

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**BENEFÍCIOS DO PROBIÓTICO KEFIR NA HIPERTENSÃO
EXPERIMENTAL: MECANISMOS CENTRAIS E PERIFÉRICOS**

MIRIAN DE ALMEIDA SILVA

VILA VELHA
JULHO / 2019

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**BENEFÍCIOS DO PROBIÓTICO KEFIR NA HIPERTENSÃO
EXPERIMENTAL: MECANISMOS CENTRAIS E PERIFÉRICOS**

Tese apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito parcial do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

MIRIAN DE ALMEIDA SILVA

VILA VELHA
JULHO / 2019

Catalogação na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S586b

Silva, Mirian de Almeida.

Benefícios do probiótico kefir na hipertensão experimental:
mecanismos centrais e periféricos / Mirian de Almeida Silva - 2019.

103 f. : il.

Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

Coorientadora: Vinicia Campana Biancardi.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila
Velha, 2019.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Probióticos. 3. Intestinos –
Doença. I. Andrade, Tadeu Uggere de. II. Biancardi, Vinicia
Campana. III. Universidade Vila Velha. IV. Título

CDD 615

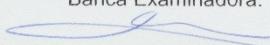
MIRIAN DE ALMEIDA SILVA

**BENEFÍCIOS DO PROBIÓTICO KEFIR NA HIPERTENSÃO
EXPERIMENTAL: MECANISMOS CENTRAIS E PERIFÉRICOS**

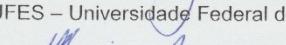
Tese apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito parcial do Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

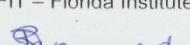
Aprovada em 08 de julho de 2019,

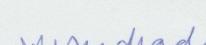
Banca Examinadora:


Lívia Carla de Melo Rodrigues
(UFES – Universidade Federal do Espírito Santo)


Nazaré Souza Bissoli
(UFES – Universidade Federal do Espírito Santo)


Kenia Pedrosa Nunes
(FIT – Florida Institute of Technology)


Vinicio Campana Biancardi
(AU – Auburn University)
Co-Orientador


Tadeu Uggere de Andrade
(UVV- Universidade Vila Velha)
Orientador

Dedico este trabalho à minha família e a todos que participaram direta ou
indiretamente da pesquisa.

Agradecimentos,

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Deus por ter me sustentado até aqui, sem benção divina, seria impossível suportar a solidão, a distância da família e a pressão nos momentos mais conturbados dessa trajetória.

Aos meus grandes mestres da ciência e da vida, meus orientadores Dr. Tadeu Andrade e Dra. Vinicia Biancardi. A vocês faltam-me palavras para agradecer o empenho e a dedicação destinada a mim e a meus estudos durante esse período.

A CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado, à FAPES e CNPQ pelo apoio a pesquisa, fundamentais para realização deste estudo e crescimento profissional.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório pelas ajudas, pelo trabalho em conjunto, e por toda a diversão que tivemos nos últimos três anos e meio. Também agradeço aos meus amigos da instituição Ana Cláudia Hertel, Andrews Marques, Ewelyne Lima e Girlandia Brasil. Em particular, agradeço à Dra. Denise Endringer, que é sempre um exemplo de mulher em pesquisa e vida.

Também sou grata a Sarah Peaden e Francesca Mowry do laboratório da Auburn University, onde passei um ano e dois meses desenvolvendo parte da pesquisa.

Um agradecimento especial à minha família. As palavras não podem expressar o quanto sou grato aos meus pais e aos meus irmãos por me apoiarem sempre que preciso. Eu amo vocês.

Eu gostaria de agradecer a minha irmã Michele Mendes. Obrigado por estar sempre ao meu lado.

Também gostaria de agradecer a todos os meus amigos que, mesmo com à distância que por muitas vezes o estudo me fez estar, continuaram presentes me apoiando.

Agradeço o grande presente que o doutorado me trouxe. Vinicia Biancardi você foi uma companheira, amiga, mãe, professora e grande promotora desta jornada. Vi, você é minha inspiração.

Meus sinceros agradecimentos também a Alex por ter me acompanhado durante essa trajetória.

Por fim, agradeço a todos aqueles que passaram pela minha vida nestes 3 anos e meio de doutorado, que me deixaram um sorriso ou um bom abraço matinal, deixando meus dias mais leves e mais felizes.

Mirian de Almeida Silva; Dr; Universidade Vila Velha – ES; Julho 2019;
Benefícios do probiótico kefir na hipertensão experimental: mecanismos centrais e periféricos. Orientador: Tadeu Uggere de Andrade. Coorientador: Vinicia Campana Biancardi

RESUMO

Probiótico kefir diminui a pressão arterial e promove melhoria geral na função cardiovascular em animais hipertensos. A hipertensão envolve diversos mecanismos e está associada à disbiose do intestino, processos inflamatórios e à desregulação do eixo do intestino-cérebro. Trabalhos anteriores mostraram que os tratamentos probióticos exercem efeitos cardiovasculares benéficos em humanos e modelos animais de hipertensão. Com base nisso, levantamos a hipótese de que ambos os mecanismos mediados perifericamente e centralmente podem fundamentar os efeitos anti-hipertensivos do kefir. Nós avaliamos o efeito do tratamento a longo prazo com kefir na anatomia e fisiologia intestinal, na inflamação e controle simpático central, bem como na hipertrofia e melhora da função cardíaca (contratilidade cardíaca e proteínas de manuseio de cálcio) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Ratos normotensos machos (WKYs) e SHRs foram separados em três grupos: SHRs tratados com leite fermentado pelos grãos de kefir (5%; SHR-Kefir; gavagem oral, 0,3mL / 100g / 9 semanas) e WKYs e SHRs tratados com leite. No final do tratamento, a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram medidas. Análises histológicas da parede intestinal do jejuno foram realizadas (células de Paneth/cripta e espessura da túnica muscular) bem como níveis séricos de lipopolissacárides (LPS) foram medidos a fim de identificarmos a saúde da barreira intestinal. A ativação da microglia e atividade simpática central (avaliada por meio da expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) foram analisadas por imunohistoquímica, no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e medula ventrolateral rostral (RVLM). Além disso, avaliamos fisiopatologias do coração envolvendo hipertrofia cardíaca (razão peso do VE/peso corporal) e parâmetros hemodinâmicos (pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), constante de tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo (Tau), decaimento máximo e mínimo da pressão (+/- dP/dt) por meio de implantação do cateter ventricular esquerdo. Por fim, a expressão de proteínas envolvidas no manuseio do Ca²⁺(PLB, e fosforilada (p) -PBL) e retículo sarcoplasmático de Ca²⁺-ATPase (SERCA2a) foram determinados por Western blot.

Nove semanas de tratamento com kefir reduziu a PAM e FC nos animais hipertensos. No intestino o kefir normalizou o número de células de Paneth e a espessura da túnica muscular intestinal. O kefir também normalizou níveis séricos de LPS. No cérebro, a ativação de microglia e expressão de TH, no PVN e RVLM, foram normalizadas enquanto que no coração o tratamento com kefir reduziu a hipertrofia cardíaca, melhorando a função cardíaca por meio da melhoria da contratilidade cardíaca e proteínas de manuseio de cálcio.

Juntamente, nossos dados mostram que o tratamento em longo prazo com kefir reduziu a pressão sanguínea por mecanismos que envolvem a melhora da integridade estrutural e funcional da parede intestinal, possível melhora da

ruptura da barreira intestinal, proteção contra neuroinflamação e redução da hiperatividade simpática em núcleos cardiovasculares do cérebro, bem como a redução da hipertrofia cardíaca e melhora da função cardíaca.

Palavras-chave: Probióticos, Hipertensão, Doença intestinal, Atividade simpática, Microglia, Neuroinflamação, Hipertrofia cardíaca, Contratilidade cardíaca.

Silva-Cutini, Mirian de Almeida Silva; PhD; Universidade Vila Velha – ES; Julho 2019; **Benefícios do probiótico kefir na hipertensão experimental: mecanismos centrais e periféricos.** Advisor: Tadeu Uggere de Andrade. Co-advisor: Vinicia Campana Biancardi.

ABSTRACT

Probiotic kefir diminishes blood pressure and promotes overall improvement in cardiovascular function in hypertensive animals. Hypertension involves several mechanisms and is associated with gut dysbiosis, inflammation and dysregulation of the gut-brain axis. Previous work has shown that probiotic treatments exert beneficial cardiovascular effects in humans and animal models of hypertension. Based on this, we hypothesized that both peripherally and centrally mediated mechanisms may support the antihypertensive effects of kefir. We evaluated the effect of long-term treatment with kefir on intestinal anatomy and physiology, neuroinflammation and central sympathetic control, as well as hypertrophy and cardiac function (cardiac contractility and calcium-handling proteins) in spontaneously hypertensive rats (SHR). Male normotensive rats (WKYs) and SHRs were separated into three groups: Male normotensive rats (WKYs) and SHRs were divided into three groups: WKYs and SHRs treated with vehicle, and SHRs treated with milk fermented by the grains of kefir (5%; SHR-Kefir; oral gavage, 0.3mL/100g daily/9 weeks). At the end of treatment, blood pressure (MAP) and heart rate (HR) were measured. Histological analyzes of the intestinal wall of the jejunum were performed (Paneth/crypt cells and muscle tunica thickness) as well as serum levels of lipopolysaccharides (LPS) were measured to identify the health of the intestinal barrier. Microglia activation and central sympathetic activity (assessed by expression of the enzyme tyrosine hydroxylase (HT) were analyzed by immunohistochemistry in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and rostral ventrolateral medulla (RVLM). In addition, we evaluated heart pathophysiologies involving cardiac hypertrophy (LV weight / body weight ratio) and hemodynamic parameters (left ventricular systolic pressure (PSVE), left ventricular isovolumetric relaxation time (Tau), maximum and minimum. Finally, the expression of calcium-handling proteins (PLB, and phosphorylated (p)-PBL) and Ca^{2+} -ATPase sarcoplasmic reticulum (SERCA2a) were determined by Western blotting.

