolfsson et al., 2004; Fernandez et al., 2017).

O Kefir representa uma rica fonte de criptídeos, uma vez que a fermentação do leite pela microbiota dos grãos origina peptídeos bioativos responsáveis pelos benefícios da administração deste probiótico. Por efeito desses peptídeos, Kefir demonstrou ser capaz de impactar o sistema metabólico através da melhora da digestão e da tolerância à lactose (Hertzler e Clancy, 2003), da ação anti-hipertensiva (Friques et al. 2015; Klippel et al. 2016) e do controle de glicose e colesterol plasmático (Santanna et al. 2017). Além disso, Kefir demonstrou apresentar efeitos antibacterianos, antivirais e antialérgicos (Rodrigues et al. 2005; Hamida et al. 2021). Esses efeitos são provavelmente devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antiproliferativas (Liu et al., 2005; Ozcan et al. 2019; Lee et al. 2007).

Apesar do conhecimento sobre as múltiplas funcionalidades do Kefir, ainda é raso o entendimento quanto a composição dos peptídeos bioativos formados durante a fermentação do leite e a contribuição destes nos efeitos atribuídos ao probiótico. Portanto, estudos exploratórios que visam a identificação e

caracterização dos fragmentos bioativos são importantes para a compreensão das propriedades funcionais do Kefir. Além disso, essas investigações são necessárias devido à diversidade da composição microbiana que varia de acordo com a origem e aos processos da fermentação (Prado et al., 2015; Rosa et al., 2017).

Neste sentido, um recente estudo do nosso grupo de pesquisa (Amorim et al., 2019) realizou o perfil peptidômico de amostras de um Kefir de composição microbiana previamente caracterizada (Friques et al., 2019) e que possui diversas propriedades descritas, como anti-hipertensiva, antioxidante e anti-inflamatória (Klippel et al., 2016; Monteiro et al., 2020; Friques et al., 2020; Ton et al., 2020). Diante dos fundamentados efeitos anti-hipertensivos relacionados ao Kefir, Amorim e colaboradores (2019) sequenciaram os peptídeos anti-hipertensivos presentes no leite não-fermentado e após a fermentação com os grãos de Kefir. A fermentação resultou no aumento expressivo da diversidade de íons detectados pela técnica MALDI-TOF, ou seja, novos fragmentos proteicos foram liberados, dos quais 35 apresentaram características anti-hipertensivas devido à propriedade inibitória sobre a ECA. Entre os compostos com ação anti-hipertensiva liberados na fermentação láctea, os peptídeos inibitórios da ECA estão em maior quantidade, oriundos majoritariamente da proteólise da caseína pelas bactérias lácticas (Quirós, et al., 2005; Amorim et al., 2019).

O peptídeo AVPYYPQR, liberado da  $\beta$ -caseína, apresentou maior estabilidade nos parâmetros *in silico*, como ótima solubilidade em água e resistência à ação da tripsina, bem como destacou-se pela alta energia de ligação contra a ECA no *docking* molecular (Amorim et al., 2019). Esta última análise revelou ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas entre o peptídeo AVPYYPQR e outros resíduos de aminoácidos importantes nos locais de ligação da ECA. Essas observações indicaram que esse peptídeo poderia possuir uma potente ação *in vivo* contra a ECA.

Além disso, em estudos prévios, alguns ensaios *in vitro* revelaram a propriedade antioxidante atribuída a esse heptapeptídeo (Pihlanto-Leppälä et al., 1998; Rival et al., 2001; Tonolo et al., 2018; Miao et al., 2019). Diante dessas características físico-químicas, AVPYYPQR, denominado neste presente estudo como Kef-1, provavelmente é um dos principais compostos bioativos contribuintes do efeito anti-hipertensivo do Kefir.

O presente trabalho apresenta pela primeira vez as ações biológicas *in vivo* do peptídeo Kef-1, um inibidor da ECA derivado do Kefir, em um modelo experimental de hipertensão dependente de Ang II. Em camundongos hipertensos 2R1C, Kef-1 reduziu, tanto local (CML vasculares) quanto sistemicamente, o estresse oxidativo e inflamação, evidenciando sua potencial ação biológica *in vivo*. Interessantemente, Kef-1 também atenuou o espessamento da parede aórtica e o dano às células endoteliais. A somatória desses efeitos foi repercutida fisiologicamente por uma redução significativa da PA.

Neste estudo, a avaliação *in vitro* revelou uma potente atividade inibitória de Kef-1 sobre a ECA em comparação à inibição por captopril. Esse resultado é amparado pela análise de *docking* molecular demonstrada por Amorim e colaboradores (2019), a qual revelou forte ligação do peptídeo aos sítios catalíticos da ECA. É importante ressaltar que embora um peptídeo exiba uma potente atividade inibitória contra a ECA *in vitro*, isto nem sempre é refletido no seu efeito hipotensor *in vivo*. A ação proteolítica no trato gastrointestinal e características estruturais são os principais fatores que ditam o efeito hipotensor *in vivo* de um determinado peptídeo inibidor da ECA. No nosso estudo, o notável efeito inibitório de Kef-1 sobre a ECA *in vitro* foi reproduzido na expressiva redução da PA e FC de camundongos hipertensos após administração oral desse peptídeo.

O presente estudo explorou um modelo de hipertensão dependente de Ang II (2R1C) para melhor compreensão e caracterização dos efeitos biológicos do peptídeo Kef-1 sobre o SRA. Após estenose parcial da artéria renal esquerda, resultando em imediata hiperativação do SRA, os camundongos exibem aumento dos níveis plasmáticos de Ang II e elevação da PA acompanhada por taquicardia (Wiesel et al., 1997; Campagnaro et al., 2012). Interessantemente, embora os níveis circulantes de Ang II retornem aos valores fisiológicos 28 dias após oclusão renal, a hipertensão é mantida e a atividade do SRA tecidual, como na aorta, permanece elevada desencadeando os efeitos locais não-hemodinâmicos da Ang II (Sharifi et al., 2003; Campagnaro et al., 2012; Campagnaro et al., 2013; Dias et al., 2014). Assim, nos camundongos hipertensos 2R1C, a hipertensão é mantida por um SRA continuamente ativado.

O presente trabalho demonstrou o efeito anti-hipertensivo agudo e crônico de Kef-1, mesmo sob manifestações exacerbadas do SRA no modelo experimental de hipertensão 2R1C. Ainda é inexpressivo o número de trabalhos que realizaram o sequenciamento, isolamento e avaliação *in vivo* de peptídeos bioativos do Kefir de leite (Quirós et al., 2005; Miguel et al., 2010; Amorim et al., 2019). Quirós e colaboradores (2005) sequenciaram o Kefir do leite de cabra e testaram *in vitro* dois peptídeos inibidores da ECA (PYVRYL e LVYPFTGPIP), os quais diferem daqueles identificados por Amorim et al. (2019). Porém, esses autores não caracterizaram a atividade biológica desses fragmentos bioativos isolados. Por outro lado, no estudo de Miguel e colaboradores (2010), o efeito anti-hipertensivo de LVYPFTGPIP foi avaliado em SHR. Esse peptídeo foi capaz de reduzir ambas PAS e PAD em aproximadamente 28 e 24 mmHg, respectivamente, valores que estão em concordância ao encontrados no nosso estudo.

Estudos anteriores com peptídeos inibidores da ECA provenientes de distintos probióticos estão de acordo com nosso estudo, os quais observaram a capacidade inibitória da ECA *in vitro* associada a efeito anti-hipertensivo em animais hipertensos (Yamamoto et al., 1999; del Mar Contreras et al., 2009; Lana et al. 2018). Como exemplo, o dipeptídeo YP derivado do iogurte probiótico (*Lactobacillus helveticus*) apresentou atividade de inibição da ECA *in vitro* e anti-hipertensivo efeito em SHR, reduzindo a PAS em 30 mmHg (Yamamoto et al., 1999).

Outros estudos estão em conformidade com nossos achados, uma vez que mostraram a atividade anti-hipertensiva *in vivo* de peptídeos inibidores da ECA derivados da  $\beta$ -caseína, liberados após a fermentação do leite (Yamamoto et al., 1994; Maeno et al., 1996; Miguel et al., 2010). Em similaridade aos nossos dados, esses trabalhos observaram que a administração oral dos peptídeos resultou em uma redução de 20-40 mmHg dos valores da PAS. Maeno e colaboradores (1996) observaram que o peptídeo KVLPVPQ, derivado da fermentação do leite por *Lactobacillus helveticus* CP790, reduziu a PAS de SHR em aproximadamente 26 mmHg após 4 horas de administração oral, evidenciando valores semelhantes aos apresentados por Kef-1 para a hipertensão experimental do tipo 2R1C.

É importante ressaltar que os estudos citados anteriormente verificaram somente o efeito agudo dos peptídeos sobre os parâmetros pressóricos. De maneira

oposta a maioria desses estudos, não realizamos a avaliação temporal das alterações hemodinâmicas ao longo de 24 horas, fator este que nos limita a concluir os pontos de resposta inicial, máxima e de retorno aos valores basais do peptídeo Kef-1. Por outro lado, além da avaliação a curto-prazo, nosso estudo avaliou o efeito do tratamento crônico com Kef-1 sobre a resposta hemodinâmica, contribuindo desta forma para a melhor compreensão da participação de Kef-1 no efeito anti-hipertensivo observado no consumo do Kefir.

Ensaio clínico destacam a contribuição dos peptídeos derivados do leite na redução da PA pela inibição da ECA (Hirota et al., 2007; Ishida et al., 2011; Nakamura et al., 2011). Em um ensaio clínico randomizado realizado por Ishida e colaboradores (2011), 48 indivíduos com hipertensão leve apresentaram atenuação significativa da PAS após suplementação terapêutica com peptídeos inibidores da ECA (VPP e IPP).

Como já mencionado, a maioria dos peptídeos identificados no Kefir exibem atividades anti-hipertensiva e inibitória da ECA (Quirós et al., 2005; Amorim et al., 2019). De fato, a inibição sobre a ECA *in vitro* foi detectada no Kefir (Quirós et al., 2005), e em animais hipertensos tratados com esse probiótico (Frigues et al., 2015; Klippel et al., 2016; Amorim et al., 2019; Monteiro et al., 2020). Estes apresentaram redução dos níveis circulantes de ECA e Ang II, e redução da pressão arterial. A atividade inibitória da ECA em diferentes probióticos lácteos foi previamente estudada, incluindo algumas variedades de queijo (Saito et al., 2000; Ong et al., 2007), leite fermentado com distintas cepas bacterianas (Papadimitriou et al., 2007; Moslehishad et al., 2013) e iogurtes (Yamamoto et al., 1999).

