UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EFEITOS DO KEFIR NA REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS ESPONTANEMENTE HIPERTENSOS COM DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

ANDREIA GOMES FREITAS FRIQUES

VILA VELHA -ES

OUTUBRO / 2015

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EFEITOS DO KEFIR NA REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS ESPONTANEMENTE HIPERTENSOS COM DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ANDREIA GOMES FREITAS FRIQUES

VILA VELHA - ES

OUTUBRO / 2015

Catalogação na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

F915e Friques, Andreia Gomes Freitas.

Efeitos do Kefir na reatividade vascular de ratos espontaneamente hipertensos com disfunção endotelial / Andreia Gomes Freitas Friques. – 2015.
70 f.: il.

Orientador: Elisardo Corral Vasquez.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Vila Velha, 2015.
Inclui bibliografias.

1. Stress oxidativo. 2. Agentes antiinflamatórios. 3. Probióticos. 4. Bacteriologia médica. 5. Citocinas. I. Vasquez, Elisardo Corral. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 616.014

ANDREIA GOMES FREITAS FRIQUES

EFEITOS DO KEFIR NA REATIVIDADE VASCULAR DE RATOS ESPONTANEMENTE HIPERTENSOS COM DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 19 de outubro de 2015,

Banca examinadora:

Prof. Dra. Camille de Moura Balarini (UFPB)

Prof.Dr. Tadeu Uggere de Andrade (UVV)

Prof.Dr. Thiago de Melo Costa Pereira (UVV)

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez (UVV) - Orientador

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, Abilio, por me incentivar, apoiar e não me deixar desistir!

À minha mãe, Maria de Lourdes, que nunca mediu esforços para que eu conseguisse estudar!

AGRADECIMENTOS

A Jesus, meu Senhor e Salvador, que me "chamou" aos 8 anos de idade, fez morada na minha vida através do Espírito Santo de Deus e, conduz, desde então, cada passo meu! Obrigada Pai, é uma honra te servir!

Ao meu marido Abilio, meu companheiro de sonhos. Obrigada por acreditar e dedicar seu tempo, sua experiência, seu amor e cuidado a mim e à nossa família. Eu sou muito feliz ao seu lado!

Aos meus filhos Miguel e Davi, presentes de Deus que fazem meu coração transbordar de amor. Vocês são minha alegria de viver!

À minha filha Marina (*in memorian*), que embora não esteja mais fisicamente presente ao meu lado, certamente está e sempre estará viva em meu coração. Minha filha que, durante um ano e quatro meses de vida me ensinou o que os livros não trazem, o que a ciência nunca será capaz de comprovar! Por amor à Marina descobri a força que existia dentro de mim, aprendi a ir à luta e a jamais desistir de um sonho!

À minha mãe Maria de Lourdes e ao meu pai Enétson*(in memorian)* por me amarem tanto, por se dedicarem tanto... Certamente, muito do que eu sou, é fruto do amor que recebi de vocês.

À Vilma da Silva, "Dadá", por cuidar dos meus filhos, da minha casa, da minha família com tanto amor! Obrigada "Dá", por estar ao meu lado, durante tantos anos, seu apoio tem sido fundamental para mim!

À minha irmã Karine, meu cunhado André, meu sobrinho Murilo por fazerem parte da minha história, me amarem e torcerem tanto por mim.

Ao professor Dr. ElisardoCorral Vasquez, por tanta dedicação à pesquisa, pela maneira brilhante com que exerce seu ofício, mas sobretudo, por ser tão humano, sensível, amoroso, cuidadoso e especial. Certamente a sua presença fez com que minha caminhada fosse muito mais tranquila, realizada e feliz no Mestrado! Conviver com o senhor, professor, é um privilégio, uma alegria, uma bênção de Deus! Obrigada por ser mais que um mestre, por ter se tornado um grande amigo e, em muitos momentos, um pai!

À professora Dra. Silvana dos Santos Meyrelles, por compartilhar do seu conhecimento e experiência com todos os alunos que estão ao seu redor. Obrigada professora, pelo acolhimento e amizade!

Aos professores Dra. Ágata Lages Gava, Dra. Bianca PrandiCampagnaro,Dr. Ms.Iêda Kalil, Dr. Tadeu Uggere Andrade, Dr. Thiago de Melo,por toda contribuição em cada fase desse projeto. Certamente, há muito de cada um de vocês nesse trabalho.

Ao meu colega de pesquisa Marcos Leal, por me ensinar pacientemente os protocolos e estar ao meu lado desde o início dessa caminhada.

Às minhas companheiras de viagem, Ananda Tissianel Dias e Marcella Porto, pelo apoio e amizade.

A todos os colegas da UVV e do laboratório de Fisiologia Translacional – UFES pelo companheirismo, ajuda e por todas as experiências de vida compartilhadas. Agradeço especialmente às alunas Amanda Cintra e Jéssica CararoFrossard pela ajuda na coleta dos dados. Eu aprendi muito com cada um de vocês!

A todos os professores que fizeram parte da minha vida, desde meus primeiros anos de estudo em Aimorés, às minhas graduações, pós-graduações e mestrado.

À minha amiga e companheira de "jugo" Sandra Costa, por me sustentar em oração, por sua amizade verdadeira e incondicional.

À Cíntia, Cleidiane, Vanelle, Gabriela, Lysa, Suelem, Anicelle, Marta e todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui.

À FAPES pela bolsa de estudosa mim concedida para este mestrado (Termo de Outorga 1108/2013 – Processo 649000878)eà CNPq pela bolsa de produtividade do orientador deste projeto.

Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Mudaste o meu pranto em dança,
a minha veste de lamento em veste de alegria,
para que o meu coração cante louvores a ti e não se cale.
Senhor, meu Deus, eu te darei graças para sempre.”
Salmos30:11-12

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS x
LISTA DE TABELAS xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES xii
RESUMO xiv
ABSTRACT xv
1 INTRODUÇÃO 16
1.1 Doenças cardiovasculares 16
1.2 Hipertensão arterial 17
1.2 1 Função endotelial na hipertensão arterial 18
1.3 Óxido nítrico 21
1.4 Estresse oxidativo 22
1.5 Probióticos 23
1.5.1 Kefir 24
2 JUSTIFICATIVA 26
3 OBJETIVOS 27
3.1 Geral 27
3.2 Específicos 27
4 MATERIAS E MÉTODOS 28
4.1 Animais experimentais 28
4.2 Preparação do kefir 28
4.3 Grupos experimentais e tratamento de animais 29
4.4 Análise microbiológica do kefir 31
4.5 Microscopia eletrônica de varredura dos grãos de kefir 31
4.6 Medida direta de parâmetros hemodinâmicos 32
4.7 Protocolos de reatividade vascular 33
4.7.1 Avaliação da função vascular da aorta 33
4.7.2Avaliação da viabilidade dos anéis e teste do endotélio 33
4.7.3 Avaliação da função endotelial no relaxamento vascular 33
4.7.4 Avaliação da participação do óxido nítrico no relaxamento vascular 34
4.7.5 Avaliação da sensibilidade do músculo liso ao óxido nítrico 34
4.7.6 Participação das espécies reativas de oxigênio na resposta à acetilcolina 34

4.7.7 Verificação das respostas obtidas na reatividade vascular 34
4.8 Análises pela citometria de fluxo 34
4.8.1Avaliação das células progenitoras endoteliais 34
4.8.2 Isolamento das células 35
4.8.3 Análise da viabilidade celular 35
4.8.4 Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigêniono arco da aorta 36
4.8.5 Detecção de óxido nítrico intracelular 37
4.9 Microscopia eletrônica de varredura da aorta 37
4.10 Análise estatística 38
5 RESULTADOS.....39
5.1 Microbiologia dos grãos de kefir.....39
5.2 Microscopia dos grãos de kefir.....39
5.3 O tratamento com kefir promove redução da pressão arterial e da frequência cardíaca 40
5.4 Avaliação dos efeitos benéficos do kefir sobre a disfunção endotelial em aortas de animais SHR 41
5.5 Mecanismos da disfunção endotelial em SHR: o papel das espéciesreativas de oxigênio.....42
5.6 Contagem de células endoteliais e a produção de EROs intracitoplasmática no arco aórtico.....44
5.7 Mecanismos de disfunção endotelial no SHR: o papel do óxido nítrico 45
5.8 Análise por microscopia eletrônica de varredura da integridade do endotélio.....47
5.9 Recrutamento de células progenitoras endoteliais circulantes.....48
5.10 Efeitos do kefir sobre o relaxamento independente do endotélio.....48
6 DISCUSSÃO 50
7 CONCLUSÃO 58
8 REFERÊNCIAS.....59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema representativo de substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio vascular intacto e suas repercussões na circulação sistêmica e no músculo liso vascular.	20
Figura 2	Estrutura da NADPH Oxidade (Gardineret al., 2013).	23
Figura 3	Esquema representativo da preparação do Kefir.	39
Figura 4	Registro típico da medida da PA e FC de ratos normotensos.	30
Figura 5	Fotomicrografias de grãos de kefir: A- grãos de kefir vistos a olho nu.	40
Figura 6	Análise do efeito curso temporal do tratamento com kefir sobre parâmetros hemodinâmicos em animais SHR.	41
Figura 7	Efeito de curso temporal da administração de kefir na disfunção endotelial de animais SHR.	42
Figura 8	Avaliação da contribuição das EROs.	43
Figura 9	Alterações curso-temporais de EROs e células endoteliais de aorta em ratos hipertensos tratados com kefir.	45
Figura 10	Contribuição da biodisponibilidade do óxido nítrico na disfunção endotelial em SHR tratados com kefir durante 60 dias.	47
Figura 11	Microscopia eletrônica de varredura mostrando a estrutura endotelial representativa de aorta de rato Wistar normotenso, SHR veículo e SHR tratado com kefir durante 60 dias.	48
Figura 12	Efeito temporal da administração de kefir no relaxamento independente do endotélio em SHR.	49
Figura 13	Benefícios do kefir na hipertensão arterial.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Isolamento dos microorganismos presentes nos grãos deKefir utilizadosnoestudo. 32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

SHR - Ratos espontaneamente hipertensos

ACh - Acetilcolina

ERO - Espécies reativas de oxigênio

NOS - Óxido Nítrico Sintase

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO - Óxido nítrico

DC - Doenças cardiovasculares

DCNT - Doenças crônicas não transmissíveis

WHO -World Health Organization

DAC - Doença arterial coronariana

AVE - Acidente vascular encefálico

DVP - Doença cardiovascular periférica

SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia

HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica

TxA_2 -Tromboxano A_2

PGH_2 - Prostaglandinas H_2

$PGF_{2\alpha}$ - Prostaglandinas $F_{2\alpha}$

EDHF - Fator relaxante derivado do endotélio

DE - Disfunção endotelial

EDRF - Fator relaxante derivado do endotélio

NOSE - Óxido nítrico sintase endotelial

ADP - Adenosina difosfato

AA - Ácido araquidônico

ANOVA - Análise de Variância

BH4 - Tetrahidrobiopterina

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

COX -Ciclooxigenase

cGMP - 3’, 5’ monofosfatoguanosina cíclico

CTNBIO - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

DHE - Dihidroetídio

eNOS - Óxido Nítrico Sintase endotelial

EET - Ácidos poxieicosotrianoicos

EPM - Erro padrão da média

FDE5:fosfodiesterase de tipo 5

FE: Fenilefrina

GC: Guanilatoclicase

GCs:guanilatociclase solúvel

GTP: Guanosina trifosfato

IFNγ: Interferongamma

IL-6: Interleucina

L-NAME: N-G-nitro-L-arginina metil ester

L-arg: L-arginina

MS: Ministério da Saúde

NPS:nitroprussiato de sódio

●O_2^- : ânion superóxido

$ONOO^-$:Peroxinitrito

PDE: fosfodiesterase

PDE5: fosfodiesterase 5

pEC_{50}: $-logEC_{50}$

PGI_2:prostaciclina; desmutase

Rmáx: Resposta máxima

SBC: Sociedade Brasileira de Cardiologia

SOD: superóxido

EPC: células progenitoras endoteliais

CD31: Marcador de célula endotelial

CD117: marcador de célula indiferenciada

RESUMO

FRIQUES, Andreia Gomes Freitas, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, outubro de 2015. **Efeitos do kefir na reatividade vascular de ratos espontaneamente hipertensos com disfunção endotelial.** Orientador: Elisardo Corral Vasquez.

Introdução: Tem sido demonstrado os efeitos benéficos para várias doenças, de uma bebida obtida através da fermentação de leite com grãos de kefir, uma matriz complexa contendo bactérias ácidas e leveduras. No entanto, seus efeitos sobre a hipertensão arterial e disfunção endotelial ainda não estão claros. Neste estudo, foram avaliados os efeitos de kefir em células endoteliais e capacidade de resposta vascular em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). **Métodos:** Animais SHR foram tratados com kefir (0,3 mL/ 100 g), durante 7, 15, 30 e 60 dias e comparados com SHR não tratados e ratos normotensos Wistar. A função endotelial vascular foi avaliada em anéis de aorta, através da resposta de relaxamento à acetilcolina (ACh). O equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e a óxido nítrico (NO) sintase foi avaliado através de bloqueadores específicos nas respostas induzidas por ACh e através de citometria de fluxo no tecido vascular. **Resultados:** Efeitos significativos do kefir foram observados somente após o tratamento por 60 dias. A pressão arterial elevada e a taquicardia exibidas pelo SHR foram atenuadas em aproximadamente 15% no grupo de ratos SHR-kefir. O relaxamento deficiente induzido por ACh dos anéis aórticos observados nos SHR (37 ± 4%, em comparação com os ratos Wistar: 74 ± 5%), foi atenuado de forma significativa no grupo SHR tratados cronicamente com kefir (52 ± 4%). A diferença na área abaixo da curva antes e depois do bloqueio da NADPH-oxidase ou bloqueio da NO-sintase em anéis de aorta de ratos SHR foram de cerca de +90% e -60%, respectivamente, quando comparados com os ratos Wistar. Nos anéis de aorta do grupo SHR-kefir, estes valores foram reduzidos a + 50% e -40%, respectivamente. A análise de citometria de fluxo de células endoteliais da aorta revelou aumento da produção de EROs e diminuição da biodisponibilidade do NO no SHR, que foram significativamente atenuadas pelo tratamento com o kefir. A microscopia eletrônica de varredura mostrou lesão endotelial na superfície vascular dos SHR, o que foi parcialmente atenuado pela administração de kefir por 60 dias. O recrutamento de células progenitoras endoteliais foi diminuído em SHR não-tratados e parcialmente restaurado pelo tratamento com kefir. **Conclusão:** O tratamento com Kefir por 60 dias foi capaz de melhorar a função endotelial em SHR através da melhora parcial do desequilíbrio entre EROs/NO e a arquitetura endotelial através do recrutamento de células progenitoras.

Palavras-chave: Probióticos. Hipertensão arterial.SHR. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

FRIQUES, Andreia Gomes Freitas, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, october 2015. **Kefir effects on vascular reactivity of spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction.** Advisor: Elisardo Corral Vasquez.

Background: The beverage obtained by fermentation of milk with kefir grains, a complex matrix containing acid bacteria and yeasts, has been shown to have beneficial effects in various diseases. However, its effects on hypertension and endothelial dysfunction arenot yet clear. In this study, we evaluated the effects of kefir on endothelial cells and vascular responsiveness in spontaneously hypertensive rats (SHR).**Methods:**SHR were treated with kefir (0.3 mL/100 g) for 7, 15, 30 and 60 days and compared with non-treated SHR and with normotensive Wistar-Kyoto rats. Vascular endothelial function was evaluated in aortic rings through the relaxation response to acetylcholine (ACh). The balance between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) synthase was evaluated through specific blockers in the ACh-induced responses and through flow cytometry in vascular tissue. **Results:**Significant effects of kefir were observed only after treatment for 60 days. The high blood pressure and tachycardiaexhibited by the SHR were attenuated by approximately 15% in the SHR-kefir group. Theimpaired ACh-induced relaxation of the aortic rings observed in the SHR (37±4%, compared to the Wistar rats: 74±5%), was significantly attenuated in the SHR group chronically treated with kefir(52±4%). The difference in the area under the curve between before and after the NADPH oxidase blockade or NO synthase blockade of aortic rings from SHR were of approximately +90% and -60%, respectively, when compared with Wistar rats. In the aortic rings from the SHR-kefir group, these values were reduced to +50% and -40%, respectively. Flow cytometric analysis of aorticendothelial cells revealed increased ROS production and decreased NO bioavailability in the SHR, which were significantly attenuated by the treatment with kefir. Scanning electronic microscopy showed vascular endothelial surface injury in SHR, which was partially following administrationof kefir for 60 days. In addition, the recruitment of endothelial progenitor cells was decreased in the non-treated SHR and partially restored by kefir treatment.**Conclusions:** Kefir treatment for 60 days was able to improve the endothelial function in SHR by partially restoring the ROS/NO imbalance and the endothelial architecture due to endothelial progenitor cells recruitment.

Key Words: Probiotics. Arterial Hypertension. SHR. Oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares

A prevalência dasdoenças crônicas não transmissíveis (DCNT),como as doenças cardiovasculares (DC), diabetes, câncer e as doenças respiratórias crônicas, tem crescidoem decorrência da transição demográfica, nutricional e epidemiológica ocorrida em nível mundial.A Organização Mundial da Saúde (OMS),vem alertando sobre a gravidade desse problema, que embora possua diversos componentes que podem ser prevenidos, de maneira geral, tem sidomuito negligenciado. As DCNT tornaram-se responsáveis por milhares de mortes no planeta, e resultaram em 63% dos óbitos registrados no mundo no ano de 2008 (WHO, 2011).

Dentre as DCNTdestacam-se as DC como a principal causa de morte no mundo, representando um problema internacional de saúde pública.Entende-se como DC a doença arterial coronariana (DAC), o acidente vascular encefálico (AVE) e a doença cardiovascular periférica (DVP), infarto agudo do miocárdio (IAM), aterosclerose, entre outras.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, mais de 30% dos óbitos registrados no ano de 2008em todo o mundo, foram relacionados às diversas formas de eventos cardiovasculares. Das 57 milhões de mortes globais naquele ano, 63% referiram-se às DCNT, sendo que 29% desses óbitos ocorreram em países de baixa e média renda e em indivíduos com idade inferior a 60 anos. Segundo a WHO (2011), 80% das doenças cardíacas, AVE e diabetes poderiam ser prevenidos (Saúde Brasil, 2010;WHO, 2011).

No Brasil, estima-se que, em média, 300 mil pessoas morrem anualmente devido às DC: uma morte a cada 2 minutos (SBC, 2012). Em2009, 66,6% dos óbitos ocorridos no país foram ocasionados pelas DCNT’ssendo que as DC, corresponderam a 31,3% do total.Apesar de se observar uma queda na mortalidade por DC nos últimos anos (MANSUR *et al*., 2012), elas ainda são a principal causa de morte no Brasil e no mundo, sendo responsáveis por 17,3 milhões de mortes por ano, um número que tende a crescer para > 23,6 milhões em 2030, ultrapassando as doenças transmissíveis, maternas e às relacionadas à desnutrição (Saúde Brasil, 2010; WHO 2011).

É importante ressaltar que, asDCsão uma das principais causas de permanência hospitalar prolongada e respondem pela principal alocação de recursos públicos em hospitalizações no Brasil (CASTRO *et al.,* 2004).

1.2 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença crônica, deetiologia multifatorial, determinada por elevados níveis de pressão sanguínea nas artérias,fazendo com que o coração exerça um esforço maior que o normal para circular o sangue através dos vasos sanguíneos.A HAStornou-se um grave problema de saúde mundial e éconsiderada um importante fator de risco cardiovascular, especialmente nos países em desenvolvimento (ANADO, *et al*.,2010).Trata-se de uma doença de alto risco e difícil controle, sendo responsável por grande frequência de internações hospitalares, por gerar custos médicos e socioeconômicoselevados, relacionados, especialmente, às suas complicações:doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca,insuficiência renal crônica e doença vascular periférica.

As VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, publicadas no ano de 2010, informam que aproximadamente 25% da população mundial adulta, tem hipertensão arterial e estima que até 2025 a prevalência pode aumentar para 29%. Em relação ao Brasil, em diversas cidades, a hipertensão já acomete 30% dos adultos.

De acordo com a American Heart Association,o VIII Joint NationalComitee e as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, os níveis pressóricos considerados normais para adultos são inferiores a 140 mmHg de pressão arterial sistólica e a 90 mmHg de pressão arterial diastólica (ZIPES *et al.,* 2006; JAMES *et al.*, 2014), ou seja, valores mais altos caracterizam a HAS.