Nine weeks of kefir treatment reduced MAP and HR in hypertensive animals. In the intestine, kefir normalized the number of Paneth cells and the thickness of the intestinal muscular tunica. Kefir also normalized serum levels of LPS. In the brain, microglia activation and TH expression in PVN and RVLM were normalized while in the heart kefir treatment reduced cardiac hypertrophy by ameliorate cardiac function by improving cardiac contractility and calcium-handling proteins. Taken together, our data show that long-term kefir treatment has reduced blood pressure by mechanisms involving improved structural and functional integrity of the intestinal wall, possible improvement of intestinal barrier rupture, neuroinflammation protection, and sympathetic hyperactivity reduction in cardiovascular nuclei of the brain as well as reducing cardiac hypertrophy and improving cardiac function.

Keywords: Probiotics, Hypertension, Gut disease, Microglia, Sympathetic activity, Neuroinflammation, Cardiac hypertrophy, Cardiac contractility.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	18
1.1. Hipertensão: um problema de saúde pública	18
1.2. Hipertensão: causas, consequências e relevância do tratamento.....	18
1.3. Mecanismos envolvidos no controle da pressão arterial.....	19
1.4. Mecanismos cardíacos envolvidos na hipertensão arterial.....	23
1.5. Interação intestino cérebro durante a hipertensão.....	25
1.6. Probiótico	28
1.7. Kefir.....	29
1.1 Hipótese	32
1.2 Referências bibliográficas	32
2. OBJETIVOS.....	45
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos	45
3. CAPÍTULO 1	
Artigo 1. Long-term treatment with kefir probiotics ameliorates cardiac function in spontaneously hypertensive rats.....	46
Abstract	48
Introduction	50
Methods	51
Results	55
Discussion	60
References	64
4. CAPÍTULO 2	
Artigo 2. Kefir ameliorates hypertension via a gut-brain mechanism.....	71
Abstract	73
Introduction	75
Materials and methods	76

Results	79
Discussion	84
References	89
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	91
APÊNDICE	92

LISTA DE FIGURAS

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 Representação esquemática de regiões do cérebro envolvidas no funcionamento cardiovascular. Núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN), núcleo do trato solitário (NTS) e a medula ventrolateral rostral (RVLM).....	21
Figura 2 Mecanismo de controle da pressão arterial pelo Sistema Renina Angiotensina.....	22
Figura 3 Estrutura da bomba do retículo sarcoplasmático ATPase 2 (SERCA-2a) em diferentes concentrações de cálcio (Ca^{2+}) citosólico.....	24
Figura 4 Mecanismos de interação intestino-cérebro.....	26
Figura 5 Mosaico da teoria da hipertensão revisado, demonstrando a influência da microbiota no controle da pressão arterial e hipertensão.....	27
Figura 6 Fotomicrografia dos grãos de Kefir e micrografia eletrônica da superfície externa e interna dos grãos de Kefir.....	30

II. CAPÍTULO 1

Long-term treatment with kefir probiotics ameliorates cardiac function in spontaneously hypertensive rats.

Figura 1 Long-term treatment of kefir decreased blood pressure and normalized heart rate in SHR animals.....	56
Figura 2 Kefir ameliorates the left ventricle-to-body weight ratio index (LVW/BW) in hypertensive animals.....	56
Figura 3 Kefir improved cardiac function in hypertensive animals.....	57
Figura 4 Kefir treatment normalized the calcium-handling proteins in hypertensive animals.....	58
Figura 5 Probiotics normalized sympathetic signaling within the PVN of SHRs.....	59

III. CAPÍTULO 2

Kefir ameliorates hypertension via gut-brain mechanism in spontaneously hypertensive rats.

Figura 1 Long-term treatment of kefir diminishes BP in SHRs.....80

Figura 2 Pathophysiological alterations in gut epithelial barrier during hypertension partially rescued by kefir treatment81

Figura 3 Morphological changes in gut epithelial barrier during hypertension are rescued by kefir treatment.....82

Figura 4 Elevated serum endotoxin levels in SHRs are reversed by kefir treatment83

Figura 5 Neuroinflammation present in SHR is prevented by the use of probiotics.....84

LISTA DE ABREVIATURAS

PAM – Pressão Arterial Média

FC – Frequência Cardíaca

HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica

PA - Pressão Arterial

AVC - Acidente Vascular Cerebral

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

DCV - Doenças Cardiovasculares

OMS - Organização Mundial da Saúde

SNP - Sistema Nervoso Periférico

SNC - Sistema Nervoso Central

SNA - Sistema Nervoso Autonômico

SNS - Sistema Nervoso Simpático

NTS - Núcleo do Trato Solitário

RVLM - Bulboventrolateralrostral

PVN - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

AngII - Angiotensina II

SRAA - Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

SRA - Sistema Renina Angiotensina

ECA - Enzima Conversora Angiotensina

ADH - Hormônio Antidiurético

VE - Ventrículo Esquerdo

SHR - Ratos Espontaneamente Hipertensos

dP/dT - Derivada de pressão/Derivada de tempo

RS - Retículo Sarcoplasmático

PLB - Fosfolamba

SI - Sistema Imune

AT1 - Receptor tipo 1 de Angiotensina

AT2 - Receptores tipo 2 de Angiotensina

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

LPS - Lipopolissacarídeo

TLR - Receptores do tipo Toll-like

GFP - Proteína Fluorescente Verde

TH - Tirosina hidroxilase

EcN - *Escherichia coli* Nissle

CNS - Central Nervous System

SHR - Spontaneously Hypertensive Rats

WKY - Wistar Kyoto

MAP - Mean Arterial Pressure

HR - Heart Rate

PLB - Phospholamban

p-PLB - Phosphothreonine 17-Phospholamban

SERCA2a - Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase

TH - Tyrosine hydroxylase

PVN - paraventricular nucleus

RVLM - Rostral Ventrolateral Medulla

UVV - University Vila Velha

CEUA - Committee on Animal Care

NIH – National Institutes of Health

W/V – Weight/Volume

BW - Body Weight

LVSP - Left ventricle Systolic Pressure

LV - Left Ventricular

+dP/dtmax - Maximum Rate of Ventricular Pressure

-dP/dtmin - Minimum Rate of Ventricular Pressure

LVW - Left Ventricle Weight

BW - Body Weight

GAPDH - Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

HRP - Horseradish Peroxidase

PBS - Phosphate-Buffered Saline

PFA - Paraformaldehyde

SEM - Standard Error of the Mean

ANOVA - One-way Analysis of Variance

-dP/dt - Maximum LV relaxation rate

+dP/dt - Maximum Rate of Pressure Rise

Tau - Time Constant of Isovolumetric relaxation

SL - Sarcolemmal

SR - Sarcoplasmic Reticulum

IML - Intermediolateral

LPS - Lipopolysaccharide

BP - Blood pressure

ROS - Reactive Oxygen Species

NO - Nitric Oxide

LAL -*Limulus* Amebocyte Lysate

PAS - Periodic Acid-Schiff

PBST - (0.01M PBS, 0.04% NaN₃, 0.1% Triton)

IBA1 - Ionized Calcium Binding Adaptor molecule 1

VP - Vasopressin

TNF - Tumor Necrosis Factor

AngII - Angiotensin II

ACE - Angiotensin-Converting Enzyme

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. *Hipertensão: um problema de saúde pública*

As doenças cardiovasculares são consideradas a principal causa de morbidade e mortalidade de indivíduos em todo o mundo, representando aproximadamente 31% de todas as mortes no mundo, sendo que mais de 75% dessas mortes ocorrem em países subdesenvolvidos [1]. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é o principal fator de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e é considerada uma das principais causas de morte prematura em todo o mundo [2].

Em 2011, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que cerca de 600 milhões de pessoas tinham HAS e que 7,1 milhões de mortes anuais ocorriam em função da hipertensão. Além disso, estimaram um crescimento mundial de 60% dos casos de hipertensão para o ano de 2025 [3].