Adicionalmente, as características estruturais, no que se refere a composição e sequência de aminoácidos, podem influenciar na afinidade e capacidade de um peptídeo inibir a ECA e exercer seu efeito hipotensor (de Oliveira et al., 2018). Estudos comprovam que um peptídeo com potente ação inibitória da ECA exibe um aminoácido positivamente carregado na porção C-terminal, ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas com os aminoácidos A, T e V, características moleculares presentes no Kef-1 (de Oliveira et al., 2018; Amorim et al., 2019). Portanto, a estrutura química de Kef-1 é um dos fatores determinantes e potencializadores de sua capacidade inibitória sobre a ECA com concomitante ação hipotensiva.

Visto que a administração de kefir ou mesmo do peptídeo aqui utilizado é por via oral, a boa biodisponibilidade intestinal de Kef-1, previamente relatada (Tu et al., 2018; Tonolo et al., 2018), pode ser outro fator determinante de sua atividade biológica evidenciada no presente estudo. O ensaio de digestão de tripsina *in vitro* mostrou que esse peptídeo resistiu à digestão da tripsina, inferindo, portanto, preservação da estabilidade na passagem pelo intestino delgado (Tu et al., 2018). As células epiteliais intestinais humanas (células Caco-2) têm sido utilizadas como um modelo *in vitro* para avaliação da absorção intestinal de compostos bioativos. Tonolo e colaboradores (2018) observaram que o peptídeo Kef-1 atravessou a monocamada de células Caco-2, indicando que este pode ser facilmente absorvido por células epiteliais intestinais humanas. Portanto, essas características garantem ao peptídeo Kef-1 uma ótima biodisponibilidade que impacta nos seus efeitos fisiológicos.

É válido destacar, que a liberação de novos peptídeos inibidores da ECA progride no trato gastrointestinal pela ação das bactérias lácticas e proteases (de Oliveira et al., 2028). Ustun-Aytekin e colaboradores (2020) mostraram que a atividade inibitória da ECA foi aumentada consideravelmente em amostras de Kefir submetidas a estimulação de digestão gastrointestinal *in vitro*, evidenciando o aumento do número de moléculas bioativas e conseqüentemente maiores efeitos biológicos. Esses fatos confirmam a presença de inibidores da ECA neste probiótico e sustentam a hipótese de que esses peptídeos podem exercer, de fato, importante contribuição nos efeitos anti-hipertensivos atribuídos ao seu consumo (Friques et al., 2015; Klippel et al., 2016; Izquierdo-Gonzalez et al., 2019; Monteiro et al., 2020).

Quanto à capacidade antioxidante *in vivo* de Kef-1, demonstramos uma redução na produção sistêmica e local (CML vasculares) de ROS com conseqüente atenuação do dano ao DNA, peroxidação lipídica e apoptose. Esses dados corroboram estudos anteriores demonstrando que o Kefir reduziu a peroxidação lipídica e radicais livres DPPH em ensaios *in vitro* (Liu et al., 2005), e outros demonstram que diminuiu o estresse oxidativo sistêmico e local, genotoxicidade e apoptose em modelos experimentais de hipertensão (Friques et al., 2015; Klippel et al., 2016; Monteiro et al., 2020). De fato, o consumo de outras fontes probióticas lácteas, como os iogurtes (Ejtahed et al. 2012; Yoon et al. 2019), tem sido associado

com efeito antioxidante. Sugere-se que os peptídeos liberados a partir da proteína do leite são os principais contribuintes dos efeitos antioxidantes observados no consumo desses produtos (Liu et al., 2005; Shazly et al., 2019; Tonolo et al., 2020).

A capacidade antioxidante *in vitro* de Kef-1 foi demonstrada anteriormente por outros (Rival et al., 2001; Há et al., 2015; Tonolo et al., 2018; Tonolo et al., 2020), que também apoiam nossos resultados *in vivo*. Tonolo e colaboradores (2008) descreveram a atividade antioxidante *in vivo* de peptídeos sintéticos derivados de  $\beta$ -caseína, entre eles Kef-1, e k-caseína bovina. Esses peptídeos preservaram a viabilidade em linhagens de células expostas a agentes oxidantes, indicando o papel na redução do estresse oxidativo através da preservação de grupos sulfidríla que exercem efeitos contra a redução de enzimas antioxidantes (Tonolo et al. 2018). Além disso, foi demonstrado que o pré-tratamento com Kef-1 evitou a peroxidação lipídica *in vitro* (Tonolo et al., 2020). Outro estudou observou que Kef-1 exibiu expressiva capacidade de eliminação de radicais livres DPPH (Ha et al., 2015). Essas evidências sugerem Kef-1 como um agente antioxidante “scavenger”, ou seja, atua como um neutralizador de radicais livres. Além disso, corroborando com nossos achados, tem sido demonstrado que os peptídeos derivados da caseína também desempenham sua atividade antioxidante pela eliminação dos radicais livres ( $\cdot O_2$ - e hidroxila) e pela inibição da peroxidação lipídica (Suetsuna et al., 2000; Rival et al. 2001; Sah et al., 2018).

Assim como Kef-1, diversos peptídeos inibidores da ECA derivados da caseína apresentam efeito antioxidante, sugerindo a multifuncionalidade desses compostos (Hérendez-Ledesma et al., 2005; del MarContreras et al., 2009). O estudo de del MarContreras e colaboradores (2009) aponta que a eliminação de radicais livres foi um dos mecanismos responsáveis pela redução da PA em SHR após administração oral de RYLGY e AYFYPEL, os quais também possuem potente atividade inibitória da ECA.

As características estruturais podem fortemente determinar a capacidade antioxidante *in vivo* observada em Kef-1. Os peptídeos derivados do leite que exibem atividade antioxidante normalmente contêm 5 a 11 aminoácidos, incluindo aminoácidos hidrofóbicos, como P, histidina ou W (Sah et al. 2018). A presença dos aminoácidos P e Y observada neste heptapeptídeo, já é estabelecido ser fortemente

associada ao potencial antioxidante de um peptídeo bioativo (Shahidi & Zhong, 2010; Wu et al., 2012; Shazly et al., 2018). Além disso, o aminoácido glutamina (Q) presente na penúltima posição pode atuar como um resíduo redox ativo (Bamdad et al., 2017). Diversos peptídeos fragmentados da  $\beta$ -caseína apresentam em sua estrutura esses componentes e são descritos como potentes antioxidantes (Hayes et al., 2007; Bamdad et al., 2017; Taha et al., 2017; Neto et al., 2019).

A hiperatividade do SRA é uma importante moduladora da ativação da NADPHox e, por sua vez, do aumento de ROS na vasculatura (Landmesser et al., 2002; Ceron et al., 2012; Maneesai et al., 2017). O presente trabalho demonstrou que Kef-1 neutraliza os processos oxidativos nas CML, sugerindo que esse peptídeo derivado do Kefir desempenha um importante papel antioxidante na hipertensão. Os mecanismos pelos quais Kef-1 reduziu estresse oxidativo nas CML podem ser especulados.

Demonstramos que a participação da NADPHox foi notoriamente reduzida por Kef-1, sugerindo a atenuação da contribuição da Ang II-AT1 nesta via. De maneira semelhante, estudos relatam que os efeitos benéficos das terapias anti-hipertensivas supressoras do SRA, como os bloqueadores do receptor AT1 e inibidores da ECA, são em parte mediados pela diminuição do estresse oxidativo vascular atribuída à redução da atividade da NADPHox (Ghiadoni et al., 2003; Yoshida et al., 2004; Montezano e Touys, 2014). Em concordância com nossos achados, um recente trabalho mostrou que o consumo de Kefir resulta em redução de ROS e da participação de NADPHox nas células da aorta de ratos com hipertensão dependente de angiotensina, sugerindo uma relevante contribuição dos peptídeos inibidores da ECA, como o Kef-1, no eixo Ang II- AT1/NADPHox (Monteiro et al., 2020).

As CML vasculares de camundongos hipertensos exibiram maior síntese de ROS mitocondrial em associação à redução do potencial de membrana (despolarização) da mitocôndria. Inúmeras evidências ajudam a compreender esses achados. Dados a partir do estudo realizado por Kimura e colaboradores (2005) indicam que Ang II estimula a produção de ROS mitocondrial nas células do músculo liso vascular e na aorta de ratos. Além disso, em linhagem de CML vasculares, Ang II induziu o aumento da expressão de NADPHox e dano ao DNA (Wosniak et al.,

2009). Essas alterações podem ser resultantes da interação *crosstalk* entre o NADPHox e a mitocôndria (Dikalov, 2011; Daiber et al., 2017).

Na hipertensão, os altos níveis citoplasmáticos de ROS, estimulados pela NADPHox, produzem danos de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios mitocondriais, acarretando, em um ciclo vicioso, despolarização do potencial de membrana, liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial no citosol e dano celular (Garlid et al., 2003; Andrukhiv et al., 2006; de Cavanagh et al., 2006). Além disso, evidências anteriores sustentam que a interação da Ang II nos receptores AT1 acoplados à membrana mitocondrial pode ser parcialmente responsável pela produção de ROS (Valenzuela et al., 2016; Friederich-Persson e Persson, 2020). De maneira interessante, os animais tratados com Kef-1 apresentaram menor participação da fonte mitocondrial para produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que justificamos ser atribuída a um menor estímulo via NADPHox/ROS e receptores mitocondriais AT1.

Tem sido demonstrado que a atenuação do SRA pelos inibidores da ECA é também associada com redução de disfunção mitocondrial (de Cavanagh et al., 2003; de Cavanagh et al., 2005; Piotrkowski et al., 2007). No entanto, a redução da participação mitocondrial para a produção de ROS não coincidiu com reversão ou prevenção do potencial de membrana presente na hipertensão 2R1C, sugerindo que a redução de ROS por Kef-1 não necessariamente restaura o desacoplamento mitocondrial. Apesar disso, de maneira conjunta, essas evidências sustentam nossos dados, sugerindo o importante papel antioxidante do Kef-1 *in vivo* mediando parte dos efeitos benéficos atribuídos aos peptídeos inibidores da ECA presentes no Kefir.