Embora não haja evidências claras sobre a origem da hipertensão primária, também chamada de essencial, comum em cerca de 95% dos indivíduos hipertensos, sabe-se que há uma relação entre fatores genéticos e ambientais, como tabagismo, sedentarismo e alimentação inadequada, na etiologia da doença. Dentre os componentes ambientais, a dieta tem sido apontada como um dos principais fatores modificáveis, no sentido de prevenir a nível primário e secundário, a hipertensão arterial (ZHANG *et al.*, 2003).

1.2.1 Função endotelial na hipertensão arterial

No passado, imaginava-se que o papel do endotélio vascular resumia-se apenas em ser uma monocamada de células que separava o sangue circulante da parede dos vasos. Porém, sabe-se que esse é um órgão estrategicamente localizado com inúmeras funções endócrinas, autócrinas e parácrinas, entre elas: atuar como sensor de alteraçõeshemodinâmicas;transmitir sinais que recebe decélulas e da matriz extracelular;produzir mediadores que interferemcom crescimento, atividade,migração e morte de células;manter as alterações adaptativasde forma que elas se adequem àsexigências circulatórias.O endotélio tem inúmeros e importantes papéis em eventos fisiológicos efisiopatológicos, como na hipertensão arterial (CARVALHO*et al.,* 2001; GROVER-PAÉZ *et al.,* 2009, BALARINI*et al.,* 2013; TEIXEIRA *et al.,* 2014).

Uma importante função do endotélio é modular o lúmen vascular através do controle da dilatação e contração locais em resposta a alterações do fluxo sanguíneo ou a agentes vasoativos e do compartimento adjacente da musculatura lisa vascular (DAVIGNON *et al.,* 2004; FERREIRA *et al.,*2011; MELO *et al.,* 2014).

O endotélio controla o tônus damusculatura lisa vascular através da produçãode mediadores que podem produzirvasodilatação ou vasoconstrição. Entre as principais substâncias vasodilatadoras estão o óxido nítrico (NO), a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio que agem sinergicamente para inibir a agregação plaquetária (PROTÁSIO *et al.,* 2005, GROVER-PAÉZ *et al*., 2009). Entretanto, o NO é um dos mais importantes vasodilatadores. Também é capaz de inibir a proliferação das células musculares lisas, impedir o recrutamento, a adesão e a diferenciação de células inflamatórias, a agregação plaquetária e a produção do fator tecidual trombogênico (TEIXEIRA *et al.,* 2014).

O endotélio também produz substâncias vasoconstritoras, como a endotelinae angiotensina II, a qual além de vasoconstrictora é pró-oxidante e estimula a produção de endotelina. Ambas as substâncias trabalham em associação e promovem a proliferação de células musculares lisas.Entre os vasoconstrictores produzidos por esse órgão também estão os produtos do metabolismo do ácido araquidônico como o tromboxano A_2 (TxA_2), as prostaglandinas H_2 e $F_{2\alpha}$ (PGH_2 e $PGF_{2\alpha}$) e o ânion superóxido. Fisiologicamente, existeum equilíbrio entre os fatores capazes de produzir vasodilatação e vasoconstrição. Porém, em situações patológicas, como na hipertensão arterial, esseequilíbrio é alterado resultando em

uma diminuição do relaxamentovascular dependente do endotélio, um processo denominado disfunçãoendotelial (DE) (CARVALHO*et al.,* 2001).

Na DE ocorre um prejuízo funcional do endotélio caracterizado por um desequilíbrio na produção de agentes vasoativos produzindo alteraçãoda vasoconstrição ou vasodilatação e aumento da atividade pró-trombótica e/ou pró-coagulante. Isso resulta na expressão de citocinas e moléculas de adesão designadas para interagir com leucócitos e plaquetas, desencadeando mecanismos inflamatórios direcionados a tecidos específicos e levando ao aumento da permeabilidade endotelial (HANSSON *et al.,* 2005; GIRIBELA *et al.,* 2011).

Os mecanismos envolvidos na DE encontrada na HAS são multifatoriais e, provavelmente, relacionados ao tipo da hipertensão, sua duração, e do leito vascular estudado.Esses mecanismos são: 1)Diminuição na liberação de NO,prostaciclina e/ou EDHF; 2) sensibilidadediminuída do músculo lisovascular ao NO, prostaciclina e/ouEDHF; 3) disfunção na via de transduçãode sinais dos fatores relaxantesendoteliais; 4) aumento da produção dePGH2,tromboxano A2, endotelina-1 e/ou dos ânions superóxido (CARVALHO *et al.,* 2001). Embora todos esses fatores sejam descritos, o mecanismo de maior relevância e mais estudado no processo multicausal da DE, refere-se às alterações na regulação do lúmen dos vasos e a redução da atividade biológica do óxido nítrico(PEPINE *et al*., 2009).

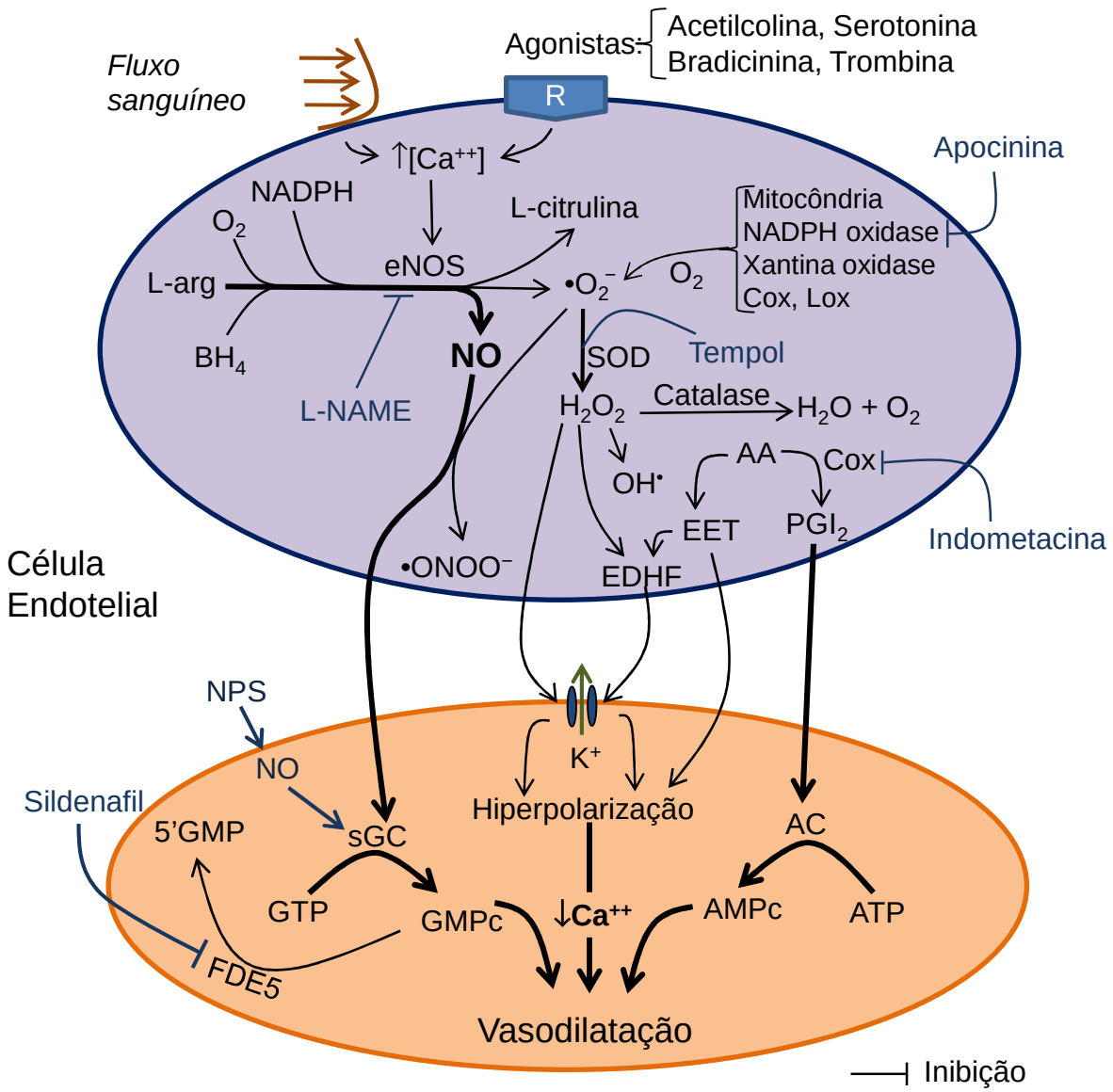


Figura 1.Esquema representativo de substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio vascular intacto e suas repercussões na circulação sistêmica e no músculo liso vascular(adaptado de Meyrelleset al., 2011).

A disfunção endotelialtem sido observada em todas as formas de hipertensão arterial, inclusive nos modelos murinos de doenças cardiovasculares. Esta é geralmente caracterizada por uma diminuição da resposta vasodilatadora à acetilcolina no vaso isolado (ARRUDA *et al.,* 2005; PEREIRA*et al.,* 2010; MEYRELLES *et al.,* 2011, BALARINI *et al.,* 2013).

Desde o desenvolvimento dos ratos espontaneamente hipertensos(SHR), por Okamotoe Aoki em 1963, este é o modelo animal mais utilizado nos estudos sobre a hipertensão, por apresentar características fisiopatológicas que se assemelham aos aspectos fundamentais da doença.Sua importânciatem sido creditada à similaridade dasua fisiopatogenia com a hipertensão essencial primária do homem.A hipertensão

do SHR adulto estáassociada a um aumento da resistênciaperiférica total e um débito cardíaconormal ou diminuído e aumento da atividade simpática. Com odesenvolvimento da hipertensãoarterial, o SHR apresenta umaprogressiva hipertrofia cardíaca.Estudos mostramque nos SHRs as alterações das propriedadesfuncionais precedem aodesenvolvimento da hipertensãoarterial e que a redução da distensibilidadee complacência vascular nosanimais jovens resultam de uma hipertrofiada camada média, em vez dealterações intrínsecas das propriedadeselásticas dos vasos, conforme Figura 1 (CARVALHO*et al.,* 2001;FAZAN*et al.,*2001;LAWES*et al.*, 2001; KATO *et al.,* 2015).

1.3 Óxido nítrico

Furchgott e Zawadzki em 1980, descobriram que o endotélio liberava uma substância denominada, Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF), um potente vasodilatador, capaz de relaxar a musculatura lisa vascular (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Algum tempo depois, observou-se que se tratava de um radical livre biatômico, chamado óxido nítrico (NO) (PALMER *et al.*, 1987;MARIN & RODRIGUEZ- MARTINEZ, 1995).

Estímulos físicos (como o estiramento vascular produzido por aumento da pressão arterial, estresse de cisalhamento (*shear stress*)) e químicos (histamina, catecolaminas, aldosterona, vasopressina, bradicinina, agregação plaquetária, adenosina difosfato (ADP), serotonina, acetilcolina, entre outras) estimulam a biossíntese do óxido nítrico. Esse processo é realizado por uma enzima dimérica, a óxido nítrico sintase (NOS), quecontém um grupamento heme e requeras flavinas FAD e FMN, bem como ocofator pteridina (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterina (BH4biopterina)para catalisar a oxidação da L-arginina.Através da ação da NOS, a L-arginina é convertida em L-citrulina e NO (MARÍN & RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, 1997; DE BATISTA *et al.,* 2014; LAI & KAN, 2015).

O NO é considerado um dos fatores mais importantes na regulação do tônus vascularpela sua relevante capacidade vasodilatadora. Ele desempenha um papel fundamentalna regulação dotônus vascular e da homeostasia,oque pode ser verificado através devárias observações: 1) a inibição da óxido nítrico sintase (NOS) diminui drasticamentea vasodilatação dependente deendotélio, principalmente nos vasosde condutância; 2) a administraçãoaguda de inibidores da NOS podeproduzir vasoconstrição, enquanto otratamento crônico de ratos com essescompostos induz hipertensão arterial;3) camundongos que não possuem ogene da enzima óxido

nítrico sintaseendotelial (NOSE)apresentam pressão arterial maiselevada que seus controles (CARVALHO*et al.,* 2001).

Através da estimulaçãoda enzima guanililciclase solúvel, levando a um aumento na produçãode GMP cíclico, ocorre o relaxamento da musculatura lisavascular via NO. O GMP cíclico também estimula a quinase dependente deGMP cíclico (PKG) que promove um relaxamentoda musculatura lisa vascular. A PKGpode ativar canais de K^+ induzindohiperpolarização ou estimular a saídade Ca^{2+}do citoplasma da célula. A PKG pode,igualmente, diminuir a sensibilidade damaquinaria contrátil ao Ca^{2+}, diminuindoa contração muscular. É possível ainda, que haja uma ativação decanais de K^+ diretamente pelo NO semenvolver a participação do GMP cíclico. A fosforilação do fosfolambam (PLB), também promove vasodilatação, deixando de inibir a Ca^{+2}-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), aumentando a recaptação de cálcio e a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLCK), diminuindo sua sensibilidade ao Ca^{2+} (CARVALHO*et al.,* 2001; LINCOLN, DEY & SELLAK, 2001; DE BATISTA*et al.,* 2014).

Alguns autores descrevem a produção de NO em ratos SHR como normal, porém, esse NO é altamente degradado pelos elevados níveis de radicais livres circulantes (NAVA, NOLL & LÜSCHER, 1995; BRIONES *et al.*, 2002; DE BATISTA*et al.,* 2014).

1.4 Estresse oxidativo

Halliwell e colegasdescreveram radicais livres como algumas espécies capazes de existir independentemente e que contenham um ou mais elétrons não pareados. O termo espécies reativas de oxigênio (ERO's) refere a uma variedade de moléculas reativas que são derivadas do oxigênio as quais podem ser ânion superóxido (O2•-), óxido nítrico (NO), radical hidroxila (•OH), hipoclorito (ClO-) e peroxinitrito (ONOO-), e também algumas moléculas que não são radicais livres,como o peróxido de hidrogênio (H2O2).

Estas espécies reativas convertidas em radicais, como ozônio (O3), oxigênio singlet (O2) e peróxido de hidrogênio (H2O2) (BEDARD & KRAUSE, 2007)são formadas em um baixo nível durante a execução de funções celulares fisiológicas. De fato, a cadeia transportadora de elétrons localizada na mitocôndria é responsável pela maior parte do superóxido que é gerado pela redução parcial do oxigênio (BOLISETTY,S; JAIMES E.A., 2013). Vários estudos realizados nos últimos anos têm demonstrado que as espécies reativas de oxigênio participam ativamente em

diversos processos biológicos, incluindo o crescimento normal da célula, a diferenciação celular, apoptose e senescência celular (BOLISETTY, S, JAIMES E.A., 2013).

Outros sistemas enzimáticos responsáveis para a geração de ERO's incluem: a NADPH oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, eNOS, isoenzimas docitocromo P450, lipooxigenase, ciclooxigenase, heme oxigenase e glicose oxidase (Cai & Harrison, 2000).A principal fonte de EROs no endotélio parece ser a NADPH oxidase. Estas enzimas utilizam o NADH ou NADPH como substratos (CAI*et al*., 2005; HAMILTON*et al*., 2002; GARRIDO & GRIENDLING, 2009). A NADPH oxidase é composta por uma porção integrada, o citocromo b558, o qual é formado por duas subunidades, uma maior denominada gp91phox e outra menor p22phox, além das subunidades citosólicas regulatórias p67phox, p40phox, p47phox e da proteína de baixo peso molecular rac-1 (Griendling, *et al.*, 2000; Hamilton *et al.,* 2002). A subunidade p22phox é descrita como um componente crítico para a geração vascular de ânions superóxido (McINTYRE*et al.,*1999) Figura 2. Estas enzimas têm a capacidade de transportar elétrons através da membrana plasmática e gerar ânions superóxidos (KOH*et al.,* 2009).

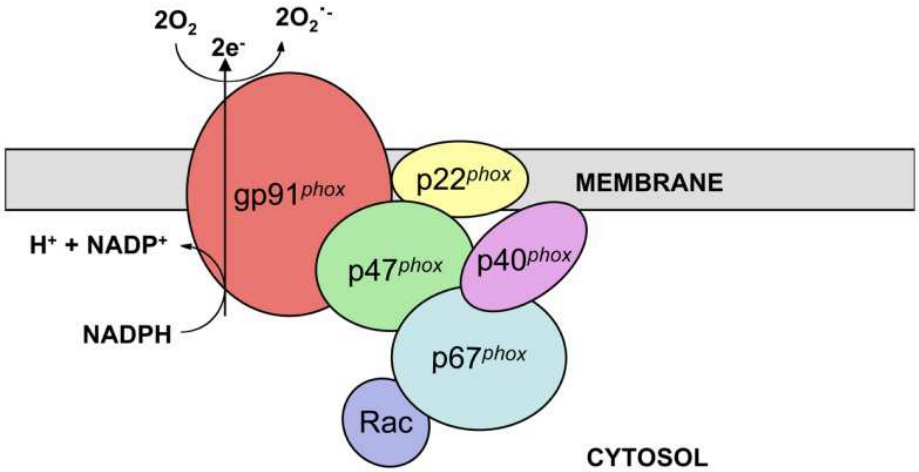


Figura 2. Estrutura da NADPH Oxidade (Gardiner*et al*., 2013).

1.5 Probióticos

A população mundial está cada vez mais preocupada com a saúde e é crescente o interesse pela busca de alimentos mais saudáveis, que promovam o bem-estar. Nesse contexto, desde 1920, vem sendo utilizada a prática de se realizar algum tipo de modificação no alimento para aumentar seu potencial nutritivo. Esse processo foi mais forte inicialmente no Japão, onde, em 1984 cientistasjaponeses utilizaram o termo "alimentos funcionais" paraprodutos alimentícios fortificados com

constituintes especiais que possuíam efeitos fisiológicos adicionais (SIRO *et. al*., 2008).

Diversos autores caracterizam os alimentos funcionais como aqueles capazes de oferecer benefícios à saúde do consumidor adicionais aos inerentes à sua composição nutricional, podendo desempenhar um papel potencialmente importante na redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis (VIEIRA, CORNELIO, SALGADO, 2006; MORAES, F. P.; COLLA, L. M. 2006). Para Candido& Campos (2005), alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis.

Os alimentos funcionais apresentam capacidade de atuar em funções fisiológicas auxiliando na proteção contra doenças crônicas não degenerativas (diabetes, hipertensão, câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose) e infecções microbianas (MORAES, F. P.; COLLA, L. M. 2006).

Um importante grupo de alimentos funcionais são os prebióticos e probióticos. Prebióticos são carboidratos não digeríveis, também chamados de fibras dietéticas, que estimulam seletivamente a proliferação ou a atividade de populações de bactérias desejáveis no intestino. Já os probióticos, são considerados como alimentos ou suplementos alimentares que contenham microrganismos vivos importantes na manutenção do microbioma intestinal e junto com uma alimentação saudável, promovem a saúde. Entre esses produtos, destacam-se os leites fermentados, que são resultantes da fermentação microbiológica do leite (LEITE *et al*., 2013).

1.5.1 Kefir

A palavra kefir é derivada da palavra turca *Keyif*, que significa "bom sentimento". Originada nas montanhas do Cáucaso, a bebida é tradicionalmente consumida na Europa Oriental, Rússia e Sudoeste da Ásia. Porém, nos últimos anos, vem sendo observado um aumento no consumo de kefir em muitos países, o que tem sido relacionado às suas propriedades únicas sensoriais e história associada a efeitos benéficos para a saúde humana (LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006).

No Brasil, o conhecimento desta bebida e seus benefíciosnão são muito difundidos e a fabricação de kefir é exclusivamente artesanal (LEITE*et al*., 2013).Trata-se de uma bebida fermentada pela ação de bactérias e leveduras que estão associadas simbioticamente nos chamados grãos de kefir. De fácil preparo,

apresenta consistência semelhante ao iogurte, sendo ligeiramente efervescente e espumoso (HERTZLER & CLANCY, 2003).

Nos grãos de kefir, podem estar presentes várias espécies de bactérias (gêneros *Lactobacillus*, *Lactococci*, *LeuconostocseAcetobacter),* e leveduras (gêneros *Kluyveromyces, Candida, Torula*, *Saccharomyces*), que coexistem numa associação simbiótica (LOPITZ- OTSOA, 2006).