No Brasil, não se sabe ao certo como os fatores socioeconômicos, raciais e demográficos influenciam o controle da HAS. Um estudo com 15.103 funcionários do governo de seis capitais brasileiras relataram uma frequência de HAS maior entre os homens que entre as mulheres (40,1% vs. 32,2%) e essa frequência aumenta consideravelmente com a idade. Além disso, a HAS variou fortemente e de forma inversa com o nível de escolaridade, de 44% entre os participantes que não concluíram o ensino médio para 28,4% entre aqueles com pós-graduação. Os índices de HAS nesse estudo, também se mantiveram inversamente proporcionais em relação à renda familiar per capita, sendo que os declarados negros apresentaram maior frequência da doença (49,3%) [4].

Diante desses dados epidemiológicos envolvendo a hipertensão, a busca pelo controle da PA bem como a redução dos índices de morte por doenças cardiovasculares é visto como um desafio importante em saúde pública.

1.2. *Hipertensão: causas, consequências e tratamento*

A HAS é uma condição clínica multifatorial caracterizada por uma elevação sustentada dos níveis de pressão arterial (PA) (PA sistólica $\geq 140\text{mmHg}$; PA diastólica $\geq 90\text{mmHg}$) [5].

A HAS é classificada como primária/essencial ou secundária, de acordo com o reconhecimento de causas específicas para o desenvolvimento da mesma. A hipertensão secundária é identificada em menos de 10% dos casos, e inclui, entre outras causas, distúrbios renais ou endócrinos (como disfunção tireoidiana e suprarrenal), que levam ao desenvolvimento da hipertensão. No entanto, em mais de 90% dos casos, a etiologia da hipertensão não é encontrada, caracterizando a hipertensão primária ou essencial. Apesar de não ter causa conhecida, sabe-se que a hipertensão primária é consequência de uma interação complexa entre predisposição genética e vários fatores relacionados ao estilo de vida, incluindo consumo excessivo de sódio, ingestão insuficiente de potássio na dieta, ingestão de álcool, sedentarismo, sobrepeso e obesidade [6-11].

A hipertensão é uma doença assintomática e silenciosa e, em função disso, de difícil controle, uma vez que muitos sujeitos ou não sabem que possuem a doença, ou, mesmo sabendo, não entendem a necessidade de manter os níveis pressóricos adequadamente controlados. Dessa forma, a hipertensão representa importante fator de risco para eventos cardiovasculares maiores como acidente vascular cerebral, aneurisma arterial, infarto agudo do miocárdio e insuficiência renal e cardíaca [12].

Outro aspecto relevante no contexto da hipertensão é o aumento de sua prevalência com a idade e, levando-se em consideração o crescente aumento da expectativa de vida da população [13, 14], torna-se cada vez mais importante a prevenção da doença e abordagens não farmacológicas para o seu tratamento que envolvam a mudança de estilo de vida, incluindo modificação nos hábitos alimentares, sedentarismo, estresse e obesidade [6, 12].

Nos últimos anos tem-se discutido intensamente as intervenções não farmacológicas para o tratamento e prevenção da hipertensão. Nesse contexto, corrigir as anormalidades dietéticas, o consumo excessivo de álcool, bem como a inatividade física que contribuem para a elevação da PA é uma abordagem fundamentalmente importante para a prevenção e o controle da hipertensão, seja de forma isolada ou em combinação com a terapia farmacológica.

1.3. *Mecanismos envolvidos no controle da pressão arterial: breve revisão*

O controle da pressão arterial é complexo e é o resultado da ação integrada dos sistemas neural, cardiovascular, renal e endócrino. O nível médio da PA é determinado pelo produto do débito cardíaco e resistência vascular periférica total [15]. O débito cardíaco depende principalmente da taxa e volume de ejeção do coração, enquanto a resistência da vascular sistêmica é influenciada por múltiplos mecanismos vasoativos sob controle neural, humorai e parácrino [16, 17].

O controle fisiológico envolvendo o fluxo sanguíneo e a resistência vascular é desenvolvido por mecanismos de feedback e controle reflexo, que envolvem sistemas rápidos, intermediários e de ação tardia [18] que irão manter, ou pelo menos tentar manter, a PA arterial dentro dos valores de normalidade.

Controle neural da função cardiovascular

A regulação neural das funções cardiovasculares ocorre por meio dos mecanismos rápidos de controle da PA e também podem ser chamados de regulação neurohumoral uma vez que envolvem receptores, neurônios aferentes, o centro de integração, os neurônios eferentes e efetores e os hormônios de alça.

Os centros integradores e as atividades coordenadas entre redes neuronais são localizadas particularmente no hipotálamo e no bulbo. No bulbo situam-se áreas importantes no controle cardiovascular como o núcleo do trato solitário (NTS), áreas rostroventrolateral (RVLM) e caudoventrolateral (CVLM), o núcleo ambíguo e o núcleo motor dorsal do vago [19-21]. Essas áreas trabalham por meio de um arco reflexo de forma que flutuações instantâneas na PA são percebidas perifericamente por barorreceptores que sinalizam o NTS (primeira área do SNC a receber informações de alterações na PA) [22]. No NTS, neurônios glutamatérgicos excitam o núcleo motor dorsal vago, núcleo ambíguo (onde se localizam os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares do parassimpático que se projetam para o coração) e o CVLM que contém neurônios gabaérgicos que se projetam ao RVLM. Esses neurônios pré-ganglionares simpáticos se projetam para os neurônios pós-ganglionares na coluna intermédio lateral que se projetam por inervações simpáticas aos vasos e coração. Assim, esses núcleos neurais respondem em conjunto a um aumento ou queda na PA.

Nas elevações momentâneas da PA ocorrem a ativação do núcleo ambíguo e núcleo dorsal motor do vago (aumentando o tônus vagal ao coração) e ativação do CVLM, que por sua vez, inibe o RVLM e o tônus simpático aos vasos e ao coração, determinando respostas como bradicardia, redução do inotropismo, aumento da capacidade venosa e vasodilatação de forma a contribuir para restauração normal da PA. Em contrapartida, nas quedas momentâneas de pressão, o núcleo ambíguo, o núcleo motor dorsal vago e o CVLM não são ativados, resultando assim no aumento

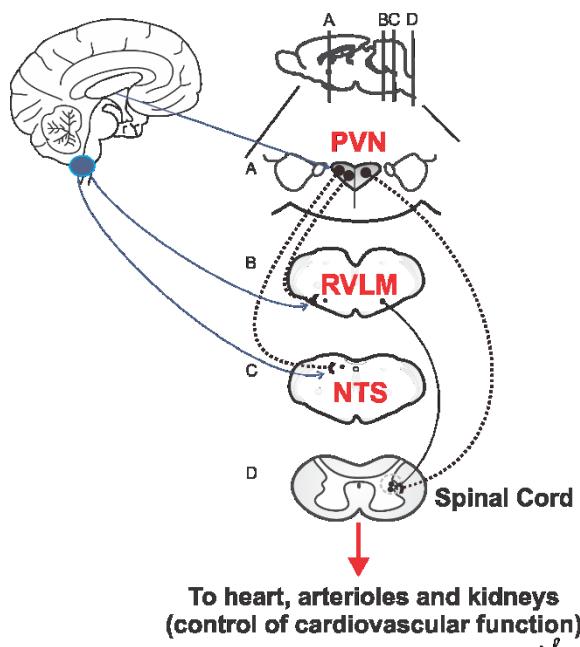


Figura 1: Representação esquemática de algumas regiões do cérebro envolvidas no funcionamento cardiovascular. Núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN), núcleo do trato solitário (NTS) e a medula ventrolateral rostral (RVLM) e suas integrações. Figura do repositório do Anatomy, Physiology and Pharmacology dept, Auburn University, USA e elaborada por Dra. Vinicia Biancardi.

magnocelulares presentes no PVN e núcleo supraótico, que sintetizam e liberam vasopressina e ocitocina no plasma via neurohipófise, em contrapartida, fibras catecolaminérgicas que também se projetam do PVN ao NTS formando o circuito de modulação autonômica NTS-PVN-NTS para ajustar a PA.

O PVN, por meio de projeções ao RVLM, ao NTS, e diretamente na coluna intermédio lateral (figura 1) tem uma função chave importante no funcionamento cardiovascular,

do tônus simpático e redução do tônus vagal, contribuindo dessa maneira, para taquicardia, aumento do inotropismo, redução da capacidade venosa e vasoconstricção e aumento da pressão a níveis basais.

Projeções do NTS e CVLM também levam informações periféricas a estruturas diencefálicas importantes de função cardiovascular como o núcleo pré-ótico mediano, núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e núcleo supraótico.

O NTS, primeira estação sináptica vindas de aferentes periféricos, envia projeções ascendentes ao PVN formando uma conexão NTS-PVN (figura 1). Informações aferentes que chegam ao NTS e CVLM seguem por neurônios catecolaminérgicos até neurônios

pois medeia efeitos simpatoexcitatório, neurosecretório e de modulação do barorreflexo [23-27].