Ang II modula a inflamação através da ativação de receptores AT1 nas células imunes, estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Ruiz-Ortega et al., 2002; Wenzel et al., 2002), e promove o recrutamento e a adesão de leucócitos na parede da artéria (Piqueras et al., 2000; Alvarez et al., 2004). Corroborando trabalhos anteriores (Bivol et al., 2008; Nussbaum et al., 2013; Pereira et al., 2020), no presente estudo os camundongos hipertensos exibiram níveis aumentados de citocinas circulantes pró-inflamatórias e alta atividade de MPO. Nesse sentido, estudos comprovam que inibidores da ECA são capazes de modular a redução de citocinas na hipertensão renovascular (Li et al., 2014), fato que está de acordo

nossos achados de redução da inflamação sistêmica após administração crônica de Kef-1. A caseína do leite é uma rica fonte de peptídeos com propriedade anti-inflamatória (Chakrabarti et al., 2014) e os tripeptídeos VPP e IPP, derivados da fermentação bacteriana da caseína, demonstraram efeitos inibitórios sobre a ECA e também são capazes de suprimir mecanismos pró-hipertensivos e pró-inflamatórios associados à hipertensão (Hirota et al., 2011). Desta forma, também é possível sugerir que a atenuação do SRA pelos peptídeos inibidores da ECA presentes no Kefir é um importante mediador da redução de processo inflamatório na hipertensão.

As ROS produzidas pela via Ang II-AT<sub>1</sub>-NADPHox estimulam cascatas de transdução de sinal sensíveis ao estresse oxidativo, como o NFκB, importante iniciador das vias de inflamação intracelular e remodelamento vascular induzidos por Ang II (Ruiz-Ortega et al., 2000; Guo et al., 2011). Considerando o sinergismo entre inflamação e estresse oxidativo (Crowley, 2014), sugerimos que o efeito anti-inflamatório do Kef-1 pode ser mediado, em parte, por sua ação antioxidante. Embasando nossa hipótese, estudos mostraram que na hipertensão a inibição de NFκB reduziu a expressão de IL-6 e MCP-1 e melhorou o dano vascular (Brasier et al., 2002; Theuer et al., 2002; Jiang et al., 2004). Além disso, o tratamento com inibidores da ECA reduziu a atividade de NFκB, prevenindo a inflamação vascular (Miguel-Carrasco et al., 2010; Kim et al., 2011).

A enzima MPO é um importante biomarcador de inflamação e estresse oxidativo em leucócitos, formando um composto altamente oxidante (Nussbaum et al., 2013) associado ao dano tecidual em DCV (Cheng et al., 2019). Diante disso, é possível, portanto, que Kef-1 diminuiu o estresse oxidativo por meio de mecanismos dependentes de inflamação, reduzindo o recrutamento de células imunes e atenuando a hiperatividade do SRA.

Foi observado nas CML de camundongos hipertensos 2R1C um aumento dos níveis de NO, provavelmente derivado da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que está aumentada em condições inflamatórias, como na hipertensão (Tiradentes et al., 2015; Santuzzi et al., 2015; Kumral et al., 2016). Os altos níveis de NO derivado de iNOS estão associados à proliferação de CML aórticas (Sigala et al., 2005) e aumento do estresse oxidativo resultante da reação entre NO e  $\cdot\text{O}_2$  produzindo peroxinitrito ( $\cdot\text{ONOO}\cdot$ ) (Mungrue et al., 2002). Uma vez que Ang II via

NFκB intensifica a liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativa MCP-1, levando à ativação de iNOS, propomos que esse mecanismo poderia ser responsável pela redução da produção de NO exibida após tratamento com Kef-1 (Alvarez et al., 2008; Takahashi et al., 2008; Sun et al., 2009).

Diante dessas considerações, é provável que as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do Kefir associadas a seu efeito anti-hipertensivo (Monteiro et al., 2020; Friques et al., 2020; Friques et al., 2015) sejam fortemente relacionadas às ações de seus peptídeos bioativos inibidores da ECA, como o Kef-1. Além disso, esses resultados sugerem que é necessária uma avaliação mais detalhada das propriedades anti-inflamatórias de Kef-1.

O modelo experimental de hipertensão 2R1C também é marcado por remodelamento hipertrófico (positivo) dos vasos de condutância incitado pelo SRA. A aorta dos animais hipertensos 2R1C apresenta-se com redução da complacência e espessamento da parede, devido a um aumento na espessura da íntima-média, característica esta observada neste estudo (Nogueira et al., 2007; Castro et al., 2008; Guimarães et al., 2015; Natalin et al., 2016). Já é estabelecido que Ang II induz hipertrofia e hiperplasia de CML vasculares, expressado pelo aumento de  $\alpha$ -SMA e da espessura da camada média (Yoshida et al., 2004; Mondaca-Ruff et al., 2019). Em concordância com essas evidências, mostramos que as aortas dos camundongos 2R1C exibiram hiperplasia das CML manifestada por aumento da quantidade de células expressando  $\alpha$ -SMA e espessamento da camada muscular.

Interessantemente, alguns autores sugerem que o aumento de apoptose de CML da aorta, também observada neste trabalho, poderia ser um mecanismo adaptativo contra a hipertrofia celular durante a hipertensão (Sharifi et al., 1997; Devlin et al., 2000). Essas alterações vasculares podem ser, em parte, mediadas pela via Ang II-AT1/NADPHox nas CML, levando à ativação excessiva de fatores de transcrição para proliferação, migração e hipertrofia (Luchtefeld et al., 2005; Ceron et al., 2012; Brown et al., 2018). Por conseguinte, a atenuação do SRA por Kef-1 possivelmente contribuiu para redução do espessamento da camada média muscular na aorta e também da apoptose celular.

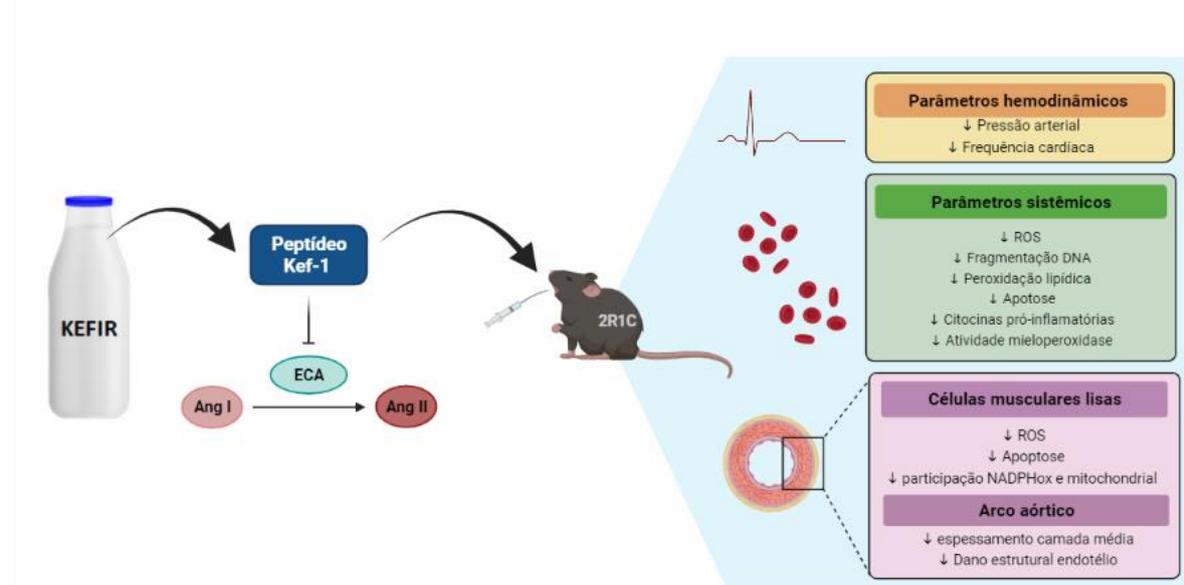
Estudos anteriores revelam que a supressão do SRA por inibidores da ECA tem efeitos benéficos no remodelamento de artérias de condutância e resistência

(Schiffrin e Deng, 1995; Agabiti-Rosei et al., 2009). Além disso, apoiando nossos achados, foi observado que o tratamento com Kefir e outros produtos fermentados propiciou além do efeito anti-hipertensivo direto, também a redução de apoptose celular e atenuação de alterações estruturais vasculares e cardíacas (Lin et al., 2013; Yap et al., 2016; Brasil et al., 2018; Monteiro et al., 2020). Entretanto, apesar do tratamento por apenas 7 dias com Kef-1 ter atenuado o espessamento aórtico, provavelmente devido à supressão do SRA local, este mesmo período não refletiu em redução significativa na proliferação de CML, AST e deposição de colágeno, sugerindo que um tratamento mais longo poderia ser necessário para alterações vasculares significativas.

A análise por MEV revelou que o peptídeo Kef-1 diminuiu o aspecto de dano à superfície endotelial da aorta de camundongos 2R1C. Validando esse achado, estudos anteriores mostraram que a administração de Kefir suprimiu a disfunção endotelial e os danos em animais hipertensos através da redução de ROS com um aumento concomitante da biodisponibilidade de NO (Klippel et al., 2016; Brasil et al., 2018; Monteiro et al., 2020). Além disso, o tratamento com diferentes produtos fermentados do leite preveniu a disfunção endotelial em artérias de ratos hipertensos (Jakala et al., 2009; Jakala et al., 2010). O aumento da produção de  $\cdot\text{O}_2^-$ : diminui a biodisponibilidade de NO originado por NOS endotelial, resultando em disfunção (Hirota et al., 2007). Foi demonstrado que os peptídeos anti-hipertensivos derivados da caseína melhoram a função endotelial e causam vasodilatação por redução de ROS e aumento de NO (Hirota et al., 2007; Aihara et al., 2009), mecanismo este provável de Kef-1. Além disso, o aumento dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias durante a hipertensão também pode contribuir para a disfunção endotelial e propiciar a adesão de leucócitos nos vasos, resultando no remodelamento vascular (Touys, 2004; Garrido e Griending, 2009). Portanto, os peptídeos que atuam como moduladores inflamatórios (Aihara et al., 2009; Nakamura et al., 2013), entre eles Kef-1, podem melhorar as alterações vasculares na hipertensão. Diante disto, por atuarem como antioxidantes e anti-inflamatórios, esses peptídeos desempenham um papel crucial para melhorar a biodisponibilidade do NO e, conseqüentemente, modular a função endotelial e a PA.