O kefir, preparado pela fermentação dos grãos em solução aquosa de açúcar mascavo, é uma forma bastante consumida pela população brasileira, mas suas propriedades funcionais ainda são pouco relatadas na literatura. A maioria dos estudos utiliza o kefir tradicional, fermentado em leite. Na literatura, há trabalhos reportando efeitos benéficos do "kefir de leite": na atividade antitumoral (LIU, 2002); como antialérgico (LEE, *et al*.,2007); na melhora da digestão e tolerância à lactose (HERTZLER& CLANCY, 2003); na inibição da proliferação demicroorganismos patogênicos a nível intestinal (GARROTE *et al*., 2000).

O efeito hipocolesterolêmico do kefir também vem sendo estudado e a maioria dos trabalhos aponta para resultados positivos. TAMAI *et al*., 1996, investigaram os efeitos de um kefir-leite produzido por 10 tipos de bactérias ácido-láticas e *Saccaromycescerevisae*na concentração sérica e hepática de lipídeos em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol. O colesterol total e os níveis de fosfolipídeos séricos reduziram significativamente nos ratos suplementados com o leite fermentado. Entretanto, no estudo de ST-ONGE *et al.,* 2002, com humanos, o kefir (leite) não afetou as concentrações de colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos (TG) no sangue dos indivíduos após 4 semanas de tratamento.

A utilização crônica do probióticokefir seria capaz de reduzir o estresse oxidativo e aumentar a biodisponibilidade de NO nas células endoteliais da aorta, resultando em melhora da função endotelial de animais SHR.

2. JUSTIFICATIVA

Em todo o mundo, é crescente o número de casos de pessoas com DCNT, especialmente as DC. O estilo de vida da humanidade nas últimas décadas, estresse, trabalho, alimentação extremamente industrializada e sedentarismo têm contribuído muito para o surgimento de novos casos de DC e agravamentos dos já existentes. Nesse contexto, existe um acentuado interesse mundial para melhorar a qualidade da nutrição e reduzir os gastos com saúde por meio da prevenção de doenças crônicas, da melhoria da qualidade e da expectativa de vida ativa. É crescente a preocupação da população pela busca de um estilo de vida mais saudável.

Dessa forma, fazem-se necessários, estudos sobre alimentos que podem contribuir para uma melhor qualidade de vida, podendo atuar até mesmo como coadjuvante no tratamento farmacológico utilizado em doenças cardiovasculares.

3. OBJETIVOS

3.1Geral

Avaliar os efeitos curso-temporal do Kefir na disfunção endotelial em animais SHR.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com Kefir sobre:

- ✓ Pressão arterial e frequência cardíaca;
- ✓ A reatividade vascular em anéis de aorta:

  Resposta vasodilatadoradepende do endotélio (ACh);

  Influência das EROs na vasodilatação (Apocinina);

  Participação do NO no relaxamento (L-NAME);
- ✓ Nas células endoteliais da aorta:

  Número de células endoteliais;

  Morfologia das células endoteliais;
- ✓ No arco aórtico:

  Produção de EROs (•O-2, ONOO-, H2O2 e NO)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Para a realização desse estudo, foram utilizados ratos machosespontaneamente hipertensos (SHR), com 4 meses de idade. Como grupo controle foi utilizado ratos Wistar com a mesma idade.

Os animais foram fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, e foram utilizados e cuidadosrespeitandotodos os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pela Comissão Nacional de Biossegurança (CNTBIO). O estudo foi realizado, mediante prévia aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Experimentais (CEUA), UFES, protocolo 040/2014.

Os animais foram mantidos em ambiente com iluminação artificial (ciclo claro-escuro de 12h), temperatura de 20-25 ºC e umidade de 70%, de acordo com o recomendado para biotérios de pesquisa. Os animais receberam água e ração *ad libtum*.

4.2Preparação do kefir

Os grãos de kefir,provenientes da Universidade Vila Velha – ES e gentilmente cedidos por Célia Regina (Universidade Federal de Viçosa), foram adicionados em leite integral, tipo C. Utilizou-se uma proporção de 4% ou seja, 40 gramas de grãos para 1 litro de leite. O leite inoculado com os grãos foi mantido em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, o kefir foi filtrado com em uma peneira plástica. O leite fermentado proveniente da filtração, foi mantido sob refrigeração entre 5ºC a 15º C durante 24horas para que as leveduras crescessem e multiplicassem. Ao término desse processo, o Kefir foi fracionado em tubos "falcon" e acondicionado em freezer à -20º C (FERREIRA, 2005), conforme figura 3.

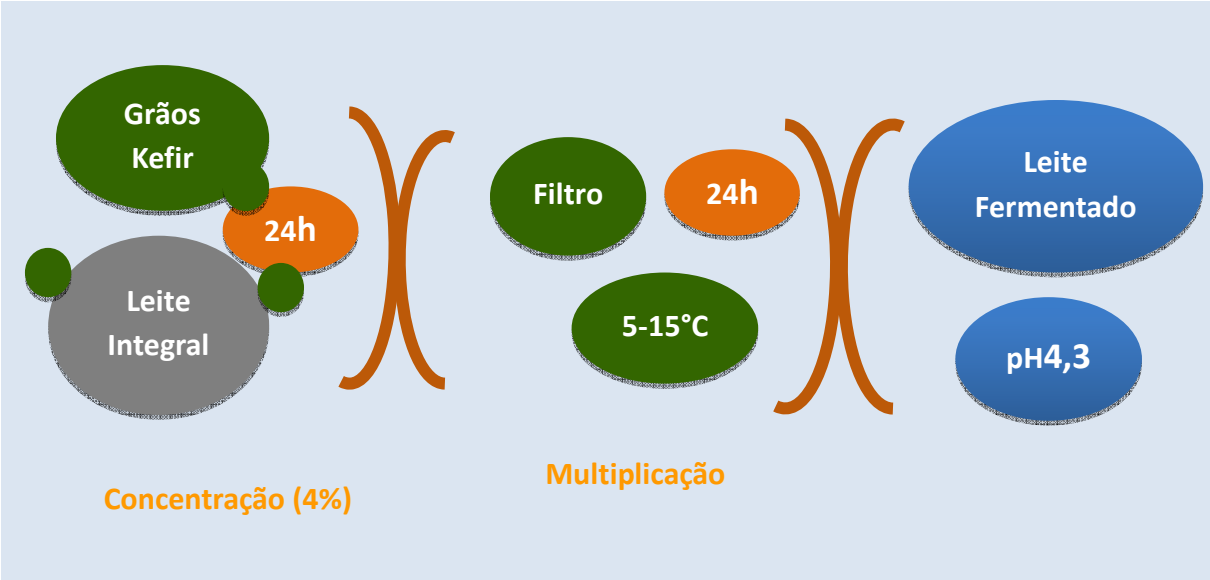
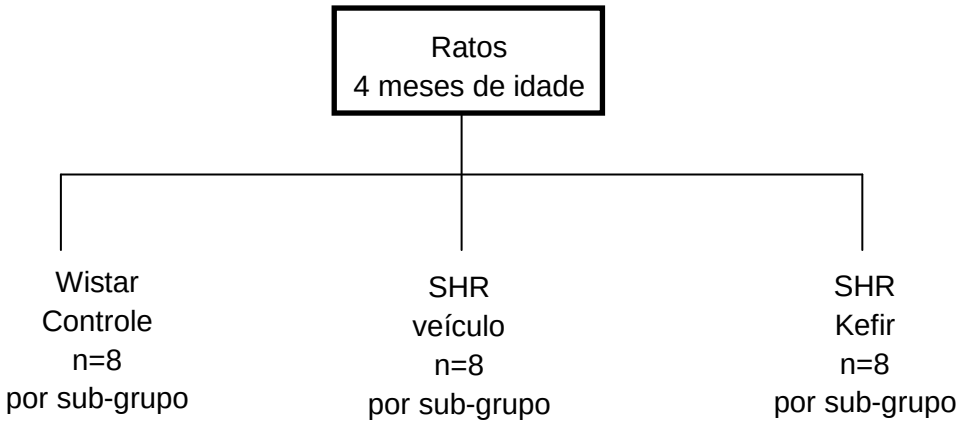


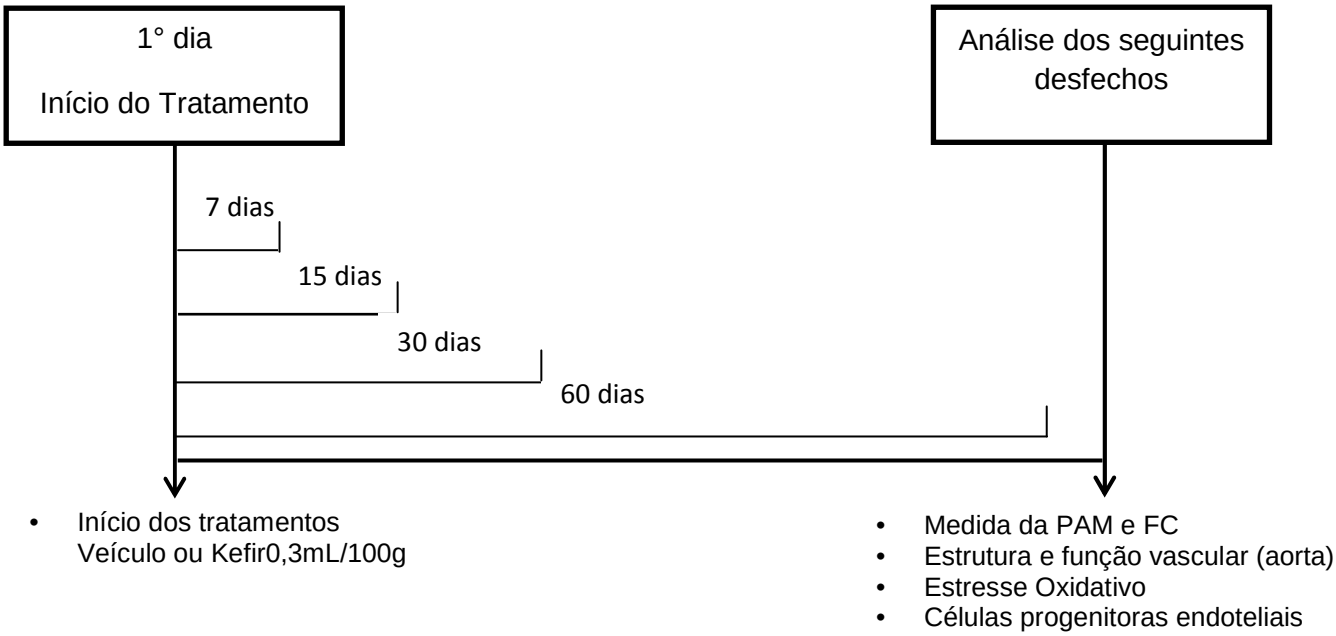
Figura 3. Esquema representativo da preparação do Kefir.

4.3 Grupos experimentais e tratamento de animais

Os animais SHR foram divididos em dois grupos, ratos SHR tratados com veículo (SHR-veí) e ratos SHR tratados com Kefir (SHR-Kefir) na dose de 0,3mL/100g.Como grupo controle foi utilizado ratos Wistar com a mesma idade. Os animais SHR-veí e Wistar, receberam como veículo leite UHT integral com o pH ajustado para 4,3. Os animais foram tratados por 7, 15, 30 e 60 dias por via oral (gavagem).



Os experimentos foram realizados de acordo com o cronograma apresentado:



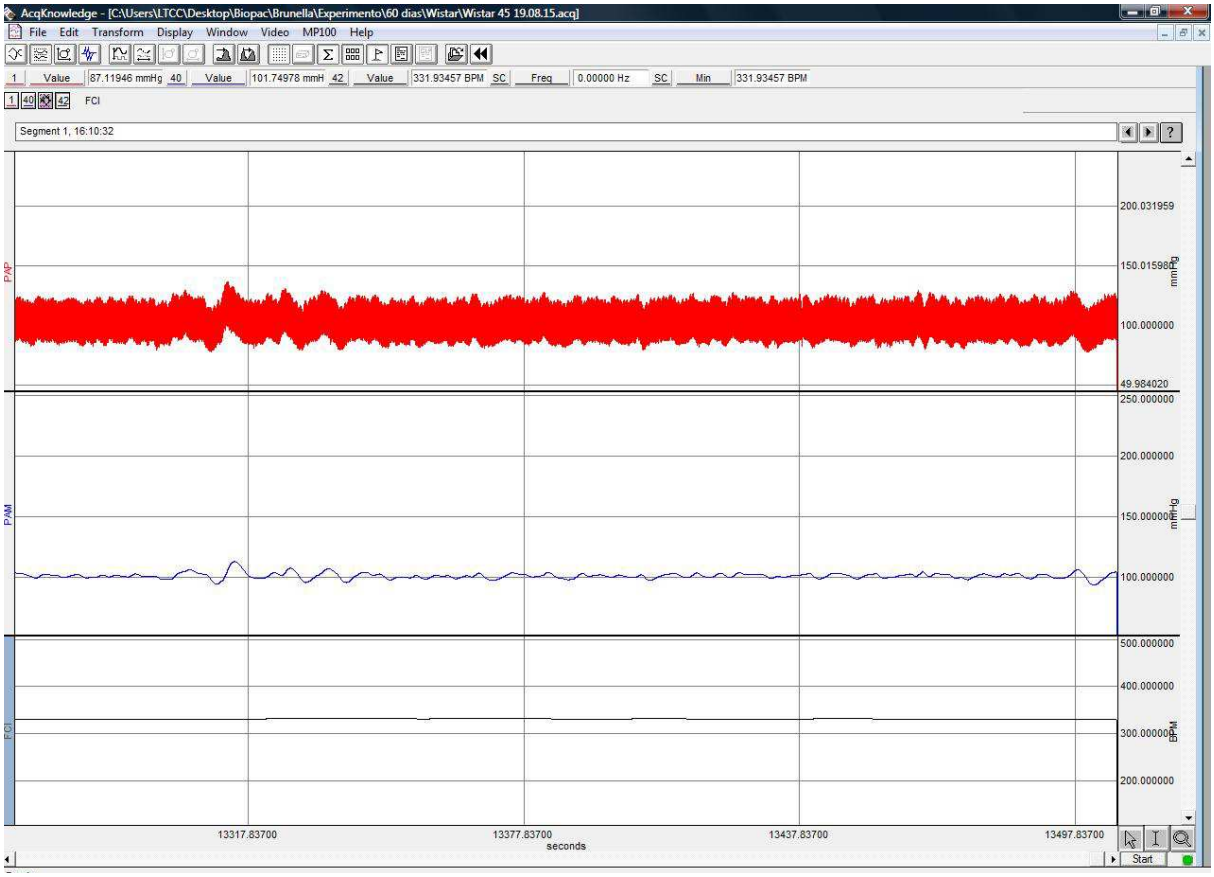


Figura 4. Registro típico da medida da PA e FC de ratos normotensos.

4.4Análise microbiológica do kefir

O processo de isolamento dos micro-organismos presentes no kefir foi realizado por meio de inoculação de uma alçada do produto em diferentes meios de cultura, sob condições específicas de temperatura, atmosfera e tempo, como segue na tabela abaixo:

Meio de cultura	**Temperatura**	**Atmosfera**	**Tempo**
Agar Acetobacter (glicose) com 2% de etanol	30°C	Aerobiose	96h
Agar Nutriente	37°C	Aerobiose	24 a 48h
Agar MRS	37°C	Aerobiose	24 a 48h
Agar MRS	37°C	Anaerobiose	48h
Agar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol	25°C	Aerobiose	120h
Agar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol	37°C	Aerobiose	24 a 48h

Tabela 1. Isolamento dos microorganismospresentes nos grãos de Kefir utilizados no estudo.

Em seguida, foram feitas repicagens para os isolamentos dos diferentes morfotipos e classificação de acordo com a coloração de Gram e testes de catalase, coagulase, oxidase e bile-esculina (WITTHUHN*et al*., 2003; BERGMANN*et al.*, 2010).

Após as definições das cepas, estas foram semeadas em galerias API (BioMérieux, França) para a identificação das espécies, com o auxílio do software do kit API (WITTHUHN *et al*., 2003; BERGMANN *et al.*, 2010).

4.5 Microscopia eletrônica de varredura dos grãos de kefir

Os grãos de Kefir foram processados conforme descrito por Magalhães, et al., 2011. Após o preparo dos grãos, eles foram fixados em Glutaraldeído 2,5%, Formaldeído 2% e tampão cacodilato 0,1 M durante 48 horas, após este período foram mantidos em uma solução de pós-fixação contendo tetróxido de ósmio 1%, tampão cacodilato 0,1 M e ferrocianeto de potássio 1,25%, em câmara escura, por um período de 1 hora. Posteriormente, foi feita a lavagem com tampão cacodilato 0,1M e água MiliQ. Após o processo de lavagem foi realizada a desidratação dos grãos com álcool em concentrações crescentes. Depois os grãos foram submetidos a secagem pelo ponto crítico com CO_2. Depois de secas as amostras foram

montadas em “*stubs*”e submetidas a uma camada de ouro no equipamento a vácuo, depois de receber a fina camada de ouro os “*stubs”* foram visualizados no microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV, Jeol Inc. USA). As imagens foram realizadas em diferentes aumentos.

4.6 Medida direta de parâmetros hemodinâmicos

Para a realização da medida direta da pressão arterial médiarealizou-se a canulação da artéria femoral. A cânula utilizada foi confeccionada com tubos de polietileno PE-10 (*IntramedicPolyethyleneTubing*, *Clay Adams*, *Becton, Dickinson andCompany*, Nova Jérsei, EUA) com comprimento de 2,5 a 3,5 cm, soldados com outro tubo de polietileno PE-50 com comprimento de 12 a 16 cm. Previamente à canulação, as cânulas de polietileno foram preenchidas com solução fisiológica e em seguida uma das suas extremidades livres foi obstruída com um pino metálico. Após anestesia com Ketamina (80 mg/Kg i.p) e Xilazina (10 mg/Kg i.p)através de injeção intraperitoneal, os animais foram submetidos a uma incisão na face ventral da pata traseira direita, onde a artéria femoral foi dissecada e exposta. A artéria foi cateterizada com PE-10 e as porções PE-50 foram transpassadas por sob a pele do dorso onde as extremidades destas cânulas foram exteriorizadas e fixadas por meio de fios de sutura.

Após a cirurgia e antes que fossem instrumentados para realização dos registros, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais mantidas na sala de experimentos sob condições de temperatura e luminosidade controladaspara recuperação. Durante este período continuaram recebendo água e ração *ad libitum*.Os parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial e FC foram obtidos através da onda de pulso arterial detectada por um transdutor de pressão (TSD 104A, *BIOPAC Systems, Inc.,* Califórnia, EUA) conectado ao sistema de aquisição de dados biológicos (MP 30 *BIOPAC Systems, Inc*., Califórnia, EUA), utilizando taxa de amostragem de 2000 amostras/segundo. Esses dados eram enviados ao computador e processados, como pode ser observado em um dos registros obtidos no presente estudo. (Figura 4)

Após um período de estabilização de 30 minutos foram registradas as ondas de pulso arterial, a partir da qual foi obtida a pressão arterial sistólica (PAS), a pressão arterial diastólica (PAD) e a pressão arterial média (PAM), e também as medidas de frequência cardíaca (FC). Este protocolo foi realizado com a finalidade

de avaliar os efeitos do tratamento com Kefir sobre os valores pressóricos e de frequência cardíaca dos animais hipertensos.

4.7 Protocolos de reatividade vascular

4.7.1 Avaliação da função vascular da aorta

Para estudo da reatividade vascular os animais foram anestesiados com tiopental sódico (200mg/kg, i.p., Cristalia, São Paulo, Brasil), os animais foram submetidos à toracotomia para exposição do coração e aorta, que após serem retirados foram acondicionados em placa de petri contendo solução nutridora de Krebs para retirada do tecido conjuntivo, posteriormente foram feitos anéis de aorta com aproximadamente 4mm. Estes anéis foram gentilmente colocados em triângulos de aço inoxidável e mantidos em cubas contendo solução nutridora de Krebs modificada (concentrações em mM: NaCl 115, KCl 4,7, $CaCl_2.2H_2O$ 2,5 $MgSO_4.7H_2O$ 1,2, KH_2PO_4 1,2, $NaHCO_3$ 25, EDTA 0,1, glicose 11,1), pH 7,4 a 37°C e constantemente aerada por mistura carbogênica contendo 95% O_2 e 5% CO_2, que foi trocada a cada 30 minutos (exceto durante os procedimentos farmacológicos). Os anéis foram conectados a um transdutor de força acoplado a um sistema de aquisição dados conectado a um computador para aquisição e registro dos dados obtidos.