Controle humorral da função cardiovascular

As respostas de ação intermediária que ocorrem em minutos e horas são mediadas pelo sistema humoral que envolvem, entre outros, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) o sistema peptídeo natriurético e o hormônio antidiurético. Os principais componentes do SRAA são a renina, o angiotensinogênio, a enzima conversora de angiotensina (ECA), a ECA2, as angiotensinas e os receptores que fazem a mediação das ações das angiotensinas. A Angiotensina II (AngII) é o principal peptídeo efetor do sistema renina angiotensina (SRA) e exerce suas ações via receptores AT1 e AT2. Numa queda na PA, o SRA sistêmico é estimulado a liberar renina, e aumentar a atividade dos nervos simpáticos renais. A renina liberada atua convertendo o angiotensinogênio (sintetizado no fígado e também produzido localmente) em angiotensina I (AngI) que por sua vez é convertida em AngII pela ECA. Dentre as ações da AngII pode-se destacar a potente vasoconstrição, a estimulação da liberação adrenal da aldosterona que leva à

da aldosterona, que leva à retenção de sódio e expansão de volume sanguíneo que juntos vão colaborar para o aumento da PA [28-31].

Além da AngII, existe ainda a Angiotensina 1-7 (Ang1-7) formada a partir da angI ou da angII, por ação da ECA2. Ao contrário da ECA, a ECA2 leva à

formação da Ang1-7, que atua em receptores específicos (receptor Mas) exercendo uma ação cardioprotetora e vasodilatadora contribuindo para a redução da PA (figura 2).

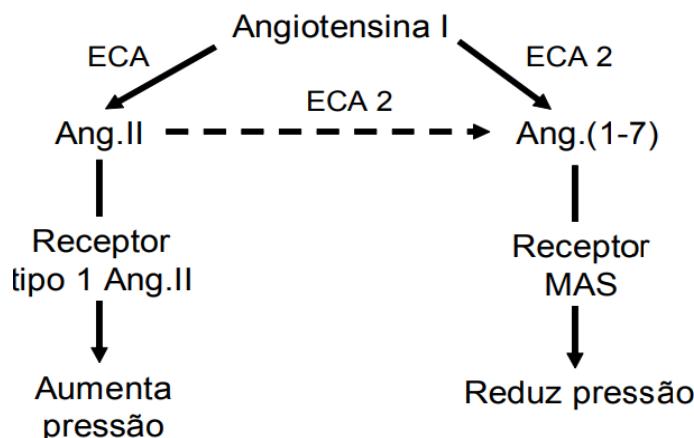


Figura 2: Mecanismo de controle da pressão arterial pelo Sistema Renina Angiotensina. (Fonte:Giesta, 2010).

O sistema peptídico natriurético, constituído pelos peptídeo natriurético atrial (ANP) e o peptídeo natriurético tipo B (BNP) e peptídeo natriurético tipo C (CNP), atuam de forma oposta ao SRAA no controle da pressão arterial renal, regulando indiretamente

a pressão sanguínea via controle do volume extracelular. Os peptídeos natriuréticos induzem a natriurese e diurese, possuem efeito vasorelaxante e também suprimem os níveis plasmáticos de renina, contribuindo assim para a redução da pressão arterial [32, 33]. A inibição da liberação de renina pode ocorrer diretamente nas células justaglomerulares produtoras de renina e pode envolver a regulação indireta do sistema renina através dos efeitos tubulares ou endócrinos dos peptídeos natriuréticos [34].

A atividade do hormônio antidiurético (ADH) ou vasopressina e a filtração capilar são dois outros mecanismos de ação intermediária para a regulação da PA. A secreção de ADH pode ser estimulada em casos de diminuição aguda da PA ou por um aumento da pressão osmótica. Em casos de aumento da osmolaridade ou diminuição do volume sanguíneo, o hipotálamo (núcleo supraótico e paraventricular) estimula a neurohipófise a secretar ADH deixando os rins mais permeáveis à absorção de água. Da mesma forma, a redução da osmolaridade pode levar ao aumento da inibição da atividade dos neurônios hipotalâmicos e redução da liberação da ADH [35, 36].

Por fim, os mecanismos de ação tardia, que trabalham por dias a semanas e são muito importantes devido à sua eficiência de longo prazo na regulação da PA, compreendem a pressão de natriurese, exercida pelo sal, e a diurese, exercida pela água, e atuam como mecanismos-chave no controle da pressão a longo prazo [37-39].

1.4. Mecanismos cardíacos envolvidos na hipertrofia cardíaca: a importância do cálcio na manutenção da função cardíaca

Vários autores têm reportado hiperatividade do SNS na hipertensão essencial [40-43]. As consequências da estimulação do SNS envolvem a vasoconstrição periférica, aumento da frequência cardíaca, liberação de norepinefrina das glândulas suprarrenais e resultando em um aumento na PA sistêmica. No entanto, o resultado da hiperatividade simpática tem sido relacionado a danos no coração, incluindo hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE), disfunção do VE [44-46], bem como prejuízos na contratilidade cardíaca [47] e rigidez vascular. Durante a hipertensão, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam depressão da função cardíaca sob aumento da resistência vascular sistêmica [15]. Nesse modelo de animais hipertensos

(SHR), a hipertrofia cardíaca surge como um mecanismo compensatório para restaurar a função cardíaca e tem sido acompanhada de alterações na contratilidade cardíaca [48-50]. A contratilidade ventricular esquerda, avaliada pela taxa máxima de aumento da pressão ventricular ($+dP/dtmáx$) em animais SHR, demonstrou-se elevada, indicando uma contratilidade aumentada do VE [15, 51] como um mecanismo compensatório da hipertensão.

A derivada de contratilidade ($+dP/dt \text{ max}$) e relaxamento ventricular ($-dP/dt \text{ min}$), bem como o tempo de relaxamento do VE (Tau) têm sido avaliados como parâmetros hemodinâmicos para avaliar o desempenho cardíaco. A quantificação da taxa de relaxamento do ventrículo esquerdo em condições normais e patológicas é importante para a avaliação da função da bomba cardíaca [52] e distúrbio do relaxamento miocárdico tem demonstrado ser um forte indicador do início da insuficiência cardíaca [53-55].

O Cálcio (Ca^{2+}) está diretamente envolvido na função cardíaca e é um fator indispensável no processo de contração e relaxamento cardíaco [56-58]. O principal mecanismo de recaptação de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (RS) é a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA), sendo a isoforma 2a (SERCA-2a) a principal isoforma cardíaca [59, 60]. Modelos experimentais utilizando manipulação genética da expressão SERCA-2a demonstram alterações na função contrátil cardíaca [61, 62]. Em concentrações baixas de Ca^{2+} citosólico, a SERCA-2a apresenta-se com atividade reduzida, devido à ligação com a fosfolamban (PLB), enquanto que em concentrações elevadas de Ca^{2+} ocorre a fosforilação da PLB, resultando em maior atividade da SERCA-2a, tendo como efeito a recaptação

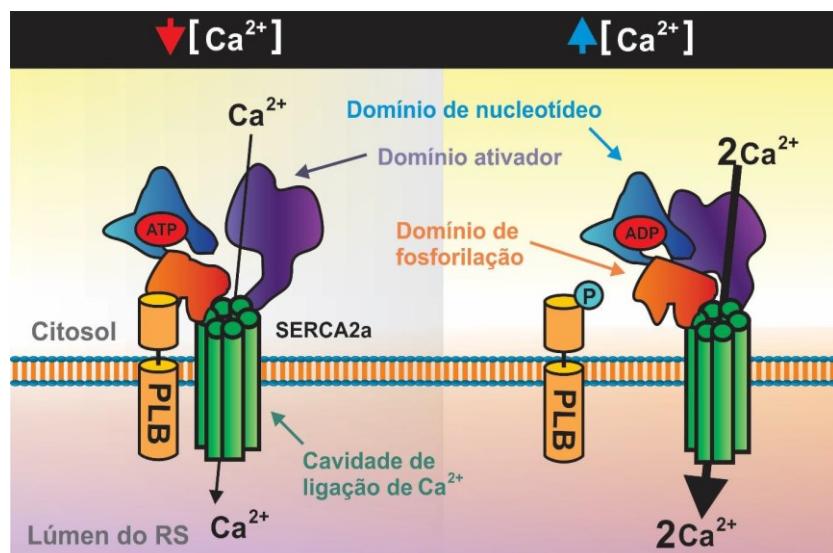


Figura 3: Estrutura da bomba do retículo sarcoplasmático ATPase 2 (SERCA-2a) em diferentes concentrações de cálcio (Ca^{2+}) citosólico. Fonte: Tese Nascimento, 2017.

aumentada de Ca^{2+} no RS [63]. Assim, a fosforilação ou não da proteína PLB contribui diretamente para contração do músculo cardíaco (figura 3). A hipertrofia observada na hipertensão está associada à deficiência dos processos de contração muscular [43], nesse contexto, o Ca^{2+} aparece como um mediador chave no processo de contração cardíaca atuando como um regulador de sinal elétrico que determina acoplamento excitatório da frequência cardíaca e contração. Redução nos níveis de Ca^{2+} e o comprometimento da atividade da bomba de Ca^{2+} geram alterações encontradas na insuficiência cardíaca humana [15, 64-66].