## 7. CONCLUSÃO

Em resumo, este estudo revelou o potencial anti-hipertensivo do heptapeptídeo Kef-1, um inibidor da ECA derivado do Kefir, provavelmente associado à suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias em um modelo experimental de hipertensão dependente de Ang II (Fig. 28). Em conjunto, os dados sugerem uma multifuncionalidade do peptídeo Kef-1 e apontam seu potencial papel mediador dos efeitos benéficos do Kefir na hipertensão. Estas novas descobertas ajudam a esclarecer os mecanismos envolvidos nos benefícios do consumo do probiótico Kefir na hipertensão. Além disso, este trabalho destaca a importância da utilização de alimentos funcionais, os quais são fontes de peptídeos bioativos inibidores da ECA, como uma estratégia adjuvante, não farmacológica, e sem efeitos colaterais no tratamento da hipertensão e DCV.



**Figura 28:** Resumo das ações biológicas sistêmicas e locais do peptídeo Kef-1 no modelo experimental de hipertensão dependente de angiotensina. Figura de autoria própria.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adolfsson O, Meydani SN, Russell RM. Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr.* 2004 Aug;80(2):245-56. doi: 10.1093/ajcn/80.2.245. PMID: 15277142.

Agabiti-Rosei E, Heagerty AM, Rizzoni D. Effects of antihypertensive treatment on small artery remodelling. *J Hypertens.* 2009 Jun;27(6):1107-14. doi: 10.1097/HJH.0b013e328329272e. PMID: 19293726.

Ahmed Z, Wang Y, Ahmad A, Khan ST, Nisa M, Ahmad H, Afreen A. Kefir and health: a contemporary perspective. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(5):422-34. doi: 10.1080/10408398.2010.540360. PMID: 23391011.

Ahtesh FB, Stojanovska L, Apostolopoulos V. Anti-hypertensive peptides released from milk proteins by probiotics. *Maturitas.* 2018 Sep;115:103-109. doi: 10.1016/j.maturitas.2018.06.016. Epub 2018 Jul 6. PMID: 30049341.

Aihara K, Ishii H, Yoshida M. Casein-derived tripeptide, Val-Pro-Pro (VPP), modulates monocyte adhesion to vascular endothelium. *J Atheroscler Thromb.* 2009 Oct;16(5):594-603. doi: 10.5551/jat.729. PMID: 19907102.

Alves MF, Araujo MC, Juliano MA, Oliveira EM, Krieger JE, Casarini DE, Juliano L, Carmona AK. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Jun;38(6):861-8. doi: 10.1590/s0100-879x2005000600007. Epub 2005 Jun 1. PMID: 15933779.

Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaices M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol.* 2008 Mar;153(5):926-35. doi: 10.1038/sj.bjp.0707575. Epub 2007 Nov 12. PMID: 17994107; PMCID: PMC2267276.

Amann B, Tinzmann R, Angelkort B. ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1. *Diabetes Care.* 2003 Aug;26(8):2421-5. doi: 10.2337/diacare.26.8.2421. PMID: 12882873.

Amorim FG, Coitinho LB, Dias AT, Friques AGF, Monteiro BL, Rezende LCD, Pereira TMC, Campagnaro BP, De Pauw E, Vasquez EC, Quinton L. Identification

of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. *Food Chem.* 2019 Jun 1;282:109-119. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.010. Epub 2019 Jan 8. PMID: 30711094.

Andrukhiv A, Costa AD, West IC, Garlid KD. Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Nov;291(5):H2067-74. doi: 10.1152/ajpheart.00272.2006. Epub 2006 Jun 23. PMID: 16798828.

Bamdad F, Shin SH, Suh JW, Nimalaratne C, Sunwoo H. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Casein Hydrolysate Produced Using High Hydrostatic Pressure Combined with Proteolytic Enzymes. *Molecules.* 2017 Apr 10;22(4):609. doi: 10.3390/molecules22040609. PMID: 28394279; PMCID: PMC6154324.

Beevers G, Lip GY, O'Brien E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ.* 2001 Apr 14;322(7291):912-6. doi: 10.1136/bmj.322.7291.912. PMID: 11302910; PMCID: PMC1120075.

Beenakker, J. W. M., Ashcroft, B. A., Lindeman, J. H., & Oosterkamp, T. H. (2012). Mechanical properties of the extracellular matrix of the aorta studied by enzymatic treatments. *Biophysical journal*, 102(8), 1731-1737.

Bivol LM, Berge RK, Iversen BM. Tetradecylthioacetic acid prevents the inflammatory response in two-kidney, one-clip hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 Feb;294(2):R438-47. doi: 10.1152/ajpregu.00590.2007. Epub 2007 Nov 21. PMID: 18032469.

Bourrie BC, Willing BP, Cotter PD. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Front Microbiol.* 2016 May 4;7:647. doi: 10.3389/fmicb.2016.00647. PMID: 27199969; PMCID: PMC4854945.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999. PMID: 942051.

Brasier AR, Recinos A 3rd, Eledrisi MS. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Aug 1;22(8):1257-66. doi: 10.1161/01.atv.0000021412.56621.a2. PMID: 12171785.

Brasil GA, Silva-Cutini MA, Moraes FSA, Pereira TMC, Vasquez EC, Lenz D, Bissoli NS, Endringer DC, de Lima EM, Biancardi VC, Maia JF, de Andrade TU. The benefits of soluble non-bacterial fraction of kefir on blood pressure and cardiac hypertrophy in hypertensive rats are mediated by an increase in baroreflex sensitivity and decrease in angiotensin-converting enzyme activity. *Nutrition*. 2018 Jul-Aug;51-52:66-72. doi: 10.1016/j.nut.2017.12.007. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29605766.

Brown IAM, Diederich L, Good ME, DeLalio LJ, Murphy SA, Cortese-Krott MM, Hall JL, Le TH, Isakson BE. Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 Sep;38(9):1969-1985. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311229. PMID: 30354262; PMCID: PMC6205219.

Burnier M, Egan BM. Adherence in Hypertension. *Circ Res*. 2019 Mar 29;124(7):1124-1140. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313220. PMID: 30920917.

Campagnaro BP, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC. Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular Angiotensin-dependent hypertensive mouse. *Int J Hypertens*. 2012;2012:968123. doi: 10.1155/2012/968123. Epub 2012 Nov 5. PMID: 23193440; PMCID: PMC3502004.

Campagnaro BP, Tonini CL, Nogueira BV, Casarini DE, Vasquez EC, Meyrelles SS. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from Angiotensin-dependent hypertensive mice. *Int J Hypertens*. 2013;2013:305202. doi: 10.1155/2013/305202. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23476745; PMCID: PMC3586517.

Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis*. 2008 Jun;198(2):320-31. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.10.011. Epub 2007 Dec 3. PMID: 18054360.

Ceron CS, Rizzi E, Guimaraes DA, Martins-Oliveira A, Cau SB, Ramos J, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension. *Matrix*

Biol. 2012 May;31(4):261-70. doi: 10.1016/j.matbio.2012.01.009. Epub 2012 Feb 10. PMID: 22342460.

Chakrabarti S, Jahandideh F, Wu J. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *Biomed Res Int.* 2014;2014:608979. doi: 10.1155/2014/608979. Epub 2014 Jan 2. PMID: 24527452; PMCID: PMC3914560.

Chen YH, Chen HL, Fan HC, Tung YT, Kuo CW, Tu MY, Chen CM. Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antifibrotic Effects of Kefir Peptides on Salt-Induced Renal Vascular Damage and Dysfunction in Aged Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Antioxidants (Basel).* 2020 Aug 26;9(9):790. doi: 10.3390/antiox9090790. PMID: 32858955; PMCID: PMC7555286.

Chen Y, Liu W, Xue J, Yang J, Chen X, Shao Y, Kwok LY, Bilige M, Mang L, Zhang H. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus helveticus* strains from traditional fermented dairy foods and antihypertensive effect of fermented milk of strain H9. *J Dairy Sci.* 2014 Nov;97(11):6680-92. doi: 10.3168/jds.2014-7962. Epub 2014 Aug 22. PMID: 25151888.

Cheng, D., Talib, J., Stanley, C. P., Rashid, I., Michaëlsson, E., Lindstedt, E. L., ... & Stocker, R. (2019). Inhibition of MPO (myeloperoxidase) attenuates endothelial dysfunction in mouse models of vascular inflammation and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 39(7), 1448-1457.

Crowley SD. The cooperative roles of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Jan 1;20(1):102-20. doi: 10.1089/ars.2013.5258. Epub 2013 Apr 19. PMID: 23472597; PMCID: PMC3880899.

Curado DDSP, Gomes DF, Silva TBC, Almeida PHRF, Tavares NUL, Areda CA, da Silva EN. Direct cost of systemic arterial hypertension and its complications in the circulatory system from the perspective of the Brazilian public health system in 2019. *PLoS One.* 2021 Jun 10;16(6):e0253063. doi: 10.1371/journal.pone.0253063. PMID: 34111216; PMCID: PMC8191920.

de Cavanagh EM, Piotrkowski B, Basso N, Stella I, Inserra F, Ferder L, Fraga CG. Enalapril and losartan attenuate mitochondrial dysfunction in aged rats. *FASEB J*. 2003 Jun;17(9):1096-8. doi: 10.1096/fj.02-0063fje. Epub 2003 Apr 22. PMID: 12709417.

de Cavanagh EM, Toblli JE, Ferder L, Piotrkowski B, Stella I, Inserra F. Renal mitochondrial dysfunction in spontaneously hypertensive rats is attenuated by losartan but not by amlodipine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Jun;290(6):R1616-25. doi: 10.1152/ajpregu.00615.2005. Epub 2006 Jan 12. PMID: 16410402.

de Oliveira MR, Silva TJ, Barros E, Guimarães VM, Baracat-Pereira MC, Eller MR, Dos Reis Coimbra JS, de Oliveira EB. Anti-Hypertensive Peptides Derived from Caseins: Mechanism of Physiological Action, Production Bioprocesses, and Challenges for Food Applications. *Appl Biochem Biotechnol*. 2018 Aug;185(4):884-908. doi: 10.1007/s12010-018-2692-8. Epub 2018 Jan 25. PMID: 29372419.

del Mar Contreras, M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., & Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19(10), 566-573.

Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, Kröller-Schön S, Steven S, Schulz E, Münzel T. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. *Br J Pharmacol*. 2017 Jun;174(12):1670-1689. doi: 10.1111/bph.13403. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26660451; PMCID: PMC5446573.