As respostas vasculares frente à administração de agentes vasoativos foram captadas por um sistema de aquisição de dados (BIOPAC Systems, Santa Barbara, EUA) e plotadas em curvas de variação de tensão em função da concentração das drogas administradas.

4.7.2 Avaliação da viabilidade dos anéis e teste do endotélio

Os anéis foram constantemente mantidos a uma tensão basal de 1 grama e após o período de estabilização os anéis foram submetidos a contração máxima após a incubação com KCl 125 µM por um período de 30 minutos, sendo este considerado padrão ouro para avaliação de contração máxima vascular neste tipo de estudo. Os anéis foram considerados viáveis quando a contração máxima atingia, no mínimo, o dobro do valor basal de tensão.

4.7.3 Avaliação da função endotelial no relaxamento vascular

A avaliação da função endotelial foi realizada por meio da construção de uma curva de relaxamento dos anéis frente à administração de doses crescentes de ACh (1ηM a 30 µM), realizada após pré-contração com Phe (10^{-5}).

4.7.4 Avaliação da participação do óxido nítrico no relaxamento vascular

Para efeitos de avaliação da participação do óxido nítrico na disfunção endotelial presente em animais SHR realizou-se a construção de uma curva de relaxamento com ACh (1ηM a 30 µM), em anéis pré-incubados com inibidor padrão não seletivo da enzima óxido nítrico sintaseN^G-nitro-L-arginina metil ester (L-Name, 100µM).

4.7.5 Avaliação da sensibilidade do músculo liso ao óxido nítrico

A sensibilidade do músculo liso ao óxido nítrico foi avaliada por meio da construção de uma curva de relaxamento frente a concentrações crescentes do doador deNO, onitroprussiato de sódio, (NPS, 1ηM a 30 µM).

4.7.6 Participação das espécies reativas de oxigênio na resposta à acetilcolina

Foram realizadas curvas de relaxamento com ACh (1ηM a 30 µM), na presença e ausência de Apocinina (30 µM) um inibidor da enzima NADPH oxidase, a fim de avaliar a influência de EROs produzidas pela NADPH oxidase no relaxamento vascular. As respostas obtidas pelo relaxamento provocado pela ACh foram expressas como porcentagem de relaxamento à pré-contração obtida pela Phenilefrina nos anéis de aorta. Nas curvas dose-resposta foram calculados a resposta máxima (Rmáx) e o pEC_{50}, que representa o valor da concentração que produz 50% da Rmáx.Para tal, foram usadas análises de regressão não-linear obtidas a partir das curvas dose-resposta utilizando o programa GraphPadPrism Software (San Diego, CA, USA).

4.7.7 Verificação das respostas obtidas na reatividade vascular

As respostas obtidas pelo relaxamento provocado pela ACh foram expressas como porcentagem de relaxamento à pré-contração obtida pela Phenilefrina nos anéis de aorta. Nas curvas dose-resposta foram calculados a resposta máxima (Rmáx) e o pEC_{50}, que representa o valor da concentração que produz 50% da Rmáx.Para tal, foram usadas análises de regressão não-linear obtidas a partir das curvas dose-resposta utilizando o programa GraphPadPrism Software (San Diego, CA, USA).

4.8 Análises pela citometria de fluxo

4.8.1 Avaliação das células progenitoras endoteliais (CPE)

A citometria de fluxo foi realizada para quantificar e caracterizar os fenótipos da CPE circulantes. Após a coleta de sangue e remoção de eritrócitos, as amostras

foram purificadas por seleção negativa com anticorpos monoclonais contra CD3e (cadeia CD3 ε), CD11b (integrina cadeia αM), CD45R / B220, Ly-6G e Ly-6C (Gr-1), e TER-119 / Células Eritróides (LY-76) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) durante 15 minutos em gelo, para eliminar as células da linhagem comprometidas. Subsequentemente, as células foram marcadas magneticamente, carregado numa coluna IMagnet BD (BD), e a fração de células esgotadas (Lin) foi cuidadosamente recolhida e analisados por citometria de fluxo para a quantificação da EPC circulantes. Subsequentemente, alíquotas de células (1 x 10^6 células / mL de PBS) foram coradas para EPC imunofenotipagem utilizando anti-ratazana CD117 e CD31-PECy7-APC (BD) durante 20 min no escuro. De cada amostra, 100.000 eventos foram adquiridos (FACS Canto II, BD Bioscience) e processados utilizando o software FACS Diva (Becton Dickinson - BD, CA, EUA). Os CPE circulantes foram definidos como Lin, células duplamente positivas CD117 / CD31- negativas (Lin / CD117 + / CD31 +).

4.8.2 Isolamento das células

Para o isolamento das células, os tecidos foram triturados com tesoura cirúrgica e incubados a 37ºC por 30 minutos em solução de extração que continha proteinase K (0,1% m/v -Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e colagenase tipo II (0,2% m/v - GibcoLife Technologies, São Paulo, SP, Brazil), dissolvidos em uma solução tampão fosfato salina (PBS). Posteriormente, o extrato foi filtrado através de uma tela de nylon (BD Falcon 70µm, San Jose, Califórnia, EUA) acoplada em tubo falcon para remover os debris celulares. Em seguida, as amostras filtradas foram lavadas duas vezes com PBS, através de centrifugação (10 minutos a 2600 rpm), para remoção das enzimas. Finalmente as amostras foram armazenadas em solução contendo 40% de soro bovino fetal (SFB, Gibco), 10% dimetil sufóxido (DMSO, Sigma) e 50% RPMI e estocadas a -80ºC.

4.8.3 Análise da viabilidade celular

Para determinação da viabilidade celular foi utilizado o coranteintracitoplasmático iodeto de propídeo (PI). O PI é um marcador padrão deviabilidade, usado para distinguir células viáveis de não viáveis, uma vez quecélulas viáveis com membrana intacta são impermeáveis ao corante, enquanto quemembranas de células mortas ou danificadas são permeáveis. Uma suspensão decélulas de concentração 10^6 foi incubada com 2µL de PI (500µg/mL) por umperíodo de 5 minutos, no escuro e com temperatura ambiente (25ºC).

Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e analisadas pelo citômetro defluxo (FACSCantoII,Becton Dickinson, San Juan, CA, EUA). Para quantificar aviabilidade, as amostras foram analisadas em triplicatas, sendo adquiridos 10.000eventos por leitura. As células foram excitadas a 488nm e para detecção dafluorescência do PI, foi utilizado filtro 585/42. Os dados foram expressos pelaporcentagem de células não viáveis/porcentagem de células viáveis.

4.8.4 Determinação dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigêniono arco da aorta

Dihidroetídeo (DHE) e 2',7'- diacetato de dicloro fluoresceína (DCF-DA) foramusados para determinar os níveis intracelulares de ânions superóxido (•O_2-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente. Os níveis de ânion superóxido •O_2- foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pelo etídeo,que é produto da oxidação do dihidroetídeo ou hidroetidina. O DHE, forma reduzidado brometo de etídeo, entra livremente na célula e reage rapidamente com o •O2-formando etídeo. Quando o DHE é oxidado à etídeo e se liga ao DNA, causa aamplificação da fluorescência vermelha. A oxidação do DHE é quantitativamenteproporcional a concentração de •O2- na célula.

A produção de H2O2 foi estimado por meio da citometria de fluxo através dafluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF) que é um produto da oxidaçãodo 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) um éster, não fluorescente,internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrarna célula sofre ação de esterases intracelulares, resultando na formação de umcomposto intermediário (DCFH), que pode ser oxidado pelo H2O2 formando umcomposto fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que por ser apolar fica aprisionado no interior da célula. Portanto, a oxidação do DCFH-DA é quantitativamenteproporcional à concentração de H2O2 na célula.

As células isoladas das aortas foram ressuspendidas em 1mL de PBS na concentração de$1x10^6$ células/mL e incubadas, no escuro, com DHE (160 mM) e DCF-DA (20mM), por 30 minutos à 37°C. Para controle positivo, as amostras foram incubadaspor 5 minutos com 10µM doxorrubicina ou 50 mM H2O2, enquanto que para controlenegativo as amostras foram incubadas apenas com etanol. As células então, foramlavadas e ressuspendidas com PBS e mantidas no gelo e protegidas da luz até aaquisição dos dados no citômetro de fluxo (FACSCantoII,Becton Dickinson, SanJuan, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada com auxílio do softwareFACSDiva (Becton Dickinson, San Juan, CA) e a sobreposição dos

histogramasfoi construída usando o FCS Express software. Para quantificação dafluorescência emitida pelo DHE e DCF, as amostras foram analisadas em duplicatas,sendo adquiridos 10.000 eventos por leitura, as células foram excitadas a 488nm eos sinais foram obtidos utilizando filtros 585/42 e 530/30, respectivamente, e osdados foram expressos em média geométrica da intensidade de fluorescênciaemitida (MFI).

4.8.5 Detecção de óxido nítrico intracelular

Para detecção e estimativa da biodisponibilidade do NO foi usado a substância diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2D, 2Mm), que na presençade NO, emite fluorescência de cor verde, cuja intensidade é proporcional àbiodisponibilidade intracelular de NO. Então, este foi adicionado em uma suspensãode células (10^6) e incubada a 37°C, por 18 minutos, no escuro. Para controlepositivo, as amostras foram incubadas com 10 µM de nitroprussiato de sódio. Ascélulas então, foram lavadas, ressuspendidas com PBS, mantidas no gelo eprotegidas da luz para aquisição imediata dos dados no citômetro de fluxo(FACSCantoII,Becton Dickinson). A análise dos dados foi realizada com auxílio dosoftware FACSDiva (Becton, Dickinson) e a sobreposição do histograma foiconstruída usando o FCS Express Software. Para quantificação da fluorescênciaemitida pelo DAF-2T, as amostras foram analisadas em duplicatas, sendoadquiridos 10.000 eventos por leitura, as células foram excitadas a 488nm, o sinalfoi obtido utilizando filtro 530/30e os dados foram expressos em média geométricada intensidade de fluorescência emitida (MFI).

4.9Microscopia eletrônica de varredura da aorta

Para verificação da estrutura do endotélio presente na aorta os animais foram perfundidos com uma solução de fixação (Glutaraldeído 2,5%, Formaldeído 2% e tampão cacodilato 0,1 M). Após a perfusão a aorta foi removida e o tecido conjuntivo foi cuidadosamente retirado e a aorta foi mantida por um período de 24 horas na solução de fixação. Posteriormente, a aorta foi cortada e lavada em tampão cacodilato (0,1 M) por 3 vezes a cada 30 minutos, após a lavagem a aorta foi mantida em uma solução de pós-fixação contendo tetróxido de ósmio 1%, tampão cacodilato 0,1 M e ferrocianeto de potássio 1,25%, em câmara escura, por um período de 1 hora. Posteriormente, foi feita a lavagem com tampão cacodilato 0,1M e água MiliQ. Após o processo de lavagem foi realizada a desidratação da aorta com álcool em concentrações crescentes. Depois a aorta foi submetida a secagem pelo

ponto critico com CO_2, depois de secas as amostras foram montadas em "*stubs"* e submetidas a uma camada de ouro no equipamento a vácuo, depois de receber a fina camada de ouro os "*stubs"* foram visualizados no microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV, Jeol Inc. USA). As imagens foram obtidas no aumento de 1000X.

Para análise da estrutura do grão de Kefir os grãos passaram pelos mesmos processos que a aorta. No entanto, a imagens foram feitas no aumento de 2000X.

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), para cada um dos grupos estudados. As curvas dose-resposta foram analisadas por ANOVA de duas vias,seguida pelo *post hoc* de (Tukey), e para as demais comparações será utilizada ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Tukey, ambos analisados via software (GraphPadPrism, San Diego, CA, USA). O nível designificância estabelecido foi $p<0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Microbiologia dos grãos de kefir

A análise microbiológica de amostras aleatórias dos grãos de Kefirutilizados neste estudo mostrou que sua microflora dominante possui diferentes bactérias benéficas(*Acetobacteraceti, Acetobacter sp. Lactobacillus delbrueckii delbrueckii, Lactobacillusfermentum,Lactobacillusfructivorans, Enterococcusfaecium, Leuconostoc spp.*), incluindo*Lactobacilluskefiranofaciens,*e leveduras (*Candidafamata, Candidakrusei*).

5.2 Microscopia dos grãos de kefir

Na Figura 5A temos uma foto típica do grão de kefir, demonstrando como são vistos a olho nu. Podemos observar que os grãos são brancos e gelatinosos. Estes grãos foram utilizados para fermentar o leite em nosso estudo e produzir o leite fermentado utilizado no tratamento dos animais. Na figura 5 de B a E demonstramos fotostípicas dos grãos de kefiratravés de microscopia eletrônica de varredura. As fotos foram obtidas em diferentes magnificações, sendo as superfícies externas apresentadas nas figuras B, C e D e a superfície interna dos grãos estão demonstradas nas fotos E e F.

As imagens geradas por microscopia eletrônica de varredura mostram uma forte associação de um aglomerado de diferentes microrganismos em torno dos grãos de kefir.A superfície externa (C e D) mostra que a forma predominante de microrganismos no biofilme kefirforamas de células de bacilos curvos curtos e longos, em forte associação com uma matriz de polissacarídeos (Figura 5D).A superfície interna sugere que eles crescem em associação com células de leveduras com forma ovóide (Figura 5E e 5F).

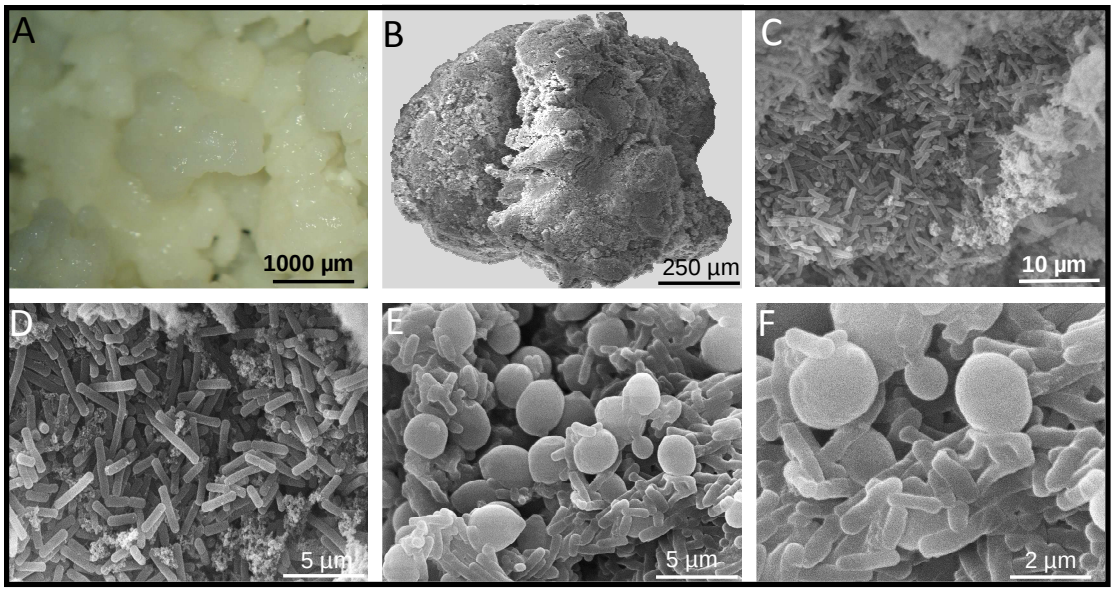


Figura 5. Fotomicrografias de grãos de kefir: A- grãos de kefir. B, C e D- imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura demonstrando a superfície externa. Nas imagens E e F é possível observar a parte interna dos grãos de kefir. Na superfície externa das imagens C e D observamos a prevalência de bacilos e a presença de uma matriz de polissacárido (kefiran). Já na superfície interna, imagens E e F, observamos a presença de bacilos que crescem juntamente com leveduras.

5.3 O tratamento com kefir promove redução da pressão arterial e da frequência cardíaca

Conforme esperado e demonstrado na literatura animais SHR apresentaram elevados níveis de pressão arterial média (variando de 162 a 169 mmHg) em comparação com os ratos Wistar,que apresentavam valores de 98 a 102 mmHg.

A administração de kefir durante 7, 15 e 30 dias não teve efeito significativo sobre a pressão arterial, mas quando administrado por 60 dias, observamos uma queda significativa neste parâmetro, ou seja, o tratamento com kefir foi capaz de reduzir a PA dos animais hipertensos para 145 ± 5 mmHg (Fig. 6A).

Os animais SHR apresentaram aumento da frequência cardíaca (variando 376-388 bpm, $p<0,05$) quando comparados com os ratos Wistar (variando 335-340 bpm). A administração de kefir por 7, 15 e 30 dias, não promoveu alteração sobre esse parâmetro (Fig.6B). No entanto, o tratamento com kefir durante 60 dias foi capaz de promover uma redução da taquicardia apresentada por estes animais (332 ± 15 bpm, $p <0,05$).

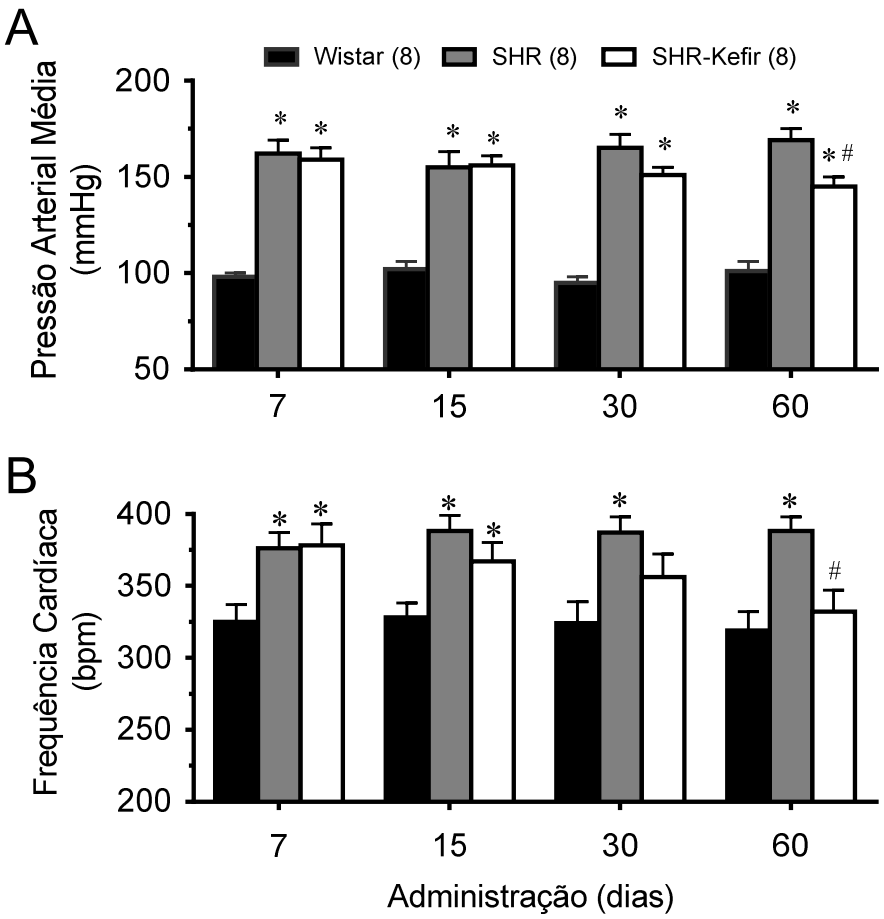


Figura 6.Análise do efeito curso temporal do tratamento com kefir sobre parâmetros hemodinâmicos em animais SHR. A- Avaliação da Pressão Arterial Média. B- Análise da Frequência Cardíaca. Os valores estão expressos como média ± EPM. *p<0,05 vs. grupo Wistar; #p<0,05 vs. SHR.