1.5. Interação intestino cérebro durante a hipertensão: a disbiose desenvolve um papel chave na permeabilidade intestinal e a comunicação cerebral

Recentemente, muito se tem discutido sobre as alterações da microbiota e na estrutura intestinais (disbiose) na hipertensão [67-70]. Stevens et al, 2018 [71] demonstrou que essa disbiose possui uma relação direta com prejuízos na barreira intestinal durante a hipertensão. Adicionalmente, alterações em biomarcadores plasmáticos da integridade da barreira epitelial intestinal, como o lipopolissacarídeo (LPS) e zonulina, têm sido observadas em pacientes hipertensos [67]. Assim, doenças intestinais com diminuição das "tight junctions", associada ao aumento da permeabilidade intestinal, tem sido correlacionadas a modificações na comunidade microbiana [72] e processos inflamatórios [73, 74].

O aumento da concentração plasmática de LPS, endotoxina resultante da degradação de bactérias gram-negativas [67], devido a um possível rompimento da barreira e maior permeabilidade intestinal, ativa receptores "Toll-like" (TLR) do tipo 2 (TLR2) e TLR4 e fator de transcrição nuclear kB (NF-kB). O NF-kB inicia processos pró-inflamatórios e induz a produção de citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α [75]. O LPS quando administrado por via sistêmica determina aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF α , bem como ativação de microglia no cérebro [76]. Assim, a desestruturação da barreira intestinal, em função da disbiose, permite a absorção de endotoxinas e parece ser um importante ponto de ligação entre o

intestino, processos inflamatórios e o sistema nervoso central, na hipertensão (Figura 4).

À medida que a hipertensão se estabelece, a patologia intestinal torna-se mais evidente, com aumento da permeabilidade, da rigidez, da fibrose e espessura muscular, podendo-se observar também uma diminuição das células goblets (produtoras de muco) e do comprimento das vilosidades no intestino delgado [77]. Além disso, anormalidades nas células de Paneth (células especializadas no epitélio do intestino delgado) em indivíduos humanos têm sido associadas à disbiose da mucosa intestinal [78]. Células de Paneth funcionam em parte pela secreção de lisozimas, do conteúdo granular, contendo peptídeos

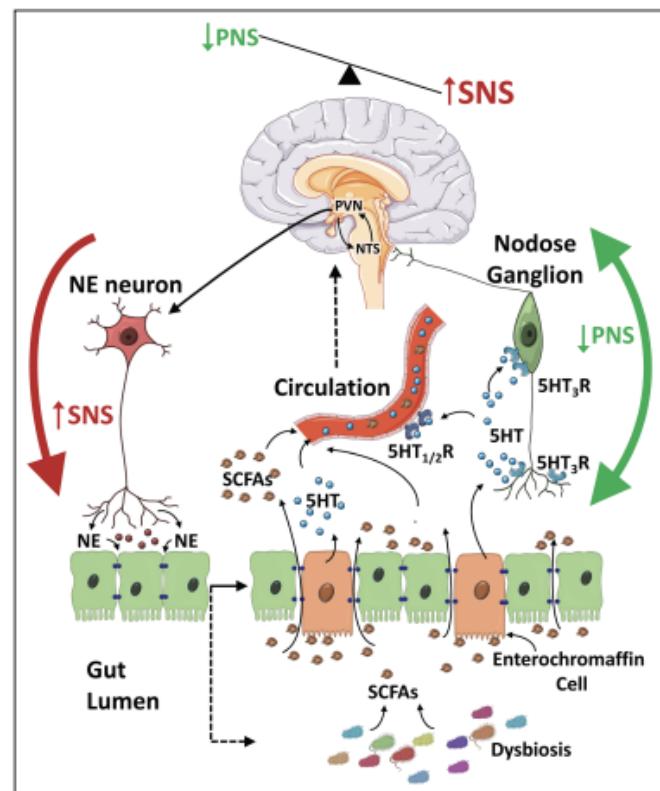


Figura 4: Mecanismos de interação intestino-cérebro. A figura demonstra que a combinação do aumento da atividade do SNS para o intestino juntamente com a redução vagal do sistema nervoso parassimpático (SNP) dirigido do intestino para as regiões cardiorreguladoras do cérebro, como o núcleo do trato solitário (NTS), contribui para hipertensão. NE indica norepinefrina (neurotransmissor simpático); SCFAs, ácido graxo de cadeia curta; e PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo. Fonte: Zubcevic et al, 2019

antimicrobianos e outras proteínas que alteram o ambiente intestinal [79]. Nesse contexto, Singh and Lin 2017 [80] relata que o LPS pode atuar inibindo ou estimulando a produção de lisozima em macrófagos e células de paneth dependendo da sua concentração e do tempo de exposição. Têm sido crescentes as discussões sobre uma possível interação entre o eixo intestino cérebro durante a hipertensão [68, 72, 81]. Essa comunicação intestino-cérebro foi recentemente demonstrada durante uma aplicação da proteína fluorescente verde (PRV-GFP) no cólon proximal e no intestino delgado e essa, por sua vez, mostrou uma marcação fluorescente significativa em neurônios do PVN do hipotálamo em animais hipertensos. Em seguida, um aumento da imunorreatividade da tirosina hidroxilase

(TH) – enzima chave na produção de norepinefrina – também foi observada no intestino delgado dos ratos SHR em comparação com os ratos WKY, confirmando, então, que existe uma conectividade aumentada PVN-intestino em animais hipertensos [72].

De fato, a importância da microbiota na saúde humana e sua alteração no desenvolvimento de doenças, têm sido reportadas na literatura. O National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos liberou um report indicando o estudo da microbiota intestinal como sendo uma área de extrema relevância para o entendimento da patogênese da hipertensão e, da mesma forma, como área mais promissora para o desenvolvimento de novas terapias para o controle dessa doença. O assunto é tão relevante que os membros do grupo de trabalho sugerem a revisão do icônico mosaico da teoria da Hipertensão idealizado pelo Dr. Irvin Page há mais de 60 anos, incluindo a microbiota como fator relevante para o desenvolvimento de hipertensão (Figura 5).

Dessa forma, uma nova abordagem terapêutica para a hipertensão envolvendo a microbiota intestinal abre espaço para a investigação de intervenções farmacológicas ou não que sejam capazes de interferir

positivamente sobre esse ambiente intestinal, com repercussões benéficas sobre a pressão arterial, dentre as quais se destacam os probióticos.

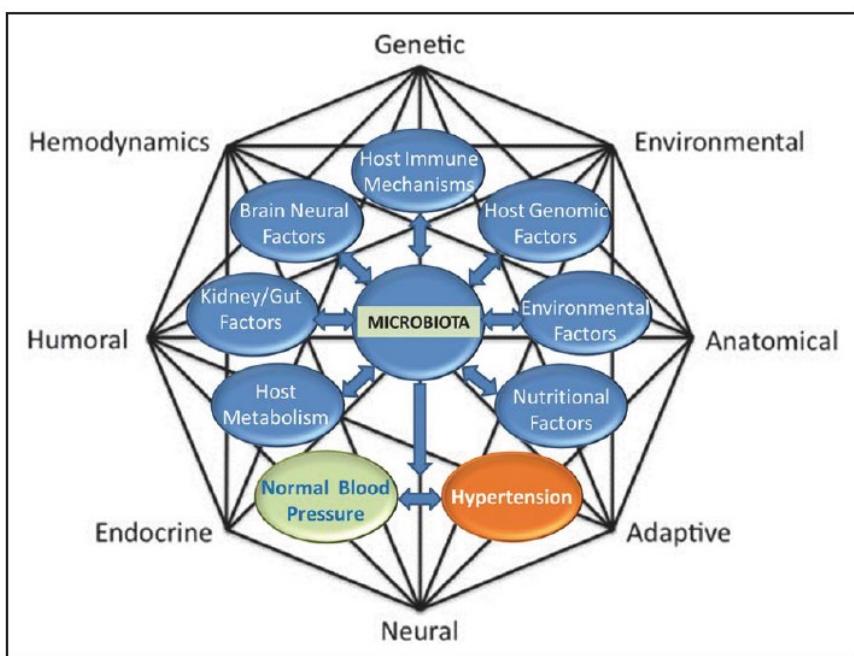


Figura 5. Mosaico da teoria da hipertensão revisado, demonstrando a influência da microbiota no controle da pressão artéria e hipertensão. (Fonte: Raizada et al., 2017).

1.6. Probiótico

Segundo a OMS, os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades suficientes, têm um impacto benéfico na saúde do indivíduo” [82].

Há um número cada vez maior de produtos probióticos disponibilizados aos consumidores, tais como o iogurte, leites fermentados e suplementos dietéticos [83]. A preparação desses alimentos probióticos normalmente envolve um ou mais microorganismos, em especial as bactérias ácido lácticas de quatro espécies gerais: *Lactobacilos* sp., *Bifidobacterium* sp., *Enterococcus* sp. e *Streptococcus* sp., [84] com grande variação na composição bacteriana nos diversos produtos.

Evidências de estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o uso de probióticos pode trazer benefícios à saúde humana e, por isso, vem apoiando a importância das modificações no padrão alimentar visando na prevenção e manejo de doenças cada vez mais comum, como a hipertensão, a obesidade e a síndrome metabólica [84-86].