Dan X, Mushi Z, Baili W, Han L, Enqi W, Huanhu Z, Shuchun L. Differential Analysis of Hypertension-Associated Intestinal Microbiota. *Int J Med Sci*. 2019 Jun 2;16(6):872-881. doi: 10.7150/ijms.29322. PMID: 31337961; PMCID: PMC6643114.

Dandona P, Dhindsa S, Ghanim H, Chaudhuri A. Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. *J Hum Hypertens*. 2007 Jan;21(1):20-7. doi: 10.1038/sj.jhh.1002101. Epub 2006 Nov 9. PMID: 17096009.

Devlin AM, Clark JS, Reid JL, Dominiczak AF. DNA synthesis and apoptosis in smooth muscle cells from a model of genetic hypertension. *Hypertension*. 2000 Jul;36(1):110-5. doi: 10.1161/01.hyp.36.1.110. PMID: 10904021.

Dias AT, Cintra AS, Frossard JC, Palomino Z, Casarini DE, Gomes IB, Balarini CM, Gava AL, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Inhibition of phosphodiesterase 5 restores endothelial function in renovascular hypertension. *J Transl Med*. 2014 Sep 16;12:250. doi: 10.1186/s12967-014-0250-x. PMID: 25223948; PMCID: PMC4172908.

Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*. 2011 Oct 1;51(7):1289-301. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.033. Epub 2011 Jul 6. PMID: 21777669; PMCID: PMC3163726.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001. PMID: 11773609.

Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition*. 2012 May;28(5):539-43. doi: 10.1016/j.nut.2011.08.013. Epub 2011 Nov 29. PMID: 22129852.

Farag MA, Jomaa SA, El-Wahed AA, El-Seedi AHR. The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. *Nutrients*. 2020 Jan 28;12(2):346. doi: 10.3390/nu12020346. PMID: 32013044; PMCID: PMC7071183.

Fernandes, S. S., Coelho, M. S., & de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2019). Bioactive compounds as ingredients of functional foods: polyphenols, carotenoids, peptides from animal and plant sources new. In *Bioactive Compounds* (pp. 129-142). Woodhead Publishing.

Fernandez MA, Panahi S, Daniel N, Tremblay A, Marette A. Yogurt and Cardiometabolic Diseases: A Critical Review of Potential Mechanisms. *Adv Nutr*. 2017 Nov 15;8(6):812-829. doi: 10.3945/an.116.013946. PMID: 29141967; PMCID: PMC5682997.

Friederich-Persson M, Persson P. Mitochondrial angiotensin II receptors regulate oxygen consumption in kidney mitochondria from healthy and type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020 Mar 1;318(3):F683-F688. doi: 10.1152/ajprenal.00417.2019. Epub 2020 Jan 6. PMID: 31904285.

Friques AG, Arpini CM, Kalil IC, Gava AL, Leal MA, Porto ML, Nogueira BV, Dias AT, Andrade TU, Pereira TM, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Vasquez EC. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Transl Med*. 2015 Dec 30;13:390. doi: 10.1186/s12967-015-0759-7. PMID: 26715471; PMCID: PMC4696190.

Friques AGF, Santos FDN, Angeli DB, Silva FAC, Dias AT, Aires R, Leal MAS, Nogueira BV, Amorim FG, Campagnaro BP, Pereira TMC, Campos-Toimil M, Meyrelles SS, Vasquez EC. Bisphenol A contamination in infant rats: molecular, structural, and physiological cardiovascular changes and the protective role of kefir. *J Nutr Biochem*. 2020 Jan;75:108254. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.108254. Epub 2019 Oct 25. PMID: 31707283.

Ganesh BP, Nelson JW, Eskew JR, Ganesan A, Ajami NJ, Petrosino JF, Bryan RM Jr, Durgan DJ. Prebiotics, Probiotics, and Acetate Supplementation Prevent Hypertension in a Model of Obstructive Sleep Apnea. *Hypertension*. 2018 Nov;72(5):1141-1150. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11695. PMID: 30354816; PMCID: PMC6209125.

Garlid KD, Dos Santos P, Xie ZJ, Costa AD, Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Sep 30;1606(1-3):1-21. doi: 10.1016/s0005-2728(03)00109-9. PMID: 14507424.

Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Apr 29;302(2):148-58. doi: 10.1016/j.mce.2008.11.003. Epub 2008 Nov 18. PMID: 19059306; PMCID: PMC2835147.

Ghiadoni L, Magagna A, Versari D, Kardasz I, Huang Y, Taddei S, Salvetti A. Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function.

Hypertension. 2003 Jun;41(6):1281-6. doi: 10.1161/01.HYP.0000070956.57418.22. Epub 2003 Apr 28. PMID: 12719441.

Gobbetti M, Ferranti P, Smacchi E, Goffredi F, Addeo F. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Sep;66(9):3898-904. doi: 10.1128/AEM.66.9.3898-3904.2000. PMID: 10966406; PMCID: PMC92236.

Grajek W, Olejnik A, Sip A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochim Pol.* 2005;52(3):665-71. Epub 2005 Aug 5. PMID: 16086074.

Guimarães DA, Rizzi E, Ceron CS, Martins-Oliveira A, Gerlach RF, Shiva S, Tanus-Santos JE. Atorvastatin and sildenafil decrease vascular TGF- $\beta$  levels and MMP-2 activity and ameliorate arterial remodeling in a model of renovascular hypertension. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:386-395. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.017. Epub 2015 Aug 31. PMID: 26343345; PMCID: PMC4564390.

Guo F, Chen XL, Wang F, Liang X, Sun YX, Wang YJ. Role of angiotensin II type 1 receptor in angiotensin II-induced cytokine production in macrophages. *J Interferon Cytokine Res.* 2011 Apr;31(4):351-61. doi: 10.1089/jir.2010.0073. Epub 2011 Jan 15. PMID: 21235392.

Guzel-Seydim ZB, Kok-Tas T, Greene AK, Seydim AC. Review: functional properties of kefir. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011 Mar;51(3):261-8. doi: 10.1080/10408390903579029. PMID: 21390946.

Ha GE, Chang OK, Han GS, Ham JS, Park BY, Jeong SG. Comparison of Antioxidant Activities of Hydrolysates of Domestic and Imported Skim Milk Powders Treated with Papain. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 2015;35(3):360-9. doi: 10.5851/kosfa.2015.35.3.360. Epub 2015 Jun 30. PMID: 26761850; PMCID: PMC4662359.

Hamida RS, Shami A, Ali MA, Almohawes ZN, Mohammed AE, Bin-Meferij MM. Kefir: A protective dietary supplementation against viral infection. *Biomed*

Pharmacother. 2021 Jan;133:110974. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110974. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33186795; PMCID: PMC7655491.

Harrison DG. The mosaic theory revisited: common molecular mechanisms coordinating diverse organ and cellular events in hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2013 Jan-Feb;7(1):68-74. doi: 10.1016/j.jash.2012.11.007. PMID: 23321405; PMCID: PMC3646628.

Hayes M, Stanton C, Slattery H, O'Sullivan O, Hill C, Fitzgerald GF, Ross RP. Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Jul;73(14):4658-67. doi: 10.1128/AEM.00096-07. Epub 2007 May 4. PMID: 17483275; PMCID: PMC1932838.

Hernández-Ledesma, B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M., & Recio, I. (2005). Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 1041-1048.

Hertzler SR, Clancy SM. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J Am Diet Assoc.* 2003 May;103(5):582-7. doi: 10.1053/jada.2003.50111. PMID: 12728216.

Hirota T, Nonaka A, Matsushita A, Uchida N, Ohki K, Asakura M, Kitakaze M. Milk casein-derived tripeptides, VPP and IPP induced NO production in cultured endothelial cells and endothelium-dependent relaxation of isolated aortic rings. *Heart Vessels.* 2011 Sep;26(5):549-56. doi: 10.1007/s00380-010-0096-y. Epub 2011 Jan 8. PMID: 21221598.

Hirota T, Ohki K, Kawagishi R, Kajimoto Y, Mizuno S, Nakamura Y, Kitakaze M. Casein hydrolysate containing the antihypertensive tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves vascular endothelial function independent of blood pressure-lowering effects: contribution of the inhibitory action of angiotensin-converting enzyme. *Hypertens Res.* 2007 Jun;30(6):489-96. doi: 10.1291/hyres.30.489. PMID: 17664851.

Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*. 2001 Sep;38(3 Pt 2):581-7. doi: 10.1161/hy09t1.096249. PMID: 11566935.

Ishida Y, Shibata Y, Fukuhara I, Yano Y, Takehara I, Kaneko K. Effect of an excess intake of casein hydrolysate containing Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in subjects with normal blood pressure, high-normal blood pressure, or mild hypertension. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011;75(3):427-33. doi: 10.1271/bbb.100560. Epub 2011 Mar 7. PMID: 21389626.

Izquierdo-González JJ, Amil-Ruiz F, Zazzu S, Sánchez-Lucas R, Fuentes-Almagro CA, Rodríguez-Ortega MJ. Proteomic analysis of goat milk kefir: Profiling the fermentation-time dependent protein digestion and identification of potential peptides with biological activity. *Food Chem*. 2019 Oct 15;295:456-465. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.178. Epub 2019 May 25. PMID: 31174782.

Jakala P, Pere E, Lehtinen R, Turpeinen A, Korpela R, Vapaatalo H. Cardiovascular activity of milk casein-derived tripeptides and plant sterols in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol*. 2009 Dec;60(4):11-20. PMID: 20065492.

Jäkälä P, Vapaatalo H. Antihypertensive Peptides from Milk Proteins. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010 Jan 19;3(1):251-272. doi: 10.3390/ph3010251. PMID: 27713251; PMCID: PMC3991029.

Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Cohen RA. Angiotensin II differentially regulates interleukin-1-beta-inducible NO synthase (iNOS) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression: role of p38 MAPK. *J Biol Chem*. 2004 May 7;279(19):20363-8. doi: 10.1074/jbc.M314172200. Epub 2004 Mar 3. PMID: 15001568.

Jordan J, Kurschat C, Reuter H. Arterial Hypertension. *Dtsch Arztebl Int*. 2018 Aug 20;115(33-34):557-568. doi: 10.3238/arztebl.2018.0557. PMID: 30189978; PMCID: PMC6156553.

Kanbak G, Uzuner K, Kuşat Ol K, 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. doi: 10.3109/10641963.2013.783046. Epub 2013 Apr 30. PMID: 23631764.