5.4 Avaliação dos efeitos benéficos do kefir sobre a disfunção endotelial em aortas de animais SHR

Os valores médios dos relaxamentos de anéis de aorta à ACh dependentes do endotélio vascular em todos os grupos avaliados, são mostrados nos gráficos de linha da Figura 7.O curso temporal da AChlevando a um relaxamento concentração dependente em anéis de aorta pré-contraídos com PE em ratos Wistar normotensos, mostrou uma tendência de perda de reatividade quando comparados os pontos temporais 7 e 60 dias (Rmax: 81 ± 4% e 74 ± 4%, respectivamente, Fig. 7B). Os animais SHR apresentaram uma resposta de relaxamento àACh deficiente (p <0,01) em todos os pontos temporais. Os três parâmetros da curva dose-resposta de AChnos SHR não tratados mostraram oRmax (~ 37 ± 4%), a sensibilidade (~ 6,9 ± 0,2 -log M acetilcolina) e AUC (~ 101 ± 13 a.u.) significativamente

prejudicadosquando comparados com ratos Wistar (~ 74% ± 4, ~ 7,9 ± 0,2 -log M acetilcolina, e 273 ± 16 a.u., respectivamente) (Fig. 7A, B e C).A administração diária de Kefiraos SHR causou uma melhora progressiva da capacidade de resposta vascular, atingindo diferenças significativas após 60 dias de tratamento, como observado no Rmax (52 ± 4%, p <0,05), sensibilidade (7,5 ± 0,26 -log M ACh, p <0,05) e AUC (167 ± 10 AU, p <0,01) (Fig. 7A, B e C).

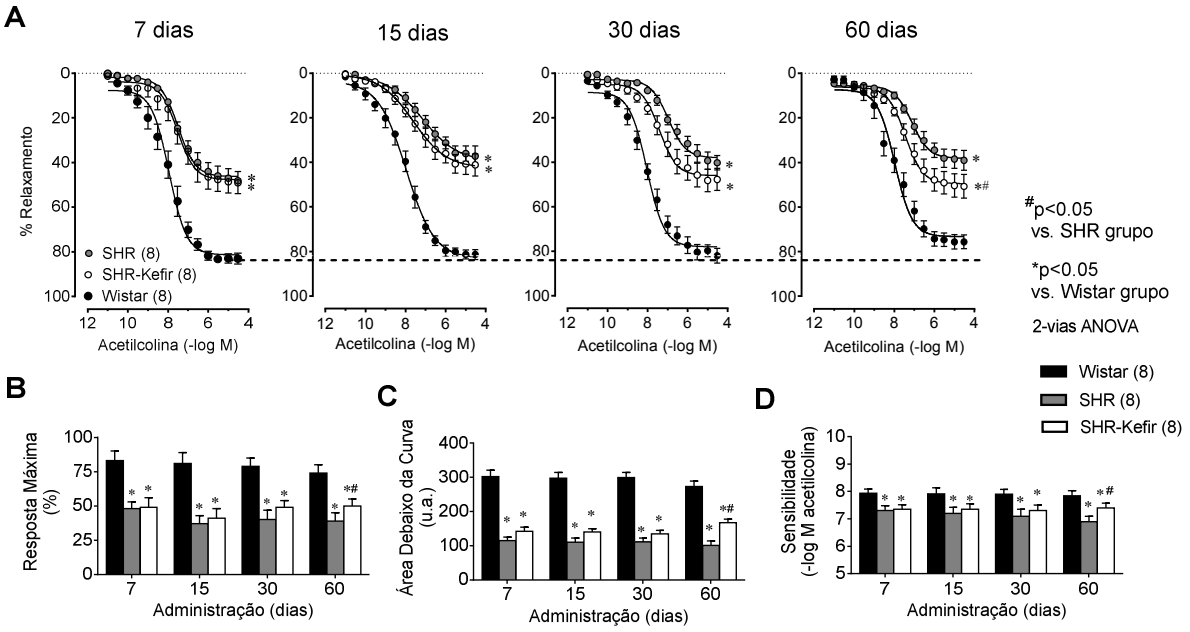


Figura 7.Efeito de curso temporal da administração de kefir na disfunção endotelial de animais SHR. Curvas de relaxamento concentração-resposta à ACh em todos os grupos estudados (A). Os gráficos de barras demonstram a resposta máxima (B),área abaixo da curva (C) e sensibilidade (pEC50, D).Os valores são as médias ± EPM. * p <0,05 vs. grupo Wistar; #p <0,05 vs. SHR (ANOVA de duas vias).

5.5 Mecanismos da disfunção endotelial em SHR: o papel das espécies reativas de oxigênio

Em outro grupo de experimentos, avaliou-se a contribuição das EROs na resposta vasodilatadora à acetilcolina dependente do endotélio nos anéis de aorta, através do bloqueio de NADPH oxidase com apocinina. A figura 8A, mostra as curvas de concentração-resposta àACh, antes e após o bloqueio de NADPH por apocinina nos 3 grupos de animais noponto de tempo de 60 dias. O pré-bloqueio dos anéis aórticos com apocinina causou um efeito menor na resposta vasodilatadora à ACh nos ratos normotensos Wistar como mostrado na Rmax(-8%, p>0.05, Fig. 8C), sensibilidade (-9%, p>0.05) e ΔAUC (10 a.u. p>0.05, Fig. 8B).O bloqueio dos anéis

de aorta com apocinina nos SHR não tratados melhorou a resposta vasodilatadora à ACh.O Rmaxfoi alterado (41 ± 6% e 72 ± 7%, p <0,05, fig. 8A), o que está muito próximo aoRmax do grupo Wistar (81 ± 6%). Consequentemente, a diferença na AUC foi de 101 ± 3 a.u. (Fig. 8 p <0,05). Por outro lado, o bloqueio de NADPH com apocinina não tem efeito significativo sobre a resposta de relaxamento à ACh nos SHR administrados com kefir durante 60 dias (Fig. 8 p<0,05), mas melhorou oRmax a partir de 48 ± 4% para 63 ± 5% (Fig. 8p <0,05), resultando numa diferença na AUC de 58 ± 4 a.u.(Fig. 8).Os resultados acima indicam que as EROs são os principais contribuintes para a resposta de relaxamento prejudicada àACh em SHR e que a administração de kefir durante 60 dias atenuou parcialmente esta condição, porque o bloqueio da NADPH causou melhoria adicional na função endotelial nos SHR tratados com kefirdurante 60 dias.

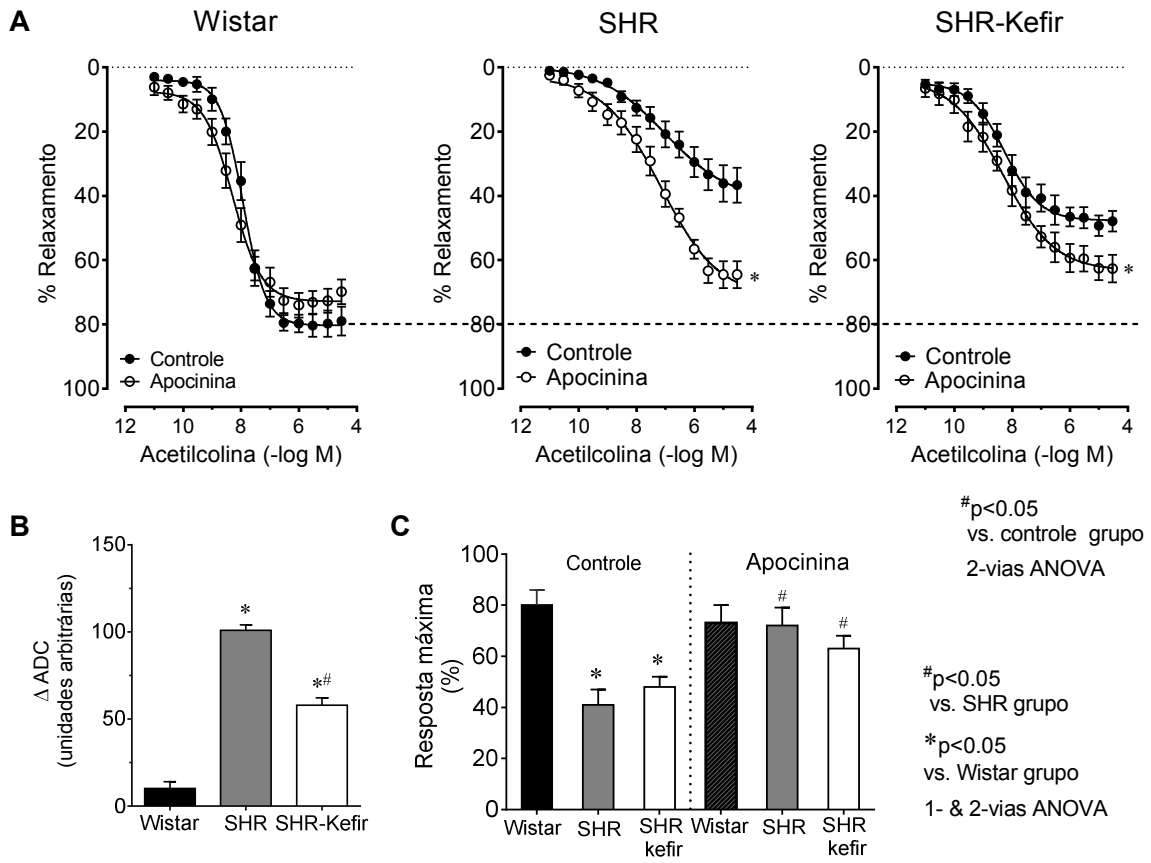


Figura 8. Avaliação da contribuição das EROs. Os valores são as médias ± EPM.

5.6 Contagem de células endoteliais e a produção de EROs intracitoplasmática no arco aórtico

A fim de determinar o conteúdo de EROs intracitoplasmático através da citometria de fluxo foram utilizadas as sondas DHE, DCF e HPF para quantificar a produção do curso temporal de $\bullet O^{2-}$, H_2O_2, $\bullet ONOO^-$/radical hidroxila, respectivamente, pelas células endoteliais isoladas a partir da aorta dos três grupos de estudados (Fig. 9A, B e C).

Notou-se uma tendência ao aumentoda produção de •O2- e H2O2, ONOO-/• OH- ao longo do tempo no grupo Wistar (2974±151, 1762±22 e 1317±54MFI, respectivamente) e valores significativamente mais elevados no grupo SHR (4399±193, 2271±100 e 1702±40, respectivamente).OprobióticoKefir quando administrado durante60 dias resultou em efeitos benéficosem relação à produção de$\bullet O^{2-}$, H_2O_2, $\bullet ONOO^-$/radical hidroxila em aortas de ratos SHR. Como demonstrado nas Figuras 9A, B e C, o kefir causou uma redução na produção de$\bullet O_2^-$(3533±147 MFI, -20%, $p<0.01$),H_2O_2, (1933±95 MFI, -15%, $p<0.05$) e $ONOO^-/\bullet OH^-$ (1374±44 MFI, -20%, $p<0.01$), quando comparados com os SHR não tratados.

A citometria de fluxo também foi utilizada para avaliar o número de células endoteliais (por meio de CD31-APC) e a produção de NO (através do DAF) no arco aórtico dos três grupos de animais (Fig. 9).O número de células endoteliais da aorta foi semelhante em SHR e ratos Wistar no ponto de tempo de 7 dias mas, gradualmente, os valores pioraram em SHR e no grupo de 60 dias, o número de células foi significativamente diminuído (33%, $p <0,05$) em comparação com os ratos Wistar (contagem de células 12,9 ± 1,3 CD31-positivo).A administração crônica de kefir durante 60 dias para o grupo SHR aumentou a presença de células CD31-positivas na aorta (Fig. 9E).

Como esperado, foram observados resultados semelhantes aos descritos anteriormente na análise da produção de NO em aortas dos três grupos de animais. A produção de NO pelas células endoteliais isoladas do arco aórtico de SHR diminuiu significativamente em SHR (16%) em comparação com ratos Wistar (1,712 ± 86 IFM). A administração de Kefir durante 60 dias foi capaz de aumentar a biodisponibilidade de NO em aortas dos animais SHR (Fig. 9D).

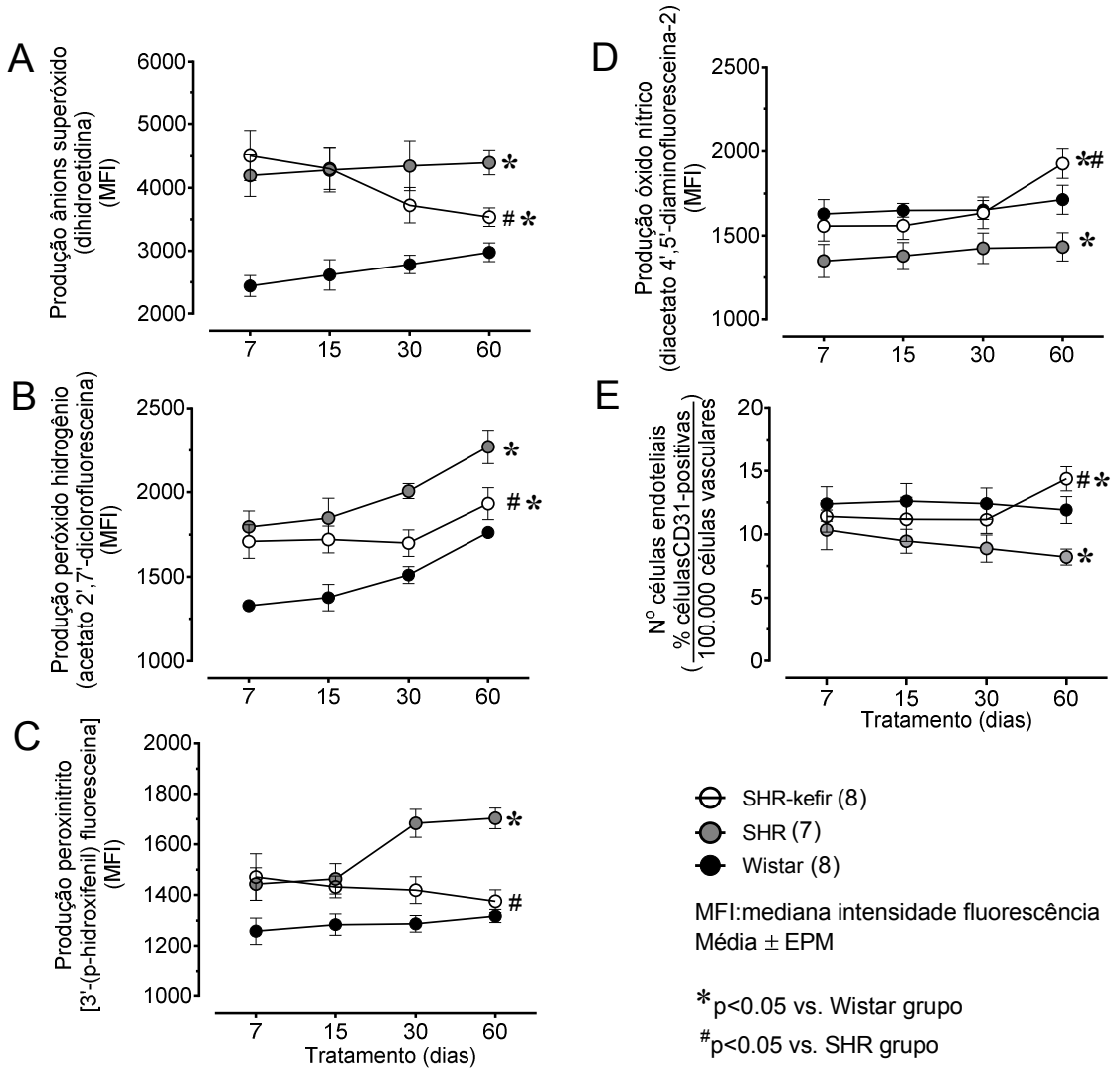


Figura 9.Alteração curso temporal de EROs e células endoteliais de aorta. Os gráficos mostram a produção do ânion superóxido (A), peróxido de hidrogênio (B), peroxinitrito/radical hidroxila (C), óxido nítrico (D), e o número de células endoteliais (E). Os valores estão expressos como mediana da intensidade de fluorescência ± EPM.

5.7 Mecanismos de disfunção endotelial no SHR: o papel do óxido nítrico

Para avaliar os possíveis mecanismos pelos quais o kefir produz efeitos benéficos sobre a função endotelial, investigamos a via molecular NO/GMPc, examinando a resposta vasodilatadora dependente do endotélio em anéis de aorta após o bloqueio com L –NAME, um inibidor não específico daóxido nítrico sintase.Na Figura 10A podemos observar queo NO é o principal vasodilatador em anéis de aorta, visto que a inibição de sua síntese impediu grande parte do

relaxamento em aortas de Wistar, e praticamente todo o relaxamento em animais SHR. Podemos verificar na figura 10B, que a magnitude da influência do NO na resposta à ACh foi diferente, conforme demonstrado pela diferença na área abaixo da curva com e sem bloqueio, em cada um dos grupos estudados.

Observa-se que o papel do NO na vasodilatação dependente do endotélio encontrou-se reduzido em animais hipertensos que receberam veículo quando comparados aos do grupo controle, Wistar, como pode ser visto na figura 9 C, pela redução da diferença da área abaixo da curva nestes animais (132 ± 9 vs. 257 ± 12 u.a., $p < 0,05$), e o tratamento com Kefir por 60 diasaumentou de forma significativa a participação do NO na resposta vasodilatadora à ACh em anéis de aorta de animais SHR (174 ± 8 u.a., $p < 0,05$)

Os resultados acima indicam que a via NO/GMPc é a principal contribuinte para a resposta de relaxamento à ACh nos ratos Wistarnormotensos, que esta via está prejudicada em animais SHR e que o tratamento com Kefir durante 60 dias foi capaz de reparar parcialmente esta condição anormal.

A figura 10D mostra a quantificação da ativação do NO/GMPc basal estimada através da contração induzida pelo Phe nos anéis da aorta sob o pré-bloqueio com L-NAME. Como demonstrado na figura 10D, animais hipertensos SHR apresentam redução da ativação basal em cascata, quando comparados aos respectivos controles normotensos (59 ± 9% vs. 97 ± 7%, $p < 0,05$), o que foi completamente restabelecido nos animais tratados com Kefir durante 60 dias (120 ± 14%, $p < 0,05$).

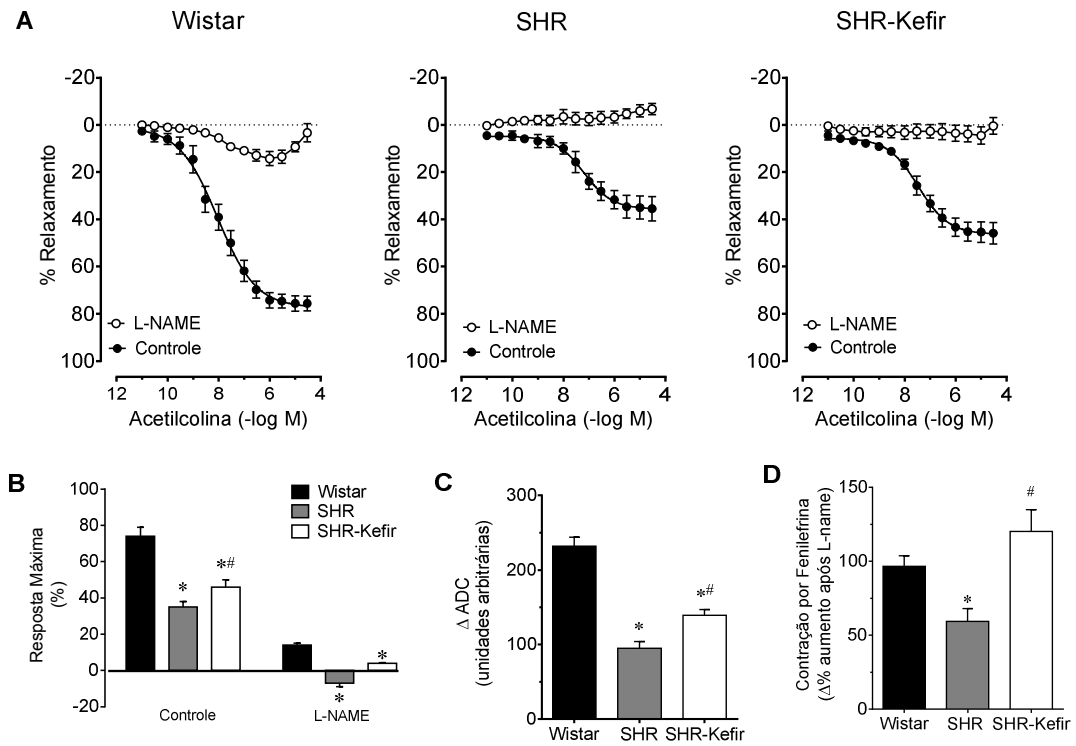


Figura 10. Contribuição da biodisponibilidade do óxido nítrico na disfunção endotelial. O gráfico (A) mostra as alterações na curva concentração-resposta à acetilcolina sob o bloqueio com L-NAME. Os gráficos de barras em B mostram valores médios de resposta máxima e a diferença na área abaixo da curva (AUC Δ, C). Em D temos a representação gráfica do incremento da contração à fenilefrina após adição de L-NAME (ativação basal da cascata NO/cGMP). Os valores são médias ± EPM (n = 7 a 8 por grupo) * p <0,05 vs. grupo Wistar; #p <0,05 vs SHR.