Diversos estudos já demonstraram o papel positivo dos probióticos envolvendo doenças inflamatórias e que envolvem alterações intestinais [72, 87-89]. *Lactobacillus fermentum* foi capaz de modular diferencialmente a resposta imune de células epiteliais intestinais desencadeada pela ativação do receptor Toll-like 4 (TLR4) exercendo um efeito imunomodulador na mucosa intestinal. Além disso, camundongos alimentados com *Lactobacillus fermentum* tiveram aumento significativo na produção de interferon gama (IFN- γ) intestinal, estímulo dos macrófagos intestinais e peritoneais e aumento do número de células TCD4 $^{+}$ e citocina IL-6 intestinal [90]. Frabrega et al, 2017 [91], por sua vez, identificaram que o probiótico *Escherichia coli* Nissle pode participar da regulação positiva de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8 e IL-1) por meio da interação com macrófagos, células epiteliais e células dendríticas.

Bactérias do gênero *Bifidobacterium* também demonstraram inibir o crescimento de microorganismos prejudiciais à saúde, melhorar a função da barreira gastrintestinal, suprimir citocinas pró-inflamatórias, protegendo a barreira mucosa contra a adesão e invasão por comensais patogênicos e, também, restaurar o epitélio danificado pela modulação das proteínas “tight junction” e “zonula occludens” [92], que são proteínas que impedem a passagem de produtos de uma face epitelial intestinal à outra.

Entre os vários possíveis mecanismos de ação, acredita-se que os probióticos exercem seus efeitos pela produção de substâncias antimicrobianas, que atuam pela competição com patógenos por nutrientes e por sítios de adesão, pelo aumento da integridade da barreira mucosa e pela modulação do SI [93, 94]. Assim, as atividades benéficas dos probióticos são atribuíveis a diversos benefícios como apoiar uma microbiota intestinal, um sistema digestório e um sistema imunológico saudáveis [92].

Com base no exposto e considerando que o intestino e o sistema imune estão intimamente ligados a alterações cerebrais durante a hipertensão, alguns autores vêm sugerindo que a ingestão de probióticos pode desempenhar um papel importante na interação intestino-sistema imune-cérebro no controle da PA [67, 95, 96].

Dentre os diversos benefícios que os probióticos fermentados apresentam, o kefir se destaca por ser formado por diferentes microorganismos, que podem agir de forma sinérgica na determinação de seus benefícios à saúde [97].

1.7. *Kefir*

Nos últimos anos tem crescido o interesse pelo benefício da utilização do Kefir, bebida láctea fermentada semelhante ao iogurte, formado por uma complexa mistura de bactérias e leveduras encapsuladas em uma matriz de polissacarídeo [97, 98], como produto que pode auxiliar na regulação da PA [99-102].

Evidências iconográficas e escritas de 3000 e 2000 aC indicaram que gregos, romanos, hindus e egípcios já usavam produtos lácteos fermentados, embora acredita-se que suas origens provavelmente estejam antes desse período. Na verdade, os produtos lácteos já haviam sido mencionados na Bíblia Sagrada e também nos primeiros livros sagrados do hinduísmo [103]. Na Bíblia, uma das primeiras referências é encontrada em Gênesis (18: 1-8), onde se diz que Abraão ofereceu ao Senhor “vitela, pão e leite azedo”.

Segundo a lenda, o profeta Maomé deu como presente os primeiros grãos de kefir aos ancestrais dos alpinistas do Cáucaso [103]. Tradicionalmente antes de 2000 anos aC os grãos já estavam sendo passados de geração em geração entre as tribos do Cáucaso, sendo consideradas uma fonte de riqueza familiar [104].

Grãos de kefir têm uma forma semelhante à couve-flor. Os grãos são irregulares, elásticos, gelatinosos, de cor branca ou marfim, e tamanho variável, de 0 a 3,5 cm de diâmetro [105]. Em geral, o grão de kefir consiste em 45,7% mucopolissacarídeo, 34,3% de proteína total (27% insolúvel, 1 · 6% solúveis e 5 · 6% de aminoácidos livres) 12,1% de cinza, 4,4% de gordura, vitaminas B e K, triptofano, Mg, Ca, e P [97, 106].

O número de diferentes espécies microbianas no probiótico kefir é estimado em mais de 300. A composição microbiana do kefir também varia de acordo com a origem dos grãos de kefir com diferentes técnicas empregadas durante o processamento, as diferentes temperaturas ambiente de cultivo, o tipo e composição do leite utilizado no processamento e as condições de armazenamento do kefir e dos grãos [97].

O Kefir utilizado no presente trabalho teve sua composição bacteriana avaliada, assim como microestrutura. Dentre as várias bactérias benéficas encontradas no kefir incluíram-se: (*Acetobacter* sp., *Acetobacter aceti*, *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc* spp.), bem como *Lactobacillus kefiranofaciens* e leveduras (*Candida famata*, *Candida krusei*) [101]. Como pode ser observado na Figura 6, a superfície externa dos grãos de kefir mostra uma prevalência de bacilos e uma associação íntima com a matriz polissacáridica (chamada kefirano) (c e d). A superfície interna mostra bacilos em forma de bastonetes crescendo em associação com fungos (e-f).

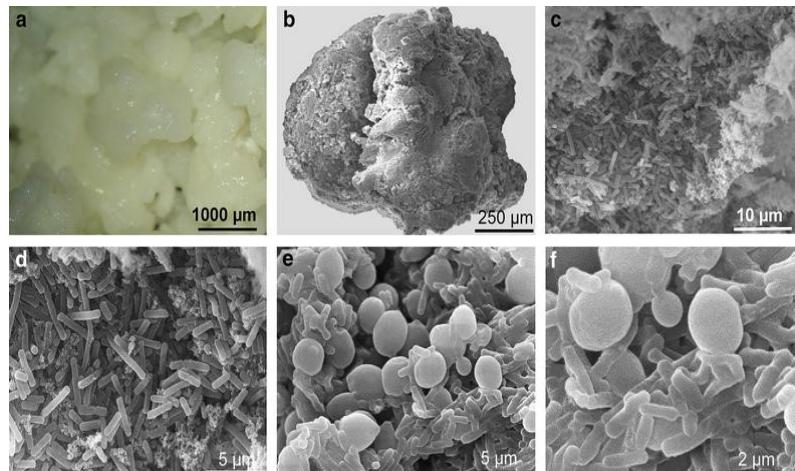


Figura 6: Fotomicrografia dos grãos de Kefir (a) e micrografia eletrônica da superfície externa (b-d) e interna (e-f) dos grãos de Kefir (Fonte: Friques et al., 2015)

A superfície interna mostra bacilos em forma de bastonetes crescendo em associação com fungos (e-f) [101].

Diversos efeitos benéficos do probiótico kefir na saúde animal e humana já tem sido descritos. Recentemente o kefir tem demonstrando prevenir a hiperlipidemia e obesidade em ratos obesos por mecanismos que envolvem a modulação do

metabolismo lipídico [107], reduzir obesidade e esteatose hepática em ratos pela modulação do microbioma intestinal [100] e reduzir a deposição lipídica vascular, modificando o perfil de citocinas circulantes [108]. O kefir também já demonstrou efeitos positivos contra doenças cardiovasculares crônicas relacionadas a doenças metabólicas. Estudos recentes mostram que os mecanismos de ação do kefir nas doenças cardiometabólicas incluem melhora do equilíbrio do sistema nervoso vagal/simpático [102], diminuição da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio [101], inibição da enzima conversora de angiotensina [109, 110], recrutamento de células progenitoras endoteliais [101], melhora do perfil de citocinas anti-inflamatórias [108, 111] e alteração da microbiota intestinal e resposta imune [112-114].

Carasi et al, 2015 [112] demonstrou que cepas isoladas de kefir estimularam a produção de diferentes proporções de citocinas pro/anti-inflamatórias *in vitro* e também gerou impacto positivo na microbiota, regulando a homeostase intestinal. Da mesma forma, tratamentos crônicos com probióticos já demonstraram induzir mudanças significativas na microbiota para reverter a disbiose intestinal e reduzir a PA elevada em ratos hipertensos [115]. Além disso, lactobacilos presentes em alimentos probióticos podem influenciar na translocação bacteriana intestinal, aumentando a imunidade inata e adaptativa em ratos [112, 116]. Por fim, em ratos modelos de sepsis, tratados profilaticamente com lactobacilos reduziram as bactérias intestinais patogênicas, o extravasamento através da barreira intestinal, as respostas inflamatórias e melhoraram a sobrevida desses animais [117].

Em relação à hipertensão arterial, trabalhos do nosso laboratório demonstraram que o tratamento crônico com kefir foi capaz de reduzir a pressão arterial, com melhoria da sensibilidade do barorreflexo e da função vascular [101, 102]. Além disso, o tratamento de animais SHR com a fração solúvel e não bacteriana do Kefir também foi capaz de determinar redução da pressão arterial, via inibição da enzima conversora de angiotensina [110], indicando a participação de compostos bioativos formados durante o processo de fermentação nos efeitos anti-hipertensivos do kefir. De fato, recentemente, Amorim et al. identificaram 35 peptídios com potencial anti-hipertensivo devido à capacidade inibidora da ECA presentes no Kefir [109]. Entretanto, o papel do tratamento de animais hipertensos com Kefir sobre a

integridade da mucosa intestinal, a neuroinflamação de núcleos centrais cardiovasculares e a contratilidade cardíaca, ainda não foram avaliados.