Kawai T, Forrester SJ, O'Brien S, Baggett A, Rizzo V, Eguchi S. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharmacol Res*. 2017 Nov;125(Pt A):4-13. doi: 10.1016/j.phrs.2017.05.008. Epub 2017 May 17. PMID: 28527699; PMCID: PMC5607088.

Klippel BF, Duemke LB, Leal MA, Friques AG, Dantas EM, Dalvi RF, Gava AL, Pereira TM, Andrade TU, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Vasquez EC. Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Front Physiol*. 2016 Jun 7;7:211. doi: 10.3389/fphys.2016.00211. PMID: 27375490; PMCID: PMC4895057.

Kim JM, Heo HS, Choi YJ, Ye BH, Mi Ha Y, Seo AY, Yu BP, Leeuwenburgh C, Chung HY, Carter CS. Inhibition of NF- $\kappa$ B-induced inflammatory responses by angiotensin II antagonists in aged rat kidney. *Exp Gerontol*. 2011 Jul;46(7):542-8. doi: 10.1016/j.exger.2011.02.011. Epub 2011 Mar 3. PMID: 21377515; PMCID: PMC3104080.

Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, Shokoji T, Yao L, Fan YY, Rahman M, Abe Y. Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension*. 2005 Mar;45(3):438-44. doi: 10.1161/01.HYP.0000157169.27818.ae. Epub 2005 Feb 7. PMID: 15699441.

Kumral ZN, Sener G, Ozgur S, Koc M, Suleymanoglu S, Hurdag C, Yegen BC. Regular exercise alleviates renovascular hypertension-induced cardiac/endothelial dysfunction and oxidative injury in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2016 Feb;67(1):45-55. PMID: 27010894.

Lana A, Banegas JR, Guallar-Castillón P, Rodríguez-Artalejo F, Lopez-Garcia E. Association of Dairy Consumption and 24-Hour Blood Pressure in Older Adults with Hypertension. *Am J Med*. 2018 Oct;131(10):1238-1249. doi: 10.1016/j.amjmed.2018.04.039. Epub 2018 May 26. PMID: 29807002.

Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension*. 2002 Oct;40(4):511-5. doi: 10.1161/01.hyp.0000032100.23772.98. PMID: 12364355; PMCID: PMC4734745.

Lee MY, Ahn KS, Kwon OK, Kim MJ, Kim MK, Lee IY, Oh SR, Lee HK. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiology*. 2007;212(8):647-54. doi: 10.1016/j.imbio.2007.05.004. Epub 2007 Jul 10. PMID: 17869642.

Li HB, Qin DN, Ma L, Miao YW, Zhang DM, Lu Y, Song XA, Zhu GQ, Kang YM. Chronic infusion of lisinopril into hypothalamic paraventricular nucleus modulates cytokines and attenuates oxidative stress in rostral ventrolateral medulla in hypertension. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 Sep 1;279(2):141-9. doi: 10.1016/j.taap.2014.06.004. Epub 2014 Jun 14. PMID: 24937322.

Li J, Zhao F, Wang Y, Chen J, Tao J, Tian G, Wu S, Liu W, Cui Q, Geng B, Zhang W, Weldon R, Auguste K, Yang L, Liu X, Chen L, Yang X, Zhu B, Cai J. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome*. 2017 Feb 1;5(1):14. doi: 10.1186/s40168-016-0222-x. PMID: 28143587; PMCID: PMC5286796.

Lin PP, Hsieh YM, Kuo WW, Lin YM, Yeh YL, Lin CC, Tsai FJ, Tsai CH, Tsai CC, Huang CY. Suppression of TLR-4-related inflammatory pathway and anti-fibrosis effects of probiotic-fermented purple sweet potato yogurt in hearts of spontaneously hypertensive rats. *Chin J Physiol*. 2013 Jun 30;56(3):174-83. doi: 10.4077/CJP.2013.BAB118. PMID: 23656219.

Liu JR, Chen MJ, Lin CW. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *J Agric Food Chem*. 2005 Apr 6;53(7):2467-74. doi: 10.1021/jf048934k. PMID: 15796581.

Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., & Garaizar, J. (2006). Kefir: una comunidad simbiótica de bacterias y levaduras con propiedades saludables. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23(2), 67-74.

Luchtefeld M, Grote K, Grothusen C, Bley S, Bandlow N, Selle T, Strüber M, Haverich A, Bavendiek U, Drexler H, Schieffer B. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Mar 4;328(1):183-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.12.152. PMID: 15670768.

Lunow D, Kaiser S, Rückriemen J, Pohl C, Henle T. Tryptophan-containing dipeptides are C-domain selective inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Food Chem.* 2015 Jan 1;166:596-602. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.059. Epub 2014 Jun 18. PMID: 25053098.

Maeno M, Yamamoto N, Takano T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci.* 1996 Aug;79(8):1316-21. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76487-1. PMID: 8880454.

Malta, D. C., Gonçalves, R. P. F., Machado, Í. E., Freitas, M. I. D. F., Azeredo, C., & Szwarcwald, C. L. (2018). Prevalência da hipertensão arterial segundo diferentes critérios diagnósticos, Pesquisa Nacional de Saúde. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 21, e180021.

Maneesai P, Bunbupha S, Kukongviriyapan U, Senggunprai L, Kukongviriyapan V, Prachaney P, Pakdeechote P. Effect of asiatic acid on the Ang II-AT<sub>1</sub>R-NADPH oxidase-NF- $\kappa$ B pathway in renovascular hypertensive rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2017 Oct;390(10):1073-1083. doi: 10.1007/s00210-017-1408-x. Epub 2017 Jul 21. PMID: 28733880.

Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2008 Jul;29(7):367-74. doi: 10.1016/j.tips.2008.05.003. Epub 2008 Jun 23. PMID: 18579222.

Marccone S, Belton O, Fitzgerald DJ. Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol.* 2017 Jan;83(1):152-162. doi: 10.1111/bcp.13002. Epub 2016 Jun 17. PMID: 27151091; PMCID: PMC5338169.

Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007

Jan;292(1):C82-97. doi: 10.1152/ajpcell.00287.2006. Epub 2006 Jul 26. PMID: 16870827.

Mell B, Jala VR, Mathew AV, Byun J, Waghulde H, Zhang Y, Haribabu B, Vijay-Kumar M, Pennathur S, Joe B. Evidence for a link between gut microbiota and hypertension in the Dahl rat. *Physiol Genomics*. 2015 Jun;47(6):187-97. doi: 10.1152/physiolgenomics.00136.2014. Epub 2015 Mar 31. PMID: 25829393; PMCID: PMC4451389.

Meune C, Mourad JJ, Bergmann JF, Spaulding C. Interaction between cyclooxygenase and the renin-angiotensin-aldosterone system: rationale and clinical relevance. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2003 Sep;4(3):149-54. doi: 10.3317/jraas.2003.023. PMID: 14608518.

Miao, J., Liao, W., Pan, Z., Wang, Q., Duan, S., Xiao, S., ... & Cao, Y. (2019). Isolation and identification of iron-chelating peptides from casein hydrolysates. *Food & function*, 10(5), 2372-2381.

Miguel M, Gómez-Ruiz JÁ, Recio I, Aleixandre A. Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Mol Nutr Food Res*. 2010 Oct;54(10):1422-7. doi: 10.1002/mnfr.200900448. PMID: 20397194.

Miguel-Carrasco JL, Zambrano S, Blanca AJ, Mate A, Vázquez CM. Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF- $\kappa$ B. *J Inflamm (Lond)*. 2010 May 12;7:21. doi: 10.1186/1476-9255-7-21. PMID: 20462420; PMCID: PMC2879251.

Mills KT, Stefanescu A, He J. The global epidemiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol*. 2020 Apr;16(4):223-237. doi: 10.1038/s41581-019-0244-2. Epub 2020 Feb 5. PMID: 32024986; PMCID: PMC7998524.

Mondaca-Ruff D, Riquelme JA, Quiroga C, Norambuena-Soto I, Sanhueza-Olivares F, Villar-Fincheira P, Hernández-Díaz T, Cancino-Arenas N, San Martín A, García L, Lavandero S, Chiong M. Angiotensin II-Regulated Autophagy Is Required for Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy. *Front Pharmacol*. 2019 Feb 5;9:1553. doi: 10.3389/fphar.2018.01553. PMID: 30804791; PMCID: PMC6371839.

Monteiro, B. L., Dias, A. T., Wanderkoke, S. C., Yokota, R., Casarini, D. E., Leal, M. A., ... & Vasquez, E. C. (2020). Protective effects of kefir in the angiotensin II-dependent hypertension. *Journal of Functional Foods*, 75, 104260.

Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jan 1;20(1):164-82. doi: 10.1089/ars.2013.5302. Epub 2013 Jun 6. PMID: 23600794; PMCID: PMC3880913.

Montezano AC, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can J Cardiol*. 2012 May;28(3):288-95. doi: 10.1016/j.cjca.2012.01.017. Epub 2012 Mar 23. PMID: 22445098.

Moslehishad, M., Ehsani, M. R., Salami, M., Mirdamadi, S., Ezzatpanah, H., Naslaji, A. N., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2013). The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. *International Dairy Journal*, 29(2), 82-87.

Mozafari, H., Zhou, C., & Gu, L. (2019). Mechanical contribution of vascular smooth muscle cells in the tunica media of artery. *Nanotechnology Reviews*, 8(1), 50-60.

Mueller, C. F., Laude, K., McNally, J. S., & Harrison, D. G. (2005). Redox mechanisms in blood vessels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(2), 274-278.

Mungrue IN, Gros R, You X, Pirani A, Azad A, Csont T, Schulz R, Butany J, Stewart DJ, Husain M. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J Clin Invest*. 2002 Mar;109(6):735-43. doi: 10.1172/JCI13265. PMID: 11901182; PMCID: PMC150906.

Mushtaq N, Hussain S, Zhang S, Yuan L, Li H, Ullah S, Wang Y, Xu J. Molecular characterization of alterations in the intestinal microbiota of patients with grade 3 hypertension. *Int J Mol Med*. 2019 Aug;44(2):513-522. doi:

10.3892/ijmm.2019.4235. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31173179; PMCID: PMC6605625.

Nakamura T, Mizutani J, Ohki K, Yamada K, Yamamoto N, Takeshi M, Takazawa K. Casein hydrolysate containing Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves central blood pressure and arterial stiffness in hypertensive subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Atherosclerosis*. 2011 Nov;219(1):298-303. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.007. Epub 2011 Jun 13. PMID: 21723554.