5.8 Análise por microscopia eletrônica de varredura da integridade do endotélio

Avaliamos a integridade endotelial por microscopia eletrônica de varredura. A análise dasfotomicrografias(Fig. 11) de aorta torácica de animais normotensos Wistarmostraram uma camada de células endoteliais confluentes. Em contraste, os SHR exibem uma evidente irregularidade na superfície endotelial, a qual se apresentou descontínua e acidentada, com perda de sua estrutura normal, expondo a membrana elástica interna, na qual foi observada a ocorrência de muitas lacunas.

Um achado importante foi a observação de que os animais SHR tratados com kefir durante 60 dias apresentaram uma superfície endotelial contendo células regeneradas, que cobriam parcialmente a área íntima lesada, no entanto, algumas lacunas ainda foram observadas entre as células.

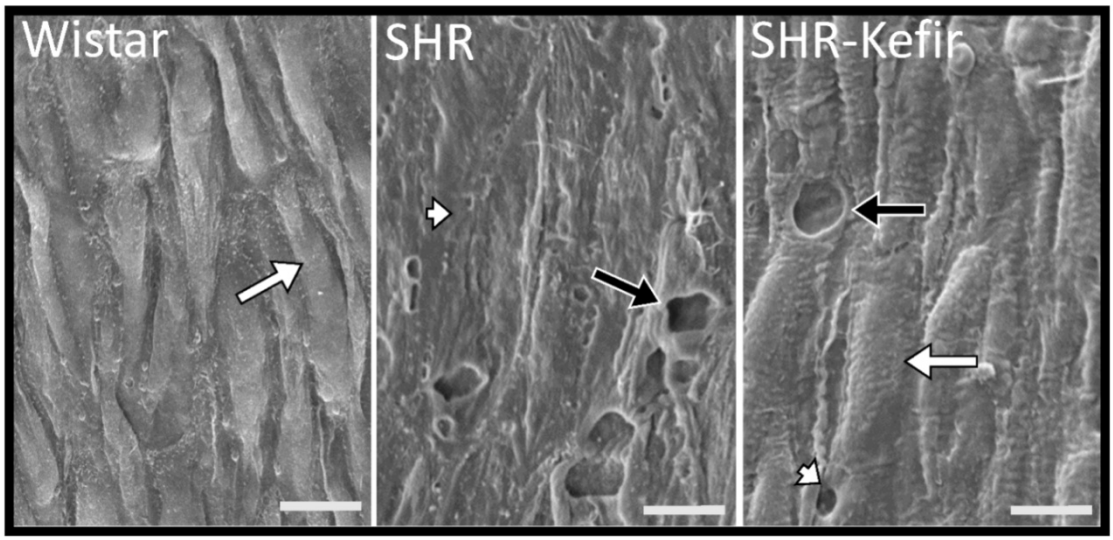


Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura mostrando a estrutura endotelial representativa de aorta de rato Wistar normotenso, SHR veículo e SHR tratado com kefir durante 60 dias. Barra de escala: 10 µm. Seta branca: células endoteliais; cabeça seta branca: desnudação da superfície endotelial; seta preta: lacunas.

5.9 Recrutamento de células progenitoras endoteliais circulantes

A análise de citometria de fluxo de CPE foirealizada em sangue periférico de ratos Wistar, SHR e kefir.A análise dos dados revelou que a fração de células CD31+ CD117 no sangue periférico foi significativamente reduzida em SHR em comparação com o grupo de ratos Wistar (Wistar:207 ± 23vs. SHR: 86 ± 11, contagem de células), e administração dekefir durante 60 dias foi capaz de aumentar o número circulante de EPC (SHR-Kefir: 134 ± 7 contagem de células).

5.10 Efeitos do kefir sobre o relaxamento independente do endotélio

Em nosso estudo foi observado que animais SHR apresentavam relaxamento dependente do endotélioprejudicado e lesão estrutural na superfície destas, o que nos levou a investigar como estaria o relaxamento independente do endotélio. Para a avaliação da resposta do músculo liso vascular ao NO, independente da participação do endotélio, foi construída uma curva de relaxamento ao doador de NO nitroprussiato de sódio (NPS) após pré-contração com Phe. Os resultados estão demonstrados na figura 12. Como pode ser observado, o relaxamento independente do endotélio em aortas de SHRteve um prejuízo em comparação com o controleWistar,onde foi observada redução da Rmáx e sensibilidade (72 ± 3% e 7,4 ± 0,05 M –log vs. 87 ± 5% e 8,0 ± 0,07 -log M, P <0,05) (Fig. 12A).

Nossos resultadostambém mostram que o kefir não foi capaz de reverter o relaxamento independente do endotélio, como pode ser observado na figura 12.

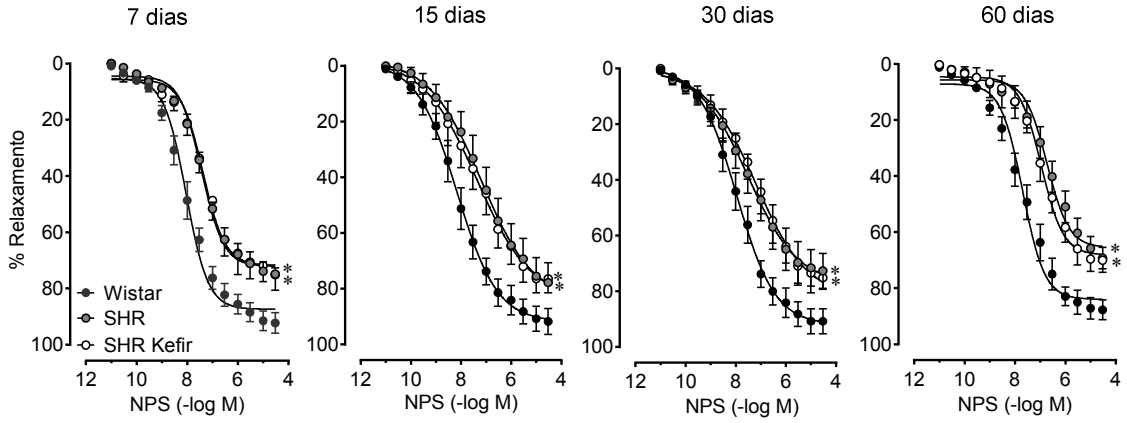


Figura 12. Efeito temporal da administração de kefir no relaxamento independente do endotélio. Foram realizadas curvas concentração-resposta para o doador de NO, nitroprussiato de sódio.Os valores são as médias ± EPM. * p <0,05 vs. grupo Wistar.

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram efeitos benéficos do tratamento crônico com kefir em animais SHR, pois foi capaz de reduzir a PAM e a taquicardia que estes animais apresentavam. O tratamento com kefir também restaurou a função endotelial de vasos de condutância (aorta), bem como aumentou a presença do número de células endoteliais nestes vasos e ainda promoveu um aumento do número de CPE's circulantes, sendo a redução do estresse oxidativo e o aumento na biodisponibilidade de NO os principais mecanismos para o kefir promover seus efeitos.

Em nosso estudo, observamos que animais SHR apresentavam um prejuízo no relaxamento dependente do endotélio, ou seja, uma resposta diminuída à ACh quando comparados aos respectivos controles, sendo que o principal mecanismo envolvido nesta vasodilatação reduzida é um desequilíbrio entre NO/EROs acompanhado de dano à estrutura do endotélio. Esse é o primeiro estudo que demonstra os efeitos do tratamento com kefir por um período de 60 dias restaurando a função endotelial de animais SHR pela capacidade de reduzir as EROs, aumentar a biodisponibilidade de NO e ainda promover aumento da presença de células endoteliais nestes vasos.

Os grãos de kefir são constituídos por uma mistura microbiana complexa de cerca de 40 espécies diferentes, tais como leveduras e bactérias de ácido láctico e acético(ZHOU*et al*., 2009; MAGALHÃES*et al*., 2011; LEITE*et al.*, 2012; MARSH*et al.,* 2013; ZHENG*et al*., 2013)que são responsáveis pelas propriedades probióticasdesse leite fermentado.

A presença de bactérias e fungos nos grãos de kefir sugere que estes microrganismos vivemuma relação simbiótica muito próxima (LU*et al*., 2014), que resulta na produção de compostosbioativos (MAGALHÃES*et al*., 2011; Lu *et al*., 2014). O Kefir é originado de tribos que vivem na região Norte do Cáucaso, se espalhou pelo mundo e, em alguns países, já está disponível comercialmente (YENER *et al*., 2015).

No Brasil, tradicionalmente, o Kefir tem sidoainda hoje, produzido domesticamente e propagado de "mão em mão". Utiliza-se os grãos como base para o início da produção (MAGALHÃES*et al*., 2011).A fermentação de leite com grãos forma uma matriz constituída por polissacáridos e proteínas produzidos principalmente por bactérias de ácido lático e de espécies de levedura, que são

uma comunidade microbiana simbióticacomplexa ligada fortemente em torno dos grãos de kefir(MAGALHÃES*et al.*, 2011; LU*et al*., 2014).

Em nossa análise de microscopia eletrônica de varredura dos grãos de kefir, observamos que obiofilme é composto majoritariamentepor curtos e longos bacilos curvos ou por leveduras de forma ovóidecorroborando com a observação anterior de Hamet*et al*., 2013.Amostras isoladasde diferentes grãos de kefir tradicionais brasileiros têm sido identificadas e caracterizadas (LEITE*et al.,* 2014) e sua constituição descrita como uma matriz composta de polissacarídeos/proteínas, contendo bactérias ácidas pertencentes ao gênero *Leuconostocspp., Lactococcus spp. e Lactobacillus spp.* e leveduras(LEITE*et al.*, 2012).

Na análise microbiológica das amostras de kefirobservamos a presença de diferentes bactérias e leveduras benéficas, incluindo a espécie específica de *Lactobacilluskefiranofaciens*, que produz kefiran, o principal componente funcional da bebida (HAMET*et al*., 2013).

Estudos epidemiológicos sugerem que o consumo crônico de produtos lácteos fermentados com compostos bioativosapresentam efeitos que impedem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo o risco de hipertensão (JAKALA*et al.,* 2009; MORENO*et al.,* 2015), síndrome metabólica e diabetes tipo 2 (BJØRNSHAVE & HERMANSEN, 2014).

Diversos trabalhos têm demonstrado os efeitos benéficos do kefir em diminuir a pressão sanguínea (GÓMEZ-GUZMÁN *et al*., 2015), a glicemia (OSTADRAHIMI*et al.*, 2015)e lesão causada por isquemia-reperfusão (YENER*et al*., 2015), sugerindo que esta bebida de leite fermentado pode ser útil em diferentes eventos cardiovasculares.Estes efeitos benéficos foram explicados pela presença de bactérias e fungos nos grãos de kefir, por haver nele uma relação simbiótica próxima (LU*et al.,* 2014); resultando na produção de elementos bioativos (HAMET*et al.*, 2013; ZHENG*et al*., 2013).

Existem vários estudos demonstrando que o tratamento crônico com produtos lácteos fermentados com compostos bioativosatenua a pressão arterial elevada (RANCHADRAN & SHAH 2011;RODRÍGUEZ-FIGUEROA*et al.,* 2013;JAKALA*et al*., 2009; EHLERS*et al.,* 2011; TURPEINEN*et al.,* 2011),mas poucos especificamente têm focado sobre os efeitos do complexo kefiran em hipertensos (JAUHIAINEN*et al*., 2005; AIHARA*et al.*, 2005) e em modelos experimentais de hipertensão (KANBACK*et al*., 2014).

Nossos dados corroboram com a literatura, pois observamos que a utilização desteprobiótico durante 60 diasem ratos SHRfoi capaz de reduzir em aproximadamente 25% a PAM etambém aboliu a taquicardia apresentada por estes animais.

Embora a hipertensão arterial seja uma doença multifatorial, a disfunção endotelial tem sido considerada um importante fator contribuinte em sua fisiopatogenia, sendo, portanto, um biomarcador valioso para a hipertensão e outras doenças cardiovasculares. Poucos estudos têm avaliado os efeitos benéficos do consumo de leite fermentado com componentes bioativossobre a disfunção endotelial em animais SHR e seus resultados foram divergentes(JAKALA*et al*., 2009; EHLERS*et al.,* 2009).

Na avaliação da função vascular observamos que os animais SHR apresentaram prejuízo na vasodilatação quando submetidos a testes farmacológicos dependente do endotélio (ACh) quando comparados aos animais do grupo controle, esses resultados estão de acordo com o encontrado por outros autores (CHENG*et al.,* 2012, HAYAKAWA*et al.,* 1993; KAUSER & RUBANYI, 1995) e em desacordo com resultados encontrados por Jakala*et al.* (2009) e Honda *et al.*(1999).

O resultado inovador deste trabalho é a observação de que o tratamento com kefir por 60 dias foi capaz de promover uma melhora na vasodilatação, com aumento da Rmáx, pED50 e da diferença da AUC, quando comparados aos animais SHR veículo, apesar da melhora não ter restaurado totalmente a resposta vasodilatadora quando comparado ao grupo controle, a resposta encontrada nos animais tratados com o probiótico tem grande relevância. Considerando-se que os efeitos do tratamento com kefirem reduzir a PA e melhorando a função endotelial são dependentes do tempo de tratamento podemos considerar que a melhora da função endotelial pode ter contribuído para a atenuação da PAnosanimais SHR.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a disfunção endotelial é uma condição presente em modelos experimentais de hipertensão e isso contribui para um aumento na produção das EROs e uma redução da biodisponibilidade de NO (VIRDIS*et al*., 2009, FRAGA-SILVA *et al*., 2013).Uma das principais causas do prejuízo no relaxamento de artérias de condutância de animais SHR é o aumento da produção de ânions superóxido (Hayakawa*et al*., 1993), ou outros fatores vasoconstritores produzidos pelo endotélio disfuncional (GOMES ROSO *et al*., 2009).

A disfunção endotelial ocorre como consequência de uma produção exagerada de ânions superóxido, produzidos principalmente pela NADPH-oxidase,sendo este responsável por sequestrar NO, formando peroxinitrito,com isso ocorre uma diminuição dabiodisponibilidade do NO novaso(MEYRELLES*et al*., 2011;ZHANG*et al*., 2013).Zalba e colaboradores (2000) demonstraram um aumento da síntese de EROs em aortas de animais SHR por aumento da atividade da NADPH oxidase.

Observando nossos resultados podemos verificar que o bloqueio da NADPH oxidase restaurou de maneira significativa a vasodilatação que estava prejudicada nos animais SHR. Diferentemente, nos grupos controle e animais SHR tratados com kefir, o bloqueio da síntese de $\bullet O^{2-}$foide menor proporção quando comparados aos animais SHR veículo. Isso demonstra que nos animais SHR a síntese de EROs tem grande influencia no prejuízo da vasodilatação.

Em nosso trabalho, verificamos a influência dasEROsem modular a vasodilatação, avaliada por meio do bloqueio farmacológico com apocinina. Foi observado que os animais SHR apresentavam um aumento da participação de ERO's em comparação aos animais controle, sendo que o tratamento com kefir durante 60 dias foi capaz de diminuir o aumento da participação das EROs no relaxamento, reduzindo então, o estresse oxidativo e promovendo uma melhora na vasodilatação. Nossos resultados estão de acordo com o descrito na literatura, pois têm mostrado que a disfunção endotelial no modelo SHR é caracterizada por um aumento da geração de EROs e uma diminuição da biodisponibilidade de NO(TOUYZ & SCHIFFRIN, 2004;FELETOU & VANHOUTTE, 2006)e outros autores demonstram uma relação entre hipertensão e estresse oxidativo com o aumento da produção de EROs e também um prejuízo na reatividade vascular (MONTEZANO*et al*., 2015.; SILVA*et al.*, 2012.; HAMZA & DYCK, 2014; YANG*et al.,* 2002; TANG & VANHOUTTE, 2009).

Diante dos nossos resultados, observamos que o estresseoxidativo é um mecanismo subjacente fundamental à patogênese da hipertensão.Existem trabalhos que demonstram a utilização de terapias que são capazes de reduzir a produção de EROs em animais hipertensos, inclusive aumentando a biodisponibilidade de NO pelas células endoteliais, resultando numa melhora da função dos vasos (DIAS*et al.*, 2014, FAHNING*et al*., 2015).

Os resultados encontrados nos animais tratados estão de acordo com o observado emoutros estudos que demonstraram que o tratamento com kefiremratos

e humanos foi capaz de reduzir o desenvolvimento de fatores de risco associados a doenças cardiovasculares (MAEDA*et al.,* 2004; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, *et al.,*2014.; HARIRI*et al*., 2015).Outros trabalhostêm observado uma melhora da reatividade vascular associada com a redução do estresse oxidativo em seres humanos e animais com distúrbios metabólicos quando tratados com probióticos*Lactobacillus* (TORALET *al.,* 2014; TRIPOLT*et al.,* 2013;HARIRI*et al.,* 2015).

Para confirmar a hipótese de que o kefir diminui o estresse oxidativo e aumenta a biodisponibilidade, utilizamos a citometria de fluxo para avaliar produção de algumas EROs(•O_2^-, H_2O_2, and •$ONOO^-$/radical hidroxila), bem como estimar o número de células endoteliais presentes no arco aórtico dos animais. Nossos dados demonstraram que o tratamento com kefir foi capaz de reduzir a produção das EROs, aumentar a biodisponibilidade de NO e ainda promover um aumento do número de células endoteliais, confirmando a hipótese dos efeitos antioxidantes deste probiótico .

Para avaliar a influência da hipertensão e os mecanismos de ação do kefir na via do NO, investigamos o papel da eNOS sobre o relaxamento vascular de aortas utilizando o bloqueio farmacológico L-NAME. Foi possível verificar que o bloqueio da eNOS promoveu uma redução drástica de 80 para 10 % na vasodilatação dos animais controle. Estes resultados nos mostram a importância do NO em promover a vasodilatação em aortas de animais normotensos.

O bloqueio de eNOS aboliu o relaxamento induzido por ACh e levou a vasoconstricção dose dependente à AChnos animais SHR veículo, indicando assim uma menor ação da acetilcolina em promover uma resposta vasodilatadora dependente do endotélio, prevalecendo sua ação vasoconstrictora no músculo liso vascular, e que podemos atribuir à reduzida atividade da via da NOS no endotélio.

Nos animais tratados com kefir por 60 dias observamos um aumento significativo da via do NO na vasodilatação induzida por ACh, uma vez que verificamos um aumento da diferença da área abaixo da curva após o bloqueio com L-NAME, quando comparados com os animais SHR veículo.

O relaxamento residual induzido pela ACh após incubação com L-NAME em aortas de ratos Wistar pode ser atribuído a agentes vasodilatadores componentes da via dosprostanóides (por exemplo, PGI2), os quais contribuem para a vasodilataçãode animais controle, e tem reduzida participação emanimaisSHR. Por outro lado, as contrações induzidas pela acetilcolina em anéis de aorta sob o

bloqueio com L-NAME em SHR, podemser promovidas em situações onde se tem um *upregulation*da enzima COX-2, a qual converte ácido araquidônico em PGH2 que pode mediar as contrações (VIRDIS*et al*., 2009).

Alguns estudos realizados em diferentes modelos experimentais avaliam o NO basal e verificaram uma redução deste NO basal em diversas patologias associadas com a disfunção endotelial (LEAL*et al*., 2015.; SUZUKI*et al*., 2007). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois observamos uma diminuição da biodisponibilidade de NO e a disfunção endotelial nos animais SHR veículo. Interessantemente, nosso trabalho demonstrou que o tratamento com kefir aumentou de maneira significativa o NO basal, acarretando numa melhora da função endotelial.

Diversos estudos relatam que o aumento da produção de EROs, como observado em nossos animais SHR, promovem disfunção endotelial, diminuem a biodisponibilidade de NOe ainda pode acarretar em uma diminuição da mobilização e função das CPE (TOUSOULIS*et al*., 2008; TILLING*et al*., 2009). O aumento das EROs também podem favorecer a alterações estruturais dos vasos sanguíneos, promovendo alterações principalmente na morfologia das células endoteliais.