1.8. *Hipótese*

Diante do exposto, a hipótese do presente estudo é que o tratamento crônico com Kefir pode induzir a restauração da saúde da barreira intestinal, diminuindo o LPS circulante e consequentemente a neuroinflamação em centros de controle cardiovascular; reduzindo a atividade central de controle simpático e a hipertrofia e contratilidade cardíacas e, dessa forma, contribuir para o seu já demonstrado efeito sobre a pressão arterial.

1.9 *Referências bibliográficas*

- [1] WHO. Global heart. The global cardiovascular disease (CVD) crisis. 2016.
- [2] WHO. World Hypertension Day 2019. 2019.
- [3] WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2010. 2011. p. 176.
- [4] Chor D, Pinho Ribeiro AL, Sa Carvalho M, Duncan BB, Andrade Lotufo P, Araujo Nobre A, et al. Prevalence, Awareness, Treatment and Influence of Socioeconomic Variables on Control of High Blood Pressure: Results of the ELSA-Brasil Study. *PloS one*. 2015;10:e0127382.
- [5] Malachias M, Plavnik FL, Machado CA, Malta D, Scala LCN, Fuchs S. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 1 - Concept, Epidemiology and Primary Prevention. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2016;107:1-6.
- [6] Rossier BC, Bochud M, Devuyst O. The Hypertension Pandemic: An Evolutionary Perspective. *Physiology*. 2017;32:112-25.
- [7] Berger RCM, Benetti A, Girardi ACC, Forechi L, de Oliveira RM, Vassallo PF, et al. Influence of Long-Term Salt Diets on Cardiac Ca²⁺ Handling and Contractility Proteins in Hypertensive Rats. *American journal of hypertension*. 2018;31:726-34.
- [8] Cohen JB. Hypertension in Obesity and the Impact of Weight Loss. *Current cardiology reports*. 2017;19:98.

- [9] DeMarco VG, Aroor AR, Sowers JR. The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. *Nature reviews Endocrinology*. 2014;10:364-76.
- [10] Writing Group M, Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133:e38-360.
- [11] Liang M. Epigenetic Mechanisms and Hypertension. *Hypertension*. 2018;72:1244-54.
- [12] Carey RM, Calhoun DA, Bakris GL, Brook RD, Daugherty SL, Dennison-Himmelfarb CR, et al. Resistant Hypertension: Detection, Evaluation, and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*. 2018;72:e53-e90.
- [13] Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, Prospective Studies C. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002;360:1903-13.
- [14] Hornsten C, Weidung B, Littbrand H, Carlberg B, Nordstrom P, Lovheim H, et al. High blood pressure as a risk factor for incident stroke among very old people: a population-based cohort study. *Journal of hypertension*. 2016;34:2059-65.
- [15] Chen-Izu Y, Chen L, Banyasz T, McCulle SL, Norton B, Scharf SM, et al. Hypertension-induced remodeling of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes occurs prior to hypertrophy development. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;293:H3301-10.
- [16] Guyton AC, Coleman TG, Cowley AV, Jr., Scheel KW, Manning RD, Jr., Norman RA, Jr. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *The American journal of medicine*. 1972;52:584-94.
- [17] Guyton AC. Dominant role of the kidneys and accessory role of whole-body autoregulation in the pathogenesis of hypertension. *American journal of hypertension*. 1989;2:575-85.
- [18] Singh M, Mensah GA, Bakris G. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiology clinics*. 2010;28:545-59.

- [19] Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. Annual review of neuroscience. 1983;6:269-324.
- [20] Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. Nature reviews Neuroscience. 2006;7:335-46.
- [21] Biancardi VC, Stranahan AM, Krause EG, de Kloet AD, Stern JE. Cross talk between AT1 receptors and Toll-like receptor 4 in microglia contributes to angiotensin II-derived ROS production in the hypothalamic paraventricular nucleus. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2016;310:H404-15.
- [22] van Giersbergen PL, Palkovits M, De Jong W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarius in cardiovascular regulation. Physiological reviews. 1992;72:789-824.
- [23] Bains JS, Potyok A, Ferguson AV. Angiotensin II actions in paraventricular nucleus: functional evidence for neurotransmitter role in efferents originating in subfornical organ. Brain research. 1992;599:223-9.
- [24] Dampney RA, Li YW, Hirooka Y, Potts P, Polson JW. Use of c-fos functional mapping to identify the central baroreceptor reflex pathway: advantages and limitations. Clinical and experimental hypertension. 1995;17:197-208.
- [25] Bains JS, Ferguson AV. Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic inputs to type I neurones of the rat paraventricular nucleus. The Journal of physiology. 1997;499 (Pt 3):733-46.
- [26] Ferguson AV. Angiotensinergic regulation of autonomic and neuroendocrine outputs: critical roles for the subfornical organ and paraventricular nucleus. Neuroendocrinology. 2009;89:370-6.
- [27] Vivas L, Godino A, Dalmasso C, Caeiro XE, Macchione AF, Cambiasso MJ. Neurochemical Circuits Subserving Fluid Balance and Baroreflex: A Role for Serotonin, Oxytocin, and Gonadal Steroids. In: De Luca LA, Jr., Menani JV, Johnson AK, editors. Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration. Boca Raton (FL)2014.

- [28] Seva Pessoa B, van der Lubbe N, Verdonk K, Roks AJ, Hoorn EJ, Danser AH. Key developments in renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Nature reviews Nephrology*. 2013;9:26-36.
- [29] Hall JE, Coleman TG, Guyton AC. The renin-angiotensin system. Normal physiology and changes in older hypertensives. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1989;37:801-13.
- [30] Lundie MJ, Friberg P, Kline RL, Adams MA. Long-term inhibition of the renin-angiotensin system in genetic hypertension: analysis of the impact on blood pressure and cardiovascular structural changes. *Journal of hypertension*. 1997;15:339-48.
- [31] Rossi F, Mascolo A, Mollace V. The pathophysiological role of natriuretic peptide-RAAS cross talk in heart failure. *International journal of cardiology*. 2017;226:121-5.
- [32] Volpe M, Rubattu S, Burnett J, Jr. Natriuretic peptides in cardiovascular diseases: current use and perspectives. *European heart journal*. 2014;35:419-25.
- [33] Demerath T, Staffel J, Schreiber A, Valletta D, Schweda F. Natriuretic peptides buffer renin-dependent hypertension. *American journal of physiology Renal physiology*. 2014;306:F1489-98.
- [34] Schweda F, Kurtz A. Regulation of renin release by local and systemic factors. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2011;161:1-44.
- [35] Allen AM, Moeller I, Jenkins TA, Zhuo J, Aldred GP, Chai SY, et al. Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain research bulletin*. 1998;47:17-28.
- [36] Kimura T, Share L, Wang BC, Crofton JT. The role of central adrenoreceptors in the control of vasopressin release and blood pressure. *Endocrinology*. 1981;108:1829-36.
- [37] Cowley AW, Jr. Long-term control of arterial blood pressure. *Physiological reviews*. 1992;72:231-300.
- [38] Kurtz TW, DiCarlo SE, Morris RC, Jr. Logical Issues With the Pressure Natriuresis Theory of Chronic Hypertension. *American journal of hypertension*. 2016;29:1325-31.

- [39] Hall JE, Guyton AC, Coleman TG, Mizelle HL, Woods LL. Regulation of arterial pressure: role of pressure natriuresis and diuresis. Federation proceedings. 1986;45:2897-903.
- [40] Palatini P, Julius S. The role of cardiac autonomic function in hypertension and cardiovascular disease. Current hypertension reports. 2009;11:199-205.
- [41] Grassi G, Mark A, Esler M. The sympathetic nervous system alterations in human hypertension. Circulation research. 2015;116:976-90.
- [42] Lambert EA, Straznicky NE, Dixon JB, Lambert GW. Should the sympathetic nervous system be a target to improve cardiometabolic risk in obesity? American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2015;309:H244-58.
- [43] Saxena T, Ali AO, Saxena M. Pathophysiology of essential hypertension: an update. Expert review of cardiovascular therapy. 2018;16:879-87.
- [44] Schlaich MP, Kaye DM, Lambert E, Sommerville M, Socratous F, Esler MD. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. Circulation. 2003;108:560-5.
- [45] Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F, Dell'Oro R, Arenare F, Spaziani D, et al. Sympathetic and baroreflex cardiovascular control in hypertension-related left ventricular dysfunction. Hypertension. 2009;53:205-9.
- [46] Ozel E, Tastan A, Ozturk A, Ozcan EE. Relationship between Sympathetic Overactivity and Left Ventricular Hypertrophy in Resistant Hypertension. Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheorese. 2015;56:501-6.
- [47] Spranger MD, Kaur J, Sala-Mercado JA, Krishnan AC, Abu-Hamdan R, Alvarez A, et al. Exaggerated coronary vasoconstriction limits muscle metaboreflex-induced increases in ventricular performance in hypertension. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2017;312:H68-H79.
- [48] Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. Journal of molecular and cellular cardiology. 2016;97:245-62.
- [49] Tomek J, Bub G. Hypertension-induced remodelling: on the interactions of cardiac risk factors. The Journal of physiology. 2017;595:4027-36.