Nakamura T, Hirota T, Mizushima K, Ohki K, Naito Y, Yamamoto N, Yoshikawa T. Milk-derived peptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein e-deficient mice: a preliminary study. *J Med Food*. 2013 May;16(5):396-403. doi: 10.1089/jmf.2012.2541. Epub 2013 Apr 30. PMID: 23631494.

Natalin HM, Garcia AF, Ramalho LN, Restini CB. Resveratrol improves vasoprotective effects of captopril on aortic remodeling and fibrosis triggered by renovascular hypertension. *Cardiovasc Pathol*. 2016 Mar-Apr;25(2):116-9. doi: 10.1016/j.carpath.2015.11.003. Epub 2015 Nov 11. PMID: 26764145.

Nejati F, Junne S, Neubauer P. A Big World in Small Grain: A Review of Natural Milk Kefir Starters. *Microorganisms*. 2020 Jan 30;8(2):192. doi: 10.3390/microorganisms8020192. PMID: 32019167; PMCID: PMC7074874.

Neto YAAH, Rosa JC, Cabral H. Peptides with antioxidant properties identified from casein, whey, and egg albumin hydrolysates generated by two novel fungal proteases. *Prep Biochem Biotechnol*. 2019;49(7):639-648. doi: 10.1080/10826068.2019.1566147. Epub 2019 May 25. PMID: 31131710.

Nogueira BV, Peotta VA, Meyrelles SS, Vasquez EC. Evaluation of aortic remodeling in apolipoprotein E-deficient mice and renovascular hypertensive mice. *Arch Med Res*. 2007 Nov;38(8):816-21. doi: 10.1016/j.arcmed.2007.06.005. Epub 2007 Aug 2. PMID: 17923260.

Nussbaum C, Klinka A, Adam M, Baldus S, Sperandio M. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. *Antioxid*

Redox Signal. 2013 Feb 20;18(6):692-713. doi: 10.1089/ars.2012.4783. Epub 2012 Oct 3. PMID: 22823200.

Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cífková R, Dominicczak AF, Grassi G, Jordan J, Poulter NR, Rodgers A, Whelton PK. Hypertension. Nat Rev Dis Primers. 2018 Mar 22;4:18014. doi: 10.1038/nrdp.2018.14. PMID: 29565029; PMCID: PMC6477925.

Ocaranza MP, Riquelme JA, García L, Jalil JE, Chiong M, Santos RAS, Lavandero S. Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol. 2020 Feb;17(2):116-129. doi: 10.1038/s41569-019-0244-8. Epub 2019 Aug 19. PMID: 31427727; PMCID: PMC7097090.

Oh PC, Sakuma I, Hayashi T, Koh KK. Angiotensin converting enzyme inhibitors remain the first treatment of choice. Korean J Intern Med. 2016 Mar;31(2):237-41. doi: 10.3904/kjim.2016.026. Epub 2016 Feb 26. PMID: 26932400; PMCID: PMC4773733.

Ong, L., Henriksson, A., & Shah, N. P. (2007). Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Le Lait*, 87(2), 149-165.

Organização Mundial da Saúde, OMS. Hypertension. 17 May 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>

Ozcan, T., Sahin, S., Akpinar-Bayazit, A., & Yilmaz-Ersan, L. (2019). Assessment of antioxidant capacity by method comparison and amino acid characterisation in buffalo milk kefir. *International journal of dairy technology*, 72(1), 65-73.

Papadimitriou, C. G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S. V., Gomes, A. M., Malcata, F. X., & Alichanidis, E. (2007). Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 105(2), 647-656.

Paul A, Corbett CB, Okune R, Autieri MV. Angiotensin II, Hypercholesterolemia, and Vascular Smooth Muscle Cells: A Perfect Trio for

Vascular Pathology. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 25;21(12):4525. doi: 10.3390/ijms21124525. PMID: 32630530; PMCID: PMC7350267.t

Peluzio MDCG, Dias MME, Martinez JA, Milagro FI. Kefir and Intestinal Microbiota Modulation: Implications in Human Health. *Front Nutr.* 2021 Feb 22;8:638740. doi: 10.3389/fnut.2021.638740. PMID: 33693024; PMCID: PMC7938729.

Perpetuo EA, Juliano L, Lebrun I. Biochemical and pharmacological aspects of two bradykinin-potentiating peptides obtained from tryptic hydrolysis of casein. *J Protein Chem.* 2003 Nov;22(7-8):601-6. doi: 10.1023/b:jopc.0000008724.98339.ff. PMID: 14714726.

Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T., & Korhonen, H. (1998). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8(4), 325-331.

Piotrkowski B, Fraga CG, de Cavanagh EM. Mitochondrial function and nitric oxide metabolism are modified by enalapril treatment in rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Apr;292(4):R1494-501. doi: 10.1152/ajpregu.00540.2006. Epub 2006 Dec 21. PMID: 17185409.

Piqueras L, Kubes P, Alvarez A, O'Connor E, Issekutz AC, Esplugues JV, Sanz MJ. Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation.* 2000 Oct 24;102(17):2118-23. doi: 10.1161/01.cir.102.17.2118. PMID: 11044430.

Prado MR, Blandón LM, Vandenberghe LP, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front Microbiol.* 2015 Oct 30;6:1177. doi: 10.3389/fmicb.2015.01177. PMID: 26579086; PMCID: PMC4626640.

Pereira PG, Rabelo K, da Silva JFR, Ciambarella BT, Argento JGC, Nascimento ALR, Vieira AB, de Carvalho JJ. Aliskiren improves renal morphophysiology and inflammation in Wistar rats with 2K1C renovascular hypertension. *Histol Histopathol.* 2020 Jun;35(6):609-621. doi: 10.14670/HH-18-173. Epub 2019 Oct 18. PMID: 31625581.

Quirós, A., Ramos, M., Mugerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Alexandre, A., & Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17(1), 33-41.

Rai AK, Sanjukta S, Jeyaram K. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their role in reducing hypertension. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017 Sep 2;57(13):2789-2800. doi: 10.1080/10408398.2015.1068736. PMID: 26463100.

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996 Apr 15;97(8):1916-23. doi: 10.1172/JCI118623. PMID: 8621776; PMCID: PMC507261.

Rival SG, Boeriu CG, Wichers HJ. Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J Agric Food Chem*. 2001 Jan;49(1):295-302. doi: 10.1021/jf0003911. PMID: 11170591.

Rosa DD, Dias MMS, Grześkowiak ŁM, Reis SA, Conceição LL, Peluzio MDCG. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev*. 2017 Jun;30(1):82-96. doi: 10.1017/S0954422416000275. Epub 2017 Feb 22. PMID: 28222814.

Rodrigues KL, Caputo LR, Carvalho JC, Evangelista J, Schneedorf JM. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents*. 2005 May;25(5):404-8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.09.020. PMID: 15848295.

Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, Barengo NC, Beaton AZ, Benjamin EJ, Benziger CP, Bonny A, Brauer M, et al. GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Dec 22;76(25):2982-3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, König S, Wittig B, Egidio J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular

smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res.* 2000 Jun 23;86(12):1266-72. doi: 10.1161/01.res.86.12.1266. PMID: 10864918.

Sah BNP, Vasiljevic T, McKechnie S, Donkor ON. Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018 Mar 24;58(5):726-740. doi: 10.1080/10408398.2016.1217825. Epub 2017 Jul 11. PMID: 27558592.

Saito T, Nakamura T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J Dairy Sci.* 2000 Jul;83(7):1434-40. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75013-2. PMID: 10908049.

Santisteban MM, Qi Y, Zubcevic J, Kim S, Yang T, Shenoy V, Cole-Jeffrey CT, Lobaton GO, Stewart DC, Rubiano A, Simmons CS, Garcia-Pereira F, Johnson RD, Pepine CJ, Raizada MK. Hypertension-Linked Pathophysiological Alterations in the Gut. *Circ Res.* 2017 Jan 20;120(2):312-323. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309006. Epub 2016 Oct 31. PMID: 27799253; PMCID: PMC5250568.

Santanna AF, Filete PF, Lima EM, Porto ML, Meyrelles SS, Vasquez EC, Endringer DC, Lenz D, Abdalla DSP, Pereira TMC, Andrade TU. Chronic administration of the soluble, nonbacterial fraction of kefir attenuates lipid deposition in LDL<sup>r/-</sup> mice. *Nutrition.* 2017 Mar;35:100-105. doi: 10.1016/j.nut.2016.11.001. Epub 2016 Nov 22. PMID: 28241975.

Santuzzi CH, Tiradentes RV, Mengal V, Claudio ER, Mauad H, Gouvea SA, Abreu GR. Combined aliskiren and L-arginine treatment has antihypertensive effects and prevents vascular endothelial dysfunction in a model of renovascular hypertension. *Braz J Med Biol Res.* 2015 Jan;48(1):65-76. doi: 10.1590/1414-431x20144191. Epub 2014 Oct 24. PMID: 25493385; PMCID: PMC4288495.

Shahidi, F., & Zhong, Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9), 930-940.

Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *J Hypertens*. 1997 Dec;15(12 Pt 1):1441-8. doi: 10.1097/00004872-199715120-00011. PMID: 9431850.

Sharifi AM, Akbarloo N, Heshmatian B, Ziai A. Alteration of local ACE activity and vascular responsiveness during development of 2K1C renovascular hypertension. *Pharmacol Res*. 2003 Mar;47(3):201-9. doi: 10.1016/s1043-6618(02)00319-5. PMID: 12591015.

Shazly, A. B., Mu, H., Liu, Z., Abd El-Aziz, M., Zeng, M., Qin, F., ... & Chen, J. (2019). Release of antioxidant peptides from buffalo and bovine caseins: Influence of proteases on antioxidant capacities. *Food chemistry*, 274, 261-267.

Schiffrin EL, Deng LY. Comparison of effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and beta-blockade for 2 years on function of small arteries from hypertensive patients. *Hypertension*. 1995 Apr;25(4 Pt 2):699-703. doi: 10.1161/01.hyp.25.4.699. PMID: 7721419.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 Mar;175(1):184-91. doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0. PMID: 3345800.

Sigala F, Papalambros E, Kotsinas A, Andreadou I, Sigalas P, Kremastinos D, Bastounis E, Gorgoulis VG. Relationship between iNOS expression and aortic cell proliferation and apoptosis in an elastase-induced model of aorta aneurysm and the effect of 1400 W administration. *Surgery*. 2005 Apr;137(4):447-56. doi: 10.1016/j.surg.2004.12.003. PMID: 15800493.