Em nosso estudo avaliamos a estrutura das células endoteliais através da microscopia eletrônica de varredura, de fato observamos alterações nas células endoteliais dos animais SHR quando comparados ao grupo controle, pois estes animais apresentaram desnudação com uma diminuição do número das células endoteliais. As imagens confirmam os resultados obtidos nos experimentos realizados com a finalidade de avaliar a função dos vasos e também com os resultados obtidos na citometria de fluxo, pois o tratamento com kefir, promoveu parcialmente uma re-endotelização da aorta, aumentando a presença das células endoteliais nos animais tratados.

O aumento da produção de ERO's, em particular do ânion superóxido, pode resultar tanto na redução da atividade de enzimas antioxidantes,como a SOD e catalase, bem como no aumento da expressão e ativação de enzimas pró-oxidantes, incluindo NADPH oxidase (LI*et al*., 2013).

A verificação de que o ânion superóxido, um dos principais tipos de ERO's, estava aumentada no grupo de ratos SHR e, foi significativamente reduzidoapós 60 dias de tratamento com kefir, está de acordo com Li e colaboradores (2002), que demonstrou um aumento da atividade da enzima NADPH-oxidase associado

amaiores quantidades de superóxido nas células endoteliais de ratos SHR (LI*et al*., 2002).

A produção aumentada de ânion superóxido leva a uma diminuiçãoda biodisponibilidade do NO e disfunção endotelial (HEITZER*et al*., 2001), poiso NO reage com o ânion superóxido, resultando em peroxinitrito, um agente oxidante potente que leva a alterações irreversíveisnas biomoléculas (DIAS*et al.,* 2014), levando a um comprometimento celular.

Além do mais, o desacoplamento da eNOS pelo peroxinitrito contribui para inativar mais ainda o NO e, consequentemente, levar à disfunção endotelial (CHEN*et al*., 2012; OLIVEIRA-PAULA*et al*., 2014). Portanto, um mecanismo pelo qual o tratamento com kefir reduz o estresse oxidativo na vasculatura, pode ser através do aumento da atividade ou expressão de enzimas que antioxidantes, ou pela diminuiçãoda atividade e/ouexpressão de enzimas responsáveis pela produção de superóxido.

O aumento no número de células endoteliais e a re-endotelização em ratos SHR tratados cronicamente com kefir nos levou a investigar o efeito do Kefir na mobilização de células progenitoras endoteliais (CPE).

Considerando-se que o NO desempenha um papel importante na mobilização de CPE (AICHER*et al*., 2003; SAAD*et al.,* 2015), a re-endotelização de aortas de animais SHR tratados cronicamente com kefir pode ser atribuídaao aumento da produção de NO pelas células endoteliais, promovendo assim o aumento da mobilização das CPE para locais onde há lesão endotelial. Além disso, já foi demonstrado que seres humanos hipertensos exibem uma diminuição no número de CPE funcionais circulantes (TOUSOULIS*et al.,* 2008), corroborando com os nossos achados no grupo SHR. Contudo, o presente estudo demonstrou que ratos SHR tratados com kefir durante 60 dias apresentam um aumento significativo no número circulantede CPE.

A interação entre estresse oxidativo e inflamação influencia diretamente a mobilizaçãode CPE (TILLING*et al.,*2009) e, indiretamente, leva à desnudação da superfície endotelial (VERESH*et al*., 2008), contribuindo para o desenvolvimento da hipertensão arterial (McMASTER*et al*., 2015), o que corrobora com os nossos achados nos animais SHR.Há evidências (AICHER*etal*., 2003;. CHIRKOV & HOROWITZ, 2007; TURGEON*et al*., 2012; SAAD *et al.,* 2015) que as CPE podem agir sobre o estresse oxidativo, diminuindo o efeito deletério intracitoplasmático das EROs e, simultaneamente, aumentando a produção de NO.

Uma vez mobilizadas na circulação periférica, as CPE localizam as áreas lesadas da artéria e contribuem na sua re-endotelização(NAKAMURA*et al*., 2009; FORESTA*et al.,* 2010; PORTO*et al.,* 2011; LIMA*et al.,* 2012, LIN*et al*., 2013).

Portanto, a novidade do presente estudo é que o kefir, administrado cronicamente em animais SHR, resulta em um aumento significativo na mobilização das CPE. Essa informação explica, pelo menos em parte, o notável efeito reparador deste probiótico, na estrutura da superfície endotelial e na melhora da função endotelial dos SHR tratados durante 60 dias. Dessa forma, nossos dados fornecem a primeira evidência de que os efeitos benéficos de kefir sobre a disfunção endotelial em animais hipertensos, podem estar relacionados ao aumento do recrutamento das CPE.

Uma questão que ainda não está esclarecida nesse modelo de hipertensão está relacionada à sua resposta vasodilatadora independente do endotélio. Estudos de alguns pesquisadores tem mostrado que estes animais apresentam um prejuízo no relaxamento a doadores de NO (TESFAMARIAM &OGLETREE, 1995; BAUERSACHS*et al.,* 1998; ZHANG, 2013), e outros pesquisadores não observaram nenhum prejuízo. (HONDA*et al.,* 1999; YANG*et al*., 2002). Em nosso estudo, observamos que aortas de animais SHR apresentaram reduzido relaxamento ao doador de NO (NPS) quando comparadas com o controle Wistar.Estes resultados estão de acordo com outros estudos (KLOSS*et al*., 2000) e sugerem que a hipertensão arterial neste modelo está associada a um defeito no relaxamento do músculo liso.

É preciso ressaltar que, o tratamento com kefirdurante 60 dias, não resultou em efeito significativo sobre o relaxamento independente do endotélio nos animais SHR.Este resultado nos indica que o kefir atua no endotélio promovendo seus efeitos benéficos restaurando sua função.

7. CONCLUSÃO

Esse estudo demonstra, pela primeira vez, que o probióticokefir é capaz de atenuar a disfunção endotelial em vasos de condutância deanimais SHR,através da diminuição da produção de EROse, consequentemente, reestabelecendoa biodisponibilidade de NO. Além disso, o kefir também foi capaz de promoverre-endotelização dos vasos, e isso se deve a um maior recrutamento de EPC, o qual pode contribuir para a reparação morfológica nos animais SHR (fig.12).

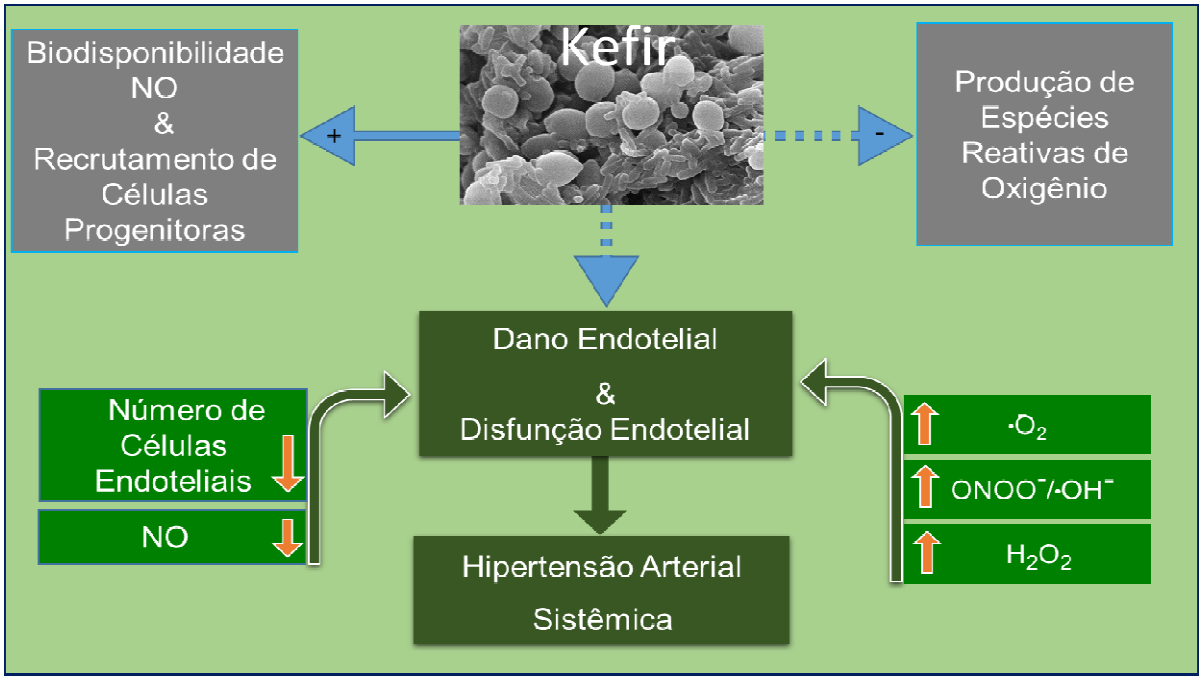


Figura 13.Resumo dos efeitos benéficos do probióticoKefir sobre a disfunção endotelial em SHR, de acordo com os resultados deste estudo.

8. REFERÊNCIAS

AICHER A, HEESCHEN C, MILDNER-RIHM C, URBICH C, IHLING C, TECHNAU-IHLING K, ZEIHER AM, DIMMELER S. *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells.* Nat Med. 2003;9(11):1370-6. Erratum in: Nat Med;10(9):999. 2014.

AIHARA K, KAJIMOTO O, HIRATA H, TAKAHASHI R, NAKAMURA Y. *Effect of powdered fermented milk with Lactobacillus helveticus on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension*. J Am CollNutr.24(4):257-65.2005.

ANADO, N. A.; MARTINEZ, M.A.; ARES, I.; et al. *Acute and repeated dose (4 weeks) oral toxicity studies of two antihypertensive peptides, RYLGY and AYFYPEL, that correspond to fragments (90–94) and (143–149) from as1-casein*. FoodChemToxicol. 48: 1836–1845. 2010.

ARRUDA, R. M.; PEOTTA, V. A.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ E.C. *Evaluation of vascularfunction in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependentrenovascular hypertension.*Hypertension. Oct;46(4):932-6. Epub 2005 Aug 8. PubMed PMID: 16087779. 2005.

BALARINI, C. M.; LEAL, M. A.; GOMES I. B.; PEREIRA T. M.; GAVA A. L.; MEYRELLES, S. S.; VASQUEZ, E. C. *Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse.*J Transl Med. 2013 Jan 5;11:3. doi: 10.1186/1479-5876-11-3. PubMed PMID:23289368; PubMed Central PMCID: PMC3551739. 2013.

BALDO, M. P.; TEIXEIRA, A. K.; RODRIGUES, S. L.; MILL, J. G. *Acute arrhythmogenesisaftermyocardial infarction in normotensive rats: influence of high salt intake.*Food ChemToxicol. 2012 Mar;50(3-4):473-7. doi: 10.1016/j.fct.2011.11.033. Epub 2011 Nov 27. 2012.

BAUERSACHS J, BOULOUMIÉ A, MÜLSCH A, WIEMER G, FLEMING I, BUSSE R. *Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylylcyclase expression, and in superoxide anion production.*Cardiovasc Res. 1998;37(3):772-9.doi:10.1016/S0008-6363(97)00250-2. 1998.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H.*The NOX family of ROS-generating NADPHoxidases: physiology and pathophysiology.*Physiological Reviews. v. 87, n. 1,p. 245-313; 2007.

BERGMANN, R. S. O.; PEREIRA, M. A.; VEIGA, S. M. O. M.; SCHNEEDORF, J. M.; OLIVEIRA, N. M. S.; FIORINI, J. E. *Microbial profile of a kefir sample preparations – grains in natura and lyophilized and fermented suspension.*Ciênc. Tecnol.Aliment., Campinas, 30(4): 1022-1026, out.-dez. 2010.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. 2011. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Trasmissíveis (DCNT) no Brasil. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cartilha_plano.pdf Acesso 28/07/2015.

BRIONES, A. M. *et al. Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteriesfrom spontaneously hypertensive rats.*Journalof Cardiovascular Pharmacology.v. 39, n. 3, p. 378-388, 2002.

CASTRO, L. C. V.;FRANCESCHINI, S. C. C.; PRIORE, S.R.; PELÚZIO, M. C. G. *Nutrição e doenças cardiovasculares: os marcadores de risco em adultos.*Rev. Nutr. vol.17 no.3 Campinas July/Sept. 2004.

CHENG PY, LEE YM, CHUNG MT, SHIH YC, YEN MH.*Role of AMP-activated protein kinase in α-lipoic acid-induced vasodilatation in spontaneously hypertensive rats.*Am J Hypertens. 2012; 25(2):152-8. doi: 10.1038/ajh.2011.196. 2012.

CHANG-HEE, K.; SANG-YOON, C.; HYOG-YOUNG, K.; EUN-HYE, K.; HYUN-MI, K.; JIN-SAN, M.; GEUM-CHAG, J.; HEE-SOO, L.; SEUNG-WON, K.; JONG-MAN,K.; SUHKNEUNG, P.; DONG-KWON, R. *Isolation, characterization, and evaluation of Bacillus thuringiensis isolated from cow milk.* Korean J Vet Res; 52(3):169-176. 2012.

CAMPAGNARO BP, TONINI CL, DOCHE LM, NOGUEIRA BV, VASQUEZ EC, MEYRELLES SS. *Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells.*DNA Cell Biol. 2013;32(8):458-66. doi: 10.1089/dna.2013.2065. 2013.

CARVALHO, M. H. C.;NIGRO, D.;LEMOS, V. S.;TOSTES, R. C. A.;FORTES, Z. B. *Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções*.RevBrasHipertensvol 8(1): janeiro/março, 2001.

CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. *Alimentos funcionais, Uma revisão*. Boletim da SBCTA. v. 29, n.2, p. 193- 203, 2005.

DAVIGNON, J.; GANZ P. *Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis.Circulation.*; 109: III-27-III-32. 2004.

DIAS AT, CINTRA AS, FROSSARD JC, PALOMINO Z, CASARINI DE, GOMES I, BALARINI CM, GAVA AL, CAMPAGNARO BP, PEREIRA TMC, MEYRELLES SS, VASQUEZ EC.*Inhibition of phosphodiesterase 5 restores endothelial function in renovascular hypertension.*J Transl Med.;12:35.10.1186/s12967-014-0250-x.2014.

DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ KN, CRUZ GUERRERO AE, MÁRQUEZ HG, GÓMEZ RUIZ LC, GARCÍA-GARIBAY M, RODRÍGUEZ SERRANO GM.*The antihypertensive effect of fermented milks.* Rev Argent Microbiol. 46(1):58-65. doi: 10.1016/S0325-7541(14)70050-1.2014.

DESOUZA CV. *Does drug therapy reverse endothelial progenitor cell dysfunction in diabetes?*J Diabetes Complications;27(5):519-25. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2013.04.007.2013.

DE BATISTA, P. R.;PALACIOS R.;MARTÍN, A.;HERNANZ, R.;MÉDICI, C. T., SILVA, M. A., ROSSI, E. M.; AGUADO, A.;VASSALLO, D. V.;SALAICES, M.;ALONSO, M. J. *Toll-like receptor 4 upregulationby angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction throughreactive oxygen species production.*PLoS One. 2014 Aug 5;9(8):e104020. doi:10.1371/journal.pone.0104020. eCollection 2014. PubMed PMID: 25093580; PubMedCentral PMCID: PMC4122400.

EHLERS PI, KIVIMÄKI AS, TURPEINEN AM, KORPELA R, VAPAATALO H. *High blood pressure-lowering and vasoprotective effects of milk products in experimental hypertension.*Br J Nutr.2011;106(9):1353-63. doi: 10.1017/S0007114511001723.

FAZAN Jr.,R.;SILVA, V. J. D.;SALGADO, H. C. *Modelos de hipertensão arterial*.RevBrasHipertensvol 8(1): janeiro/março de 2001

FARIA, T. O. *Efeitos cardiovasculares da associação entrebaixas doses de cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio em ratos*. 2014.160 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduaçãoem Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

FERREIRA, L. B.; ALBUQUERQUE, A. A. S.; CELOTTO, A. C. *Fator hiperpolarizante derivado do endotélio e doenças cardiovasculares*. RevSocCardiol. 2011;21(2):40-45.

FERREIRA, C. L.L.F.*Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos*.Cadernos Didáticos, 2005;nº 43, 3º ed, 112 p.. Viçosa: UFV, MG.

FAHNING BM, DIAS AT, OLIVEIRA JP, GAVA AL, PORTO ML, GOMES IB, NOGUEIRA BV, CAMPAGNARO BP, PEREIRA TM, VASQUEZ EC, BALARINI CM, MEYRELLES SS.*Sildenafil improves vascular endothelial structure and function in renovascular hypertension.* Curr Pharm Biotechnol.; 16(9):823-31. doi: 10.2174/1389201016666150610161330.2015.

FÉLÉTOU M, VERBEUREN TJ, VANHOUTTE PM. *Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors.* Br J Pharmacol.;156(4):563-74. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00060.x.2009.

FORESTA C, DE TONI L, MAGAGNA S, GALAN A, GAROLLA A.*Phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil acts on endothelial progenitor cells by CXCR4 signalling.*CurrDrug Deliv.;7(4):274-82. doi: 10.2174/156720110793360595. 2010.

FRAGA-SILVA R. A.; COSTA-FRAGA, F. P.; MURÇA, T. M.; MORAES, P. L.; MARTINS L. A.; LAUTNER, R. Q.; CASTRO, C. H.; SOARES, C. M.; BORGES, C. L.; NADU, A. P.; OLIVEIRA, M. L.; SHENOY, V.; KATOVICH, M. J.; SANTOS, R. A,; RAIZADA, M. K.; FERREIRA, A. J. *.Angiotensin-convertingenzyme 2 activation improves endothelialfunction. Hypertension* 2013;61(6):1233-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00627.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V.*The obligatory role of endothelial cells inthe relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*.Nature.v. 288, n. 5789,p. 373-376, 1980.

GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; ANTONI, G.L. *Inhibitory power of kefir: the role of organic acids.*Journal of Food. Protection;v.63 (3), p.364-369.,2000.

GARDINER, G. J.;DEFFIT,S. N.; MCLETCHIE,S.;PÉREZ, I.;WALLINE, C. C.;.BLUM, J. S.; *A role for NADPH oxidase in antigen presentation*.Volume 4.Article 295/1.September, 2013.

GIRIBELA, R. G. C.; GENGO, R.; HONG, V.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. *Função e disfunção endotelial: da fisiopatologia às perspectivas de uso em pesquisa e na prática clínica*. RevBras Hipertens.;8(1):27-32. 2011.

GÓMEZ-ROSO M, MONTERO MJ, CARRÓN R, SEVILLA MA.*Cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats are improved by chronic treatment with zofenopril.* Br J Pharmacol.; 158(8):1911-21. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00491.x.2009.

GUVEN M, AKMAN T, YENER AU, SEHITOGLU MH, YUKSEL Y, COSAR M. *The neuroprotective effect of kefir on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rats.* J Korean Neurosurg Soc. 2015;57(5):335-41. doi: 10.3340/jkns.2015.57.5.335.

GUOPING, Z.;, HAIZHOU, L.; JING, H.; YONGMING, Y.; ZHIMING, Y. *The occurrence of Bacillus cereus, B. thuringiensis and B. mycoides in Chinese pasteurized full fat milk.*International Journal of Food Microbiology, 121,195–200. 2008.

GULITZ, A. J.; STADIE, M.A.; EHRMANN, W.; LUDWIG, R.F. *Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis.* Journal of Applied Microbiology 114 (2013), 1082-1091. 2013.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L.Chemical and microbiological characterisation of kefir grains.*Journal of Dairy Research,*68639±652. 2001.

GARCÍA, L. L.; AGUDO, L. C.; POLAINA, J. *Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes.* World J MicrobiolBiotechnol23:785–791. 2007.

GROTE, K.; ORTMANN*,* M.; SALGUERO, G.; DOERRIES, C.; LANDMESSER, U.; LUCHTEFELD, M.; BRANDES, R.P.; GWINNER, W.; TSCHERNIG, T.; BRABANT, E.G.; KLOS, A.; SCHAEFER, A.; DREXLER, H.; SCHIEFFER, B*. Critical role for p47phox in renin-angiotensin system activation and blood pressure regulation.* Cardiovasc Res, v.71(3), p.596-605, 2006.

GROVER-PÁEZ F. & ZAVALZA-GÓMEZ A. B. *Endothelial dysfunction and cardiovascular risk.Diabetes research and clinical practice*. 2009;84:1-10.