Silva-Cutini MA, Almeida SA, Nascimento AM, Abreu GR, Bissoli NS, Lenz D, Endringer DC, Brasil GA, Lima EM, Biancardi VC, Andrade TU. Long-term treatment with kefir probiotics ameliorates cardiac function in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem*. 2019 Apr;66:79-85. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.01.006. Epub 2019 Jan 18. PMID: 30776608.

Stewart DC, Rubiano A, Santisteban MM, Shenoy V, Qi Y, Pepine CJ, Raizada MK, Simmons CS. Hypertension-linked mechanical changes of rat gut. *Acta*

Biomater. 2016 Nov;45:296-302. doi: 10.1016/j.actbio.2016.08.045. Epub 2016 Aug 24. PMID: 27567964; PMCID: PMC5069177.

Su C, Xue J, Ye C, Chen A. Role of the central renin-angiotensin system in hypertension (Review). *Int J Mol Med*. 2021 Jun;47(6):95. doi: 10.3892/ijmm.2021.4928. Epub 2021 Apr 13. PMID: 33846799; PMCID: PMC8041481.

Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J Nutr Biochem*. 2000 Mar;11(3):128-31. doi: 10.1016/s0955-2863(99)00083-2. PMID: 10742656.

Sun Y, Carretero OA, Xu J, Rhaleb NE, Yang JJ, Pagano PJ, Yang XP. Deletion of inducible nitric oxide synthase provides cardioprotection in mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension*. 2009 Jan;53(1):49-56. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.121822. Epub 2008 Nov 10. PMID: 19001185; PMCID: PMC2636504.

Sun QA, Runge MS, Madamanchi NR. Oxidative stress, NADPH oxidases, and arteries. *Hamostaseologie*. 2016 May 10;36(2):77-88. doi: 10.5482/HAMO-14-11-0076. Epub 2015 Feb 4. PMID: 25649240; PMCID: PMC5625353.

Taha S, El Abd M, De Gobba C, Abdel-Hamid M, Khalil E, Hassan D. Antioxidant and antibacterial activities of bioactive peptides in buffalo's yoghurt fermented with different starter cultures. *Food Sci Biotechnol*. 2017 Sep 20;26(5):1325-1332. doi: 10.1007/s10068-017-0160-9. PMID: 30263666; PMCID: PMC6049774.

Takahashi M, Suzuki E, Takeda R, Oba S, Nishimatsu H, Kimura K, Nagano T, Nagai R, Hirata Y. Angiotensin II and tumor necrosis factor-alpha synergistically promote monocyte chemoattractant protein-1 expression: roles of NF-kappaB, p38, and reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Jun;294(6):H2879-88. doi: 10.1152/ajpheart.91406.2007. Epub 2008 Apr 25. PMID: 18441197.

Tanase DM, Gosav EM, Radu S, Ouatu A, Rezus C, Ciocoiu M, Costea CF, Floria M. Arterial Hypertension and Interleukins: Potential Therapeutic Target or

Future Diagnostic Marker? *Int J Hypertens*. 2019 May 2;2019:3159283. doi: 10.1155/2019/3159283. PMID: 31186952; PMCID: PMC6521461.

Taubman MB. Angiotensin II: a vasoactive hormone with ever-increasing biological roles. *Circ Res*. 2003 Jan 10;92(1):9-11. doi: 10.1161/01.res.0000052920.70316.ae. PMID: 12522114.

Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park JK, Fiebeler A, Barta P, Ganten D, Haller H, Dietz R, Luft FC. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord*. 2002;2:3. doi: 10.1186/1471-2261-2-3. Epub 2002 Jan 18. PMID: 11835691; PMCID: PMC65512.

Ton AMM, Campagnaro BP, Alves GA, Aires R, Côco LZ, Arpini CM, Guerra E Oliveira T, Campos-Toimil M, Meyrelles SS, Pereira TMC, Vasquez EC. Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Jan 13;2020:2638703. doi: 10.1155/2020/2638703. PMID: 32411323; PMCID: PMC7201593.

Tonini CL, Campagnaro BP, Louro LP, Pereira TM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. *Int J Mol Sci*. 2013 Feb 5;14(2):3325-42. doi: 10.3390/ijms14023325. PMID: 23385237; PMCID: PMC3588046.

Tonolo F, Sandre M, Ferro S, Folda A, Scalcon V, Scutari G, Feller E, Marin O, Bindoli A, Rigobello MP. Milk-derived bioactive peptides protect against oxidative stress in a Caco-2 cell model. *Food Funct*. 2018 Feb 21;9(2):1245-1253. doi: 10.1039/c7fo01646h. PMID: 29387856.

Tiradentes RV, Santuzzi CH, Claudio ER, Mengal V, Silva NF, Neto HA, Bissoli NS, Abreu GR, Gouvea SA. Combined Aliskiren and L-arginine treatment reverses renovascular hypertension in an animal model. *Hypertens Res*. 2015 Jul;38(7):471-7. doi: 10.1038/hr.2015.16. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25740291.

Tonolo, F., Folda, A., Cesaro, L., Scalcon, V., Marin, O., Ferro, S., ... & Rigobello, M. P. (2020). Milk-derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 64, 103696.

Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res.* 2004 Aug;37(8):1263-73. doi: 10.1590/s0100-879x2004000800018. Epub 2004 Jul 20. PMID: 15273829.

Touyz RM, Alves-Lopes R, Rios FJ, Camargo LL, Anagnostopoulou A, Arner A, Montezano AC. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2018 Mar 15;114(4):529-539. doi: 10.1093/cvr/cvy023. PMID: 29394331; PMCID: PMC5852517.

Tu M, Liu H, Zhang R, Chen H, Mao F, Cheng S, Lu W, Du M. Analysis and Evaluation of the Inhibitory Mechanism of a Novel Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived from Casein Hydrolysate. *J Agric Food Chem.* 2018 Apr 25;66(16):4139-4144. doi: 10.1021/acs.jafc.8b00732. Epub 2018 Apr 13. PMID: 29637780.

Üstün-Aytekin, Ö., Şeker, A., & Arısoy, S. (2020). The effect of in vitro gastrointestinal simulation on bioactivities of kefir. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 283-292.

Valenzuela R, Costa-Besada MA, Iglesias-Gonzalez J, Perez-Costas E, Villar-Cheda B, Garrido-Gil P, Melendez-Ferro M, Soto-Otero R, Lanciego JL, Henrion D, Franco R, Labandeira-Garcia JL. Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration. *Cell Death Dis.* 2016 Oct 20;7(10):e2427. doi: 10.1038/cddis.2016.327. PMID: 27763643; PMCID: PMC5133991.

Vasdev S, Gill VD, Singal PK. Modulation of oxidative stress-induced changes in hypertension and atherosclerosis by antioxidants. *Exp Clin Cardiol.* 2006 Fall;11(3):206-16. PMID: 18651033; PMCID: PMC2276159.

Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2006 Oct;2(10):582-93. doi: 10.1038/ncpneph0283. PMID: 17003837.

Wenzel P, Knorr M, Kossmann S, Stratmann J, Hausding M, Schuhmacher S, Karbach SH, Schwenk M, Yogev N, Schulz E, Oelze M, Grabbe S, Jonuleit H, Becker

C, Daiber A, Waisman A, Münzel T. Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction. *Circulation*. 2011 Sep 20;124(12):1370-81. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.034470. Epub 2011 Aug 29. PMID: 21875910.

Wierzejska E, Giernaś B, Lipiak A, Karasiewicz M, Cofta M, Staszewski R. A global perspective on the costs of hypertension: a systematic review. *Arch Med Sci*. 2020 Jan 31;16(5):1078-1091. doi: 10.5114/aoms.2020.92689. PMID: 32863997; PMCID: PMC7444692.

Wosniak J Jr, Santos CX, Kowaltowski AJ, Laurindo FR. Cross-talk between mitochondria and NADPH oxidase: effects of mild mitochondrial dysfunction on angiotensin II-mediated increase in Nox isoform expression and activity in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Jun;11(6):1265-78. doi: 10.1089/ars.2009.2392. PMID: 19281299.

Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T. Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertension*. 1997 Apr;29(4):1025-30. doi: 10.1161/01.hyp.29.4.1025. PMID: 9095094.

Wu Z, Pan D, Zhen X, Cao J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine casein and identified by MALDI-TOF-MS/MS. *J Sci Food Agric*. 2013 Apr;93(6):1331-7. doi: 10.1002/jsfa.5894. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23015408.

Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci*. 1994 Apr;77(4):917-22. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77026-0. PMID: 8201050.

Yamamoto N, Maeno M, Takano T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J Dairy Sci*. 1999 Jul;82(7):1388-93. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75364-6. PMID: 10416158.

Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Carvajal JM, Zadeh M, Gong M, Qi Y, Zubcevic J, Sahay B, Pepine CJ, Raizada MK, Mohamadzadeh M.

Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*. 2015 Jun;65(6):1331-40. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315. Epub 2015 Apr 13. PMID: 25870193; PMCID: PMC4433416.

Yap WB, Ahmad FM, Lim YC, Zainalabidin S. *Lactobacillus casei* strain C1 attenuates vascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2016 Nov;20(6):621-628. doi: 10.4196/kjpp.2016.20.6.621. Epub 2016 Oct 28. PMID: 27847439; PMCID: PMC5106396.

Yoon JW, Ahn SI, Jhoo JW, Kim GY. Antioxidant Activity of Yogurt Fermented at Low Temperature and Its Anti-inflammatory Effect on DSS-induced Colitis in Mice. *Food Sci Anim Resour*. 2019 Feb;39(1):162-176. doi: 10.5851/kosfa.2019.e13. Epub 2019 Feb 28. PMID: 30882084; PMCID: PMC6411250.

Yoshida J, Yamamoto K, Mano T, Sakata Y, Nishikawa N, Nishio M, Ohtani T, Miwa T, Hori M, Masuyama T. AT1 receptor blocker added to ACE inhibitor provides benefits at advanced stage of hypertensive diastolic heart failure. *Hypertension*. 2004 Mar;43(3):686-91. doi: 10.1161/01.HYP.0000118017.02160.fa. Epub 2004 Feb 2. PMID: 14757777.

Yoshida T, Hoofnagle MH, Owens GK. Myocardin and Prx1 contribute to angiotensin II-induced expression of smooth muscle alpha-actin. *Circ Res*. 2004 Apr 30;94(8):1075-82. doi: 10.1161/01.RES.0000125622.46280.95. Epub 2004 Mar 11. PMID: 15016729.