HARIRI M, SALEHI R, FEIZI A, MIRLOHI M, KAMALI S, GHIASVAND R. *The effect of probiotic soy milk and soy milk on anthropometric measures and blood pressure in patients with type II diabetes mellitus: A randomized double-blind clinical trial.*ARYA Atheroscler. 11(1Suppl):74-80.2015.

HAYAKAWA H, HIRATA Y, SUZUKI E, SUGIMOTO T, MATSUOKA H, KIKUCHI K, NAGANO T, HIROBE M, SUGIMOTO T. *Mechanisms for altered endothelium-dependent vasorelaxation in isolated kidneys from experimental hypertensive rats.* Am J Physiol.264(5 Pt 2):H1535-41. PubMed PMID: 8498567.1993.

HAMET, M. F.; LONDERO, A.; MEDRANO, M.; VERCAMMEN, E.; VAN HOORDE, K.; GARROTE, G. L.; HUYS, G.; VANDAMME, P.; ABRAHAM, A. G. *Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of*

Lactobacillus kefiranofaciens in microbial consortia present in kefir grains. Food Microbiology: 36(2013).327e334. 2013.

HONDA H, UNEMOTO T, KOGO H.*Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats.* Hypertension 1999; 34(6):1232-6.doi: 10.1161/01.HYP.34.6.1232.

HAMZA SM, DYCK JR.*Systemic and renal oxidative stress in the pathogenesis of hypertension: modulation of long-term control of arterial blood pressure by resveratrol.* Front Physiol. 2014;5:292. doi: 10.3389/fphys.2014.00292.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING,S. M. *The use of bacterial spore formers as probiotics.* FEMS Microbiology Reviews 29 (2005) 813–835. 2005.

HERTZLER, S.R.; CLANCY, S.M. *Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion.*Journal of the American Dietetic Association, 2003; v.103, p. 582-587.

HANSSON, G.K. *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease.* N Engl J Med. 2005;352:1685-1695.

INGLEDEW,W. M.; SIVASWAMY,G.; BURTON,J. D. *The api 20e microtube system for rapid identification of gram negative brewery bacteria*. J. lust.Brew., July-August, 1980, Vol. 86, pp. 165-168. 1980.

JAMES, P. A.,*et al.Evidence-based guideline for the management of highblood pressure in adults: report from the panel members appointed to the EighthJoint National Committee (JNC 8).*The Journal of the American MecialAssociation.v. 311, n. 5, p. 507-520, 2014.

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 PhysiolPharmacol.60(4):11-20.PubMed PMID: 20065492.2009.

JAUHIAINEN T, VAPAATALO H, POUSSA T, KYRONPALO S, RASMUSSEN M, KORPELA R.*Lactobacillus helveticus fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement.*Am J Hypertens. 2005;18:1600–5. doi:10.1016/j.amjhyper.2005.06.006.

JUNIOR, R. F., et al.*Modelos de hipertensão arterial*. RevBrasHipertens,2001; 8: 19-29.

KATO, T.; MIZUGUCHI, N.;ITO, A. *Blood pressure, renal biochemical parameters andhistopathology in an original rat model of essential hypertension (SHRSP/Kpostrain)*. Biomed Res. 2015;36(3):169-77. doi: 10.2220/biomedres.36.169. PubMed PMID: 26106046.

KANBAK G, UZUNER K, KUŞAT OL K, OĞLAKÇI A, KARTKAYA K, ŞENTÜRK H.*Effect of kefir and low-dose aspirin on arterial blood pressure measurements and renal apoptosis in unhypertensive rats with 4 weeks salt diet.*ClinExpHypertens.36(1):1-8. doi: 10.3109/10641963.2013.783046.2014.

KAUSER K, RUBANYI GM.*Gender difference in endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats.* Hypertension;25(4 Pt 1):517-23. doi: 10.1161/01.HYP.25.4.517.1995.

LAI, W. K.; KAN, M. Y. *Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction*.Ann NutrMetab.2015;67(1):1-12. doi: 10.1159/000437098. Epub 2015 Jul 18. PubMed PMID: 26201664. 2015.

LAWES, C.M.; HOORN, S. V.; RODGERS, A. *Global burden of bloodpressure-related disease*.Lancet.v.371, n. 9623, p. 1513-1518, 2008.

LEAL MA, BALARINI CM, DIAS AT, PORTO ML, GAVA AL, PEREIRA TMC, MEYRELLES SS, VASQUEZ EV. *Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of atherosclerosis: the beneficial effects of sildenafil.*CurrPharmacBiotech.16(6):517-530. doi: I: 10.2174/1389201016061504071134 58. 2015.

LEE, M.Y.; AHN, K.S.; KWON, O.K.; KIM, M.J.; KIM, M.K.; LEE, I.N.; OH, S.R.; LEE, H. K. *Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model.*Immunobiology, 2007; v.212, p.647–654.

LEITE, A. M. O.; MAYO, B.; RACHID, C. T. C. C.; PEIXOTO, R. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F.; DELGADO, S. *Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis.*Food Microbiology 31 (2012) 215 e 221. 2012.

LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. *Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage.*BrazilianJournalofMicrobiology 44, 2, 341-349. 2013.

LIMA LC, PORTO ML, CAMPAGNARO BP, TONINI CL, NOGUEIRA BV, PEREIRA TM, VASQUEZ EC, MEYRELLES SS. *Mononuclear cell therapy reverts cuff-induced thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice.* Lipids Health Dis. 2012;11:96. doi:10.1186/1476-511X-11-96.

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.;56(3):174-83. doi: 10.1155/2013/845037.2013.

LINCOLN, T.M.; DEY, N.; SELLAK, H. *Invited review: cGMP-dependent proteinkinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone togene expression.*Journal of Applied Physiology. v. 9, n. 3, p. 1421-1430, 2001

LIU, J.R.; CHEN, M.J.; LIN, C.W. *Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk*.Journal of Food Science, 2002; v.67, p.104-108.

LONDERO, A.; HAMET, M. F.; DE ANTONI, G.L.; GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G. *Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation.*Journal of Dairy Research.79, 262 e 271. 2012.

LOPITZ- OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J.*KEFIR: A symbiot yeasts- bacteria community with alleged healthy capabilities.*RevIberoamMicol, 2006;v.23, p.67-74.

Maeda H, Zhu X, Suzuki S, Suzuki K, Kitamura S. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharidekefiran produced by Lactobacillus kefiranofaciens WT-2B(T). J AgricFoodChem. 2004;52(17):5533-8. doi: 10.1021/jf049617g

MANSUR, A. D. P; FAVARATO, D. *Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011*. Arq Bras Cardiol. 2012;99:755-61.

MARÍN, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M. A. *Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions.*Pharmacology & Therapeutics. v. 75, n. 2, p. 111-134, 1997.

MCINTYRE, M.; BOHR, D. F.; DOMINICZAK, A. F. *Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion.*Hypertension, v. 34, p. 53-45, 1999.
McMaster WG, Kirabo A, Madhur MS, Harrison DG.Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage.Circ Res. 2015;116(6):1022-33. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303697.

MELO, J. B.; NETO, J. A. F; CAMPOS, R. C. A.; MEIRELES, M. F.; COSTA, E. C. C.; LEAL, M. C. M. *Estudo da Função Endotelial no Brasil: Prevenção de Doenças Cardiovasculares*. RevBrasCardiol. 2014;27(2):616-623.

MEYRELLES SS, PEOTTA VA, PEREIRA TMC, VASQUEZ EC.*Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging.* Lipids Health Dis.;10:211.doi: 10.1186/1476-511X-10-211.2011

Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. Can J Cardiol. 2015;31(5):631-41. doi:10.1016/j.cjca.2015.02.008.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. *Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios a saúde.*Revista Eletrônica de Farmácia*,* v. 3, p. 109-122, 2006.

MUSSO, M. N.; VASQUEZ, E. C.; CARVALHINHO, F. B.; BISSOLI, N. S.; CABRAL, A. M. *Chlorthalidonealtersthe vascular reactivityof DOC-salthypertensiveratstonorepinephrine.*Braz J MedBiol Res. 1990;23(10):999-1003.

Nakamura N, Naruse K, Matsuki T, Hamada Y, Nakashima E, Kamiya H, Matsubara T, Enomoto A, Takahashi M, Oiso Y, Nakamura J. Adiponectinpromotesmigrationactivitiesofendothelial progenitor cells via Cdc42/Rac1. FEBS Lett. 2009;583(15):2457-63. doi: 10.1016/j.febslet.2009.07.011.

PARASURAMAN, S.; RAVEENDRAN, R. *Measurement of invasive bloodpressure in rats.*Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics. v. 3, n.2, p. 172-177, 2012.

PEPINE, C. J. *The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility*.Am J Med. 2009; 122 (5 Suppl): S10-5.

PEREIRA, T. M.; NOGUEIRA, B. V.; LIMA, L. C.; PORTO, M. L.; ARRUDA, J. A.; VASQUEZ, E. C., MEYRELLES, S. S.*Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influenceof gender.* Lipids Health Dis. 2010 Aug 19;9:87. doi: 10.1186/1476-511X-9-87.PubMed PMID: 20723257; PubMed Central PMCID: PMC2936359.

PEREIRA, R. B.; VASQUEZ, E. C.; STEFANON, I.; MEYRELLES, S. S. *Oral P. gingivalis infection alters the vascular reactivity in healthy and spontaneously atherosclerotic mice.*Lipids Health Dis. 2011 May 17;10:80. doi: 10.1186/1476-511X-10-80.

PIRES, J. G.; CABRAL, A. M.;VASQUEZ, E. C.; BISSOLI, N. S. *Effect of high ethanol intake on vascular reactivity to serotonin, vasopressin and acetylcholine in normotensiverats.*J IntMed Res. May-Jun;21(3):133-7. 1993.

PROTASIO, L. D. L.; LAURINDO, R. M.; CHAGAS, A. C. P. *Endotélio & doenças cardiovasculares.*Editora Atheneu. 2005.

PENG J, LIU B, MA QL, LUO XJ.Dysfunctional endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases: role of NADPH oxidase. J CardiovascPharmacol. 2015;65(1):80-7. doi: 10.1097/FJC.0000000000000166.

PORTO ML, LIMA LC, PEREIRA TM, NOGUEIRA BV, TONINI CL, CAMPAGNARO BP, MEYRELLES SS, VASQUEZ EC.Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. Lipids Health Dis. 2011;10:155. doi: 10.1186/1476-511X-10-155.

PIDOUX, M.;MARSHALL, V. M.;ZANONI, P.;BROOKER, B.*Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation.*J ApplBacteriol. 1990 Sep;69(3):311-20. 1990.

POGAČIĆ, T.; ŠINKO, S.; ZAMBERLIN, Š.; SAMARŽIJA, D. *Microbiota ofkefirgrains.*Mljekarstvo*63* (1), 3-14. 2013.

PEREIRA, C.A.; KRIGER, J.E. *Dos fatores de risco clássicos ao perfil de risco individualizado.*Hipertensão. v. 8, p. 131-137, 2005.
PĂUCEAN, A.; SOCACIU,C.*Probiotic activity of mixed cultures of kefir's lactobacilli and non-lactose fermenting yeasts.*Bulletin UASVM, Agriculture 65(2). 2008.

QUINN, M. T.; AMMONS, M. C.; DELEO, F.R.*The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction.*ClinSci, v. 111(1), p. 1-20, 2006.

ST-ONGE, M.P.; FARNWORTH, E.R.; SAVARD, T.; CHABOT, D.; MAFU, A.; JH JONES, P. *Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol*

*fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial.*BMC ComplementaryandAlternative Medicine; v. 2, p. 1-7. 2002.

Ramchandran L, Shah NP. Yogurt can beneficially affect blood contributors of cardiovascular health status in hypertensive rats. J Food Sci. 2011; 76(4):H131-6. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02127.x.

Rodríguez-Figueroa JC, González-Córdova AF, Astiazaran-García H, Vallejo-Cordoba B. Hypotensive and heart rate-lowering effects in rats receiving milk fermented by specific Lactococcuslactis strains. Br J Nutr. 2013;109(5):827-33. doi: 10.1017/S0007114512002115.

RIO DE JANEIRO. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Carta do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em http://cardiol.br/brasilprevent/2012/pdf/Carta_do_Rio_Portugues.pdf Acesso 06/006/2014.

SARKAR, S. *Potential of kefir as a dietetic beverage – a review.*British Food Journal, 2007;v. 109(4), p. 280-290. 2007.

SIRO, I.; KAPOLNA, E.; KAPOLNA, B.; LUGASI, A. *Functional food.Productdevelopment, marketing and consumer acceptance – A review.*Appetite, v. 51, p. 456- 467, 2008.

Saad MI, Abdelkhalek TM, Saleh MM, Kamel MA, Youssef M, Tawfik SH, Dominguez H. Insights into the molecular mechanisms of diabetes-induced endothelial dysfunction: focus on oxidative stress and endothelial progenitor cells. Endocrine 2015; Epub ahead of print.doi:10.1007/s12020-015-0709-4.

SARKAR, P.K.; HASENACK, B.; NOUT,M.J.R.*Diversity and functionality of Bacillus and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans (Indian Kinema) and locust beans (African Soumbala).*International Journal of Food Microbiology. 77.175– 186. 2002

SURIASIH, K.; ARYANTA, W. R.; MAHARDIKA, G.; ASTAWA, N. M. *Microbiological and chemical properties of kefir made of bali cattle milk.*Food Science and Quality Management. Vol 6, p12-22, 2012.

SANDERS, M.E.; MORELLI, L.; TOMPKINS,T.A. *Sporeformers as Human Probiotics: Bacillus,Sporolactobacillus, and Brevibacillus.*Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol. 2, 2003.p 101-110. 2003.

SCHWAN, R. F.; GUEDES, K. T. M.; DIAS D. R. *Kefir - grains and beverages: a review.*Scientia Agraria Paranaensis – SAP; ISSN: 1983-1471. v. 14, n. 1, jan./mar., p. 1-9, 2014.

TEIXEIRA, B. C.; LOPES A. L.; MACEDO, R. C. O.; CORREA, C. S.; RAMIS, T. R.; RIBEIRO, J. L., et al. *Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares.*J. vasc. bras;13:2 .2014.

TIMPONI, C. F.;OLIVEIRA, N. E.;ARRUDA, R. M.;MEYRELLES, S. S.;VASQUEZ, E. C. *Effects of thelocalanaestheticropivacaine on vascular reactivity in the mouse*

*perfusedmesenteric arteries.*Basic ClinPharmacolToxicol. 2006 May;98(5):518-20. 2006.

Turpeinen AM, Ehlers PI, Kivimäki AS, Järvenpää S, Filler I, Wiegert E, Jähnchen E, Vapaatalo H, Korpela R, Wagner F. Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro tripeptide-containing milk product has acute blood pressure lowering effects in mildly hypertensive subjects. ClinExpHypertens. 2011;33(6):388-96. doi: 10.3109/10641963.2010.549267

Tang EH, Vanhoutte PM. Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. PharmacolTher. 2009;122:140–149.doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.02.006.

Toral M, Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Romero M, Sánchez M, Utrilla MP, Garrido-Mesa N, Rodríguez-Cabezas ME, Olivares M, Gálvez J, Duarte J. The probiotic Lactobacillus coryniformis CECT5711 reduces the vascular pro-oxidant and pro-inflammatory status in obese mice. Clin Sci. (Lond)2014;127(1):33-45. doi: 10.1042/CS20130339.

Tripolt NJ, Leber B, Blattl D, Eder M, Wonisch W, Scharnagl H, Stojakovic T, Obermayer-Pietsch B, Wascher TC, Pieber TR, Stadlbauer V, Sourij H. Effect of supplementation with Lactobacillus caseiShirota on insulin sensitivity, β-cell function, and markers of endothelial function and inflammation in subjects with metabolic syndrome--a pilot study. J Dairy Sci. 2013;96(1):89-95. doi: 10.3168/jds.2012-5863.

Teruya K, Yamashita M, Tominaga R, Nagira T, Shim SY, Katakura Y, Tokumaru S, Tokumaru K, Barnes D, Shirahata S. Fermented milk, Kefram-Kefir enhances glucose uptake into insulin-responsive muscle cells. Cytotechnology 2002;40(1-3):107-16. doi: 10.1023/A:1023926407877.
Tousoulis D, Andreou I, Antoniades C, Tentolouris C, Stefanadis C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. Atherosclerosis 2008;201(2):236-47. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.034.

Tilling L, Chowienczyk P, Clapp B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. Br J ClinPharmacol. 2009;68(4):484-92. doi: 10.1111/j.1365-2125.2009.03486.x.

Turgeon J, Haddad P, Dussault S, Groleau J, Maingrette F, Perez G, Rivard A. Protection against vascular aging in Nox2-deficient mice. Impact on endothelial progenitor cells and reparative neovascularization. Atherosclerosis 2012;223(1):122-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.05.003.

TESFAMARIAM B, OGLETREE ML. Dissociation of endothelial cell dysfunction and blood pressure in SHR. Am J Physiol. 1995;269(1 Pt 2):H189-94.

TODOROV, S. D.; DICKS,L. M.T. *Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties.*Annals of Microbiology, 58 (4)661-670. 2008.

TAMAI, Y.; YASHIMITSU, N.; WATANABE, Y.; KUWABARA, Y.; NAGAI, S. *Effects of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum*

*cholesterol level in rats.*Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996; v. 81, p. 181-182. 1996.

ÜNAL,B. Ü.; ARSLANOĞLU,A.*Phylogenetic identification of bacteria within kefir by both culture-dependent and culture-independent methods.*African Journal of Microbiology Research.Vol. 7(36), pp. 4533-4538, 6 September, 2013.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.*Int J Biochem Cell Biol, v. 39(1), p. 44-84, 2007.

VASQUEZ, E. C.; BISSOLI, N. S.; MOYSES, M. R.; CABRAL, A. M. *Contractile reactivity of theperfused mesenteric vascular bed from sinoaorticdenervated rats tonorepinephrine, methoxamine and verapamil.*Braz J Med Biol Res.1988;21(3):629-32. 1988.

VIRDIS A, COLUCCI R, VERSARI D, GHISU N, FORNAI M, ANTONIOLI L, DURANTI E, DAGHINI E, GIANNARELLI C, BLANDIZZI C, TADDEI S, DEL TACCA M. *Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids.* Hypertension2009;53(6):1008-16. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.132258.

VERESH Z, RACZ A, LOTZ G, KOLLER A. *ADMA impairs nitric oxide-mediated arteriolar function due to increased superoxide production by angiotensin II-NAD(P)H oxidase pathway.*Hypertension 2008;52(5):960-6. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.116731.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. Revista Hipertensão. v. 13, n. 1, p. 1-68, 2010.

VIEIRA, A. C. P.; CORNÉLIO, A. R.; SALGADO, J. M. *Alimentos funcionais: aspectos relevantes para o consumidor.*Jus Navigandi. Teresina, ano 10, n. 1123, julho.2006.

WESELER, A.R.; BAST, A. *Oxidative stress and vascular function: implicationsfor pharmacologic treatments.*Current Hypertension Reports. v. 12, n. 3, p.154-161, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2011. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control.Disponívelem: http://www.who.int/cardiovascular_ diseases/publications/atlas_cvd/en/Acesso 18/08/2015.

WILLIAMS, H.C.; GRIENDLING, K.K. *NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents?*J CardiovascPharmacol, v. 50, p. 9-16, 2007.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN,T.; BRITZ, T. J*. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains.*International Journal of Dairy Technology. Vol 56, nº 3 August ,2003.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN,T.; BRITZ, T. J.*Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation.*International Dairy Journal 15 (2005) 383–389. 2005.

YANG D, FÉLÉTOU M, BOULANGER CM, WU HF, LEVENS N, ZHANG JN, VANHOUTTE PM. *Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats.*Br J Pharmacol.2002;136:104–10.doi: 10.1038/sj.bjp.0704669.

YADAV, J. S. S.; BEZAWADA, J.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. *Candida krusei: biotechnological potentials and concerns about its safety*. Can. J. Microbiol.58: 937–952. 2012.

ZALBA G, BEAUMONT FJ, SAN JOSÉ G, FORTUÑO A, FORTUÑO MA, ETAYO JC, DÍEZ J. *Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats.* Hypertension 2000;35(5):1055–61. doi:1161/01.HYP.35.5.1055.

ZHANG JX, YANG JR, CHEN GX, TANG LJ, LI WX, YANG H, KONG X. *Sesamin ameliorates arterial dysfunction in spontaneously hypertensive rats via downregulation of NADPH oxidase subunits and upregulation of eNOS expression.*ActaPharmacol Sin. 2013;34(7):912-20. doi: 10.1038/aps.2013.1.