- [50] Devereux RB, Pickering TG, Alderman MH, Chien S, Borer JS, Laragh JH. Left ventricular hypertrophy in hypertension. Prevalence and relationship to pathophysiologic variables. *Hypertension*. 1987;9:II53-60.
- [51] Liu L, Lu Y, Bi X, Xu M, Yu X, Xue R, et al. Choline ameliorates cardiovascular damage by improving vagal activity and inhibiting the inflammatory response in spontaneously hypertensive rats. *Scientific reports*. 2017;7:42553.
- [52] De Mey S, Thomas JD, Greenberg NL, Vandervoort PM, Verdonck PR. Assessment of the time constant of relaxation: insights from simulations and hemodynamic measurements. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2001;280:H2936-43.
- [53] Moe GW, Grima EA, Howard RJ, Seth R, Armstrong PW. Left ventricular remodelling and disparate changes in contractility and relaxation during the development of and recovery from experimental heart failure. *Cardiovascular research*. 1994;28:66-71.
- [54] Eichhorn EJ, Hatfield B, Marcoux L, Risser RC. Functional importance of myocardial relaxation in patients with congestive heart failure. *Journal of cardiac failure*. 1994;1:45-56.
- [55] Leite-Moreira AF, Gillebert TC. Nonuniform course of left ventricular pressure fall and its regulation by load and contractile state. *Circulation*. 1994;90:2481-91.
- [56] Kranias EG, Hajjar RJ. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. *Circulation research*. 2012;110:1646-60.
- [57] Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415:198-205.
- [58] Anker SD, Borggrefe M, Neuser H, Ohlow MA, Roger S, Goette A, et al. Cardiac contractility modulation improves long-term survival and hospitalizations in heart failure with reduced ejection fraction. *European journal of heart failure*. 2019.
- [59] Wu KD, Lee WS, Wey J, Bungard D, Lytton J. Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. *The American journal of physiology*. 1995;269:C775-84.
- [60] Donald B. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*: Kluwer academic publisher; 2001.

- [61] Periasamy M, Reed TD, Liu LH, Ji Y, Loukianov E, Paul RJ, et al. Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:2556-62.
- [62] Muller OJ, Lange M, Rattunde H, Lorenzen HP, Muller M, Frey N, et al. Transgenic rat hearts overexpressing SERCA2a show improved contractility under baseline conditions and pressure overload. *Cardiovascular research*. 2003;59:380-9.
- [63] Zhang Y, Jiao L, Sun L, Li Y, Gao Y, Xu C, et al. LncRNA ZFAS1 as a SERCA2a Inhibitor to Cause Intracellular Ca(2+) Overload and Contractile Dysfunction in a Mouse Model of Myocardial Infarction. *Circulation research*. 2018;122:1354-68.
- [64] Fowler MR, Naz JR, Graham MD, Bru-Mercier G, Harrison SM, Orchard CH. Decreased Ca²⁺ extrusion via Na⁺/Ca²⁺ exchange in epicardial left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2005;288:H2431-8.
- [65] Ashrafian H, Redwood C, Blair E, Watkins H. Hypertrophic cardiomyopathy:a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends in genetics : TIG*. 2003;19:263-8.
- [66] Ashrafian H, McKenna WJ, Watkins H. Disease pathways and novel therapeutic targets in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation research*. 2011;109:86-96.
- [67] Kim S, Goel R, Kumar A, Qi Y, Lobaton G, Hosaka K, et al. Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in patients with high blood pressure. *Clinical science*. 2018;132:701-18.
- [68] Santisteban MM, Kim S, Pepine CJ, Raizada MK. Brain-Gut-Bone Marrow Axis: Implications for Hypertension and Related Therapeutics. *Circulation research*. 2016;118:1327-36.
- [69] Yang T, Aquino V, Lobaton GO, Li H, Colon-Perez L, Goel R, et al. Sustained Captopril-Induced Reduction in Blood Pressure Is Associated With Alterations in Gut-Brain Axis in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Journal of the American Heart Association*. 2019;8:e010721.

- [70] Sharma RK, Yang T, Oliveira AC, Lobaton GO, Aquino V, Kim S, et al. Microglial Cells Impact Gut Microbiota and Gut Pathology in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Circulation research*. 2019;124:727-36.
- [71] Stevens BR, Goel R, Seungbum K, Richards EM, Holbert RC, Pepine CJ, et al. Increased human intestinal barrier permeability plasma biomarkers zonulin and FABP2 correlated with plasma LPS and altered gut microbiome in anxiety or depression. *Gut*. 2018;67:1555-7.
- [72] Santisteban MM, Qi Y, Zubcevic J, Kim S, Yang T, Shenoy V, et al. Hypertension-Linked Pathophysiological Alterations in the Gut. *Circulation research*. 2017;120:312-23.
- [73] Onal EM, Afsar B, Covic A, Vaziri ND, Kanbay M. Gut microbiota and inflammation in chronic kidney disease and their roles in the development of cardiovascular disease. *Hypertension Research*. 2019;42:123-40.
- [74] Yang T, Richards EM, Pepine CJ, Raizada MK. The gut microbiota and the brain–gut–kidney axis in hypertension and chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2018;14:442-56.
- [75] Aye San MF, Katrina Campbell, Carmel M. Hawley and David W. Johnson The Role of Oxidative Stress and Systemic Inflammation in Kidney Disease and Its Associated Cardiovascular Risk. In: Atukeren P, editor. *Novel Prospects in Oxidative and Nitrosative Stress* 2018.
- [76] Cazareth J, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, Petit-Paitel A. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *Journal of neuroinflammation*. 2014;11:132.
- [77] Richards EM, Pepine CJ, Raizada MK, Kim S. The Gut, Its Microbiome, and Hypertension. *Current hypertension reports*. 2017;19:36.
- [78] Liu TC, Gurram B, Baldridge MT, Head R, Lam V, Luo C, et al. Paneth cell defects in Crohn's disease patients promote dysbiosis. *JCI insight*. 2016;1:e86907.

- [79] Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 2008;456:259-63.
- [80] Singh SB, Lin HC. Autophagy counters LPS-mediated suppression of lysozyme. *Innate immunity*. 2017;23:537-45.
- [81] Yang T, Richards EM, Pepine CJ, Raizada MK. The gut microbiota and the brain-gut-kidney axis in hypertension and chronic kidney disease. *Nature reviews Nephrology*. 2018;14:442-56.
- [82] World Health Organization (WHO) FaAOF. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria2001.
- [83] Thushara RM, Gangadaran S, Solati Z, Moghadasian MH. Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. *Food & function*. 2016;7:632-42.
- [84] Kang Y, Cai Y. Gut microbiota and hypertension: From pathogenesis to new therapeutic strategies. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2018;42:110-7.
- [85] Vasquez EC, Pereira TMC, Peotta VA, Baldo MP, Campos-Toimil M. Probiotics as Beneficial Dietary Supplements to Prevent and Treat Cardiovascular Diseases: Uncovering Their Impact on Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019:3086270.
- [86] Upadrasta A, Madempudi RS. Probiotics and blood pressure: current insights. *Integrated blood pressure control*. 2016;9:33-42.
- [87] Boulange CL, Neves AL, Chiloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome medicine*. 2016;8:42.
- [88] Fandriks L. Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview. *Journal of internal medicine*. 2017;281:319-36.

- [89] Santanna AF, Filete PF, Lima EM, Porto ML, Meyrelles SS, Vasquez EC, et al. Chronic administration of the soluble, nonbacterial fraction of kefir attenuates lipid deposition in LDLr^{-/-} mice. *Nutrition*. 2017;35:100-5.
- [90] Garcia-Castillo V, Zelaya H, Ilabaca A, Espinoza-Monje M, Komatsu R, Albarracin L, et al. *Lactobacillus fermentum UCO-979C* beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Beneficial microbes*. 2018;9:829-41.
- [91] Fabrega MJ, Rodriguez-Nogales A, Garrido-Mesa J, Algieri F, Badia J, Gimenez R, et al. Intestinal Anti-inflammatory Effects of Outer Membrane Vesicles from *Escherichia coli* Nissle 1917 in DSS-Experimental Colitis in Mice. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1274.
- [92] Sanchez B, Delgado S, Blanco-Miguez A, Lourenco A, Gueimonde M, Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular nutrition & food research*. 2017;61.
- [93] Yousefi B, Eslami M, Ghasemian A, Kokhaei P, Salek Farrokhi A, Darabi N. Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *Journal of cellular physiology*. 2019;234:8008-18.
- [94] Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Annals of nutrition & metabolism*. 2012;61:160-74.
- [95] Yang G, Yao J, Yang W, Jiang Y, Du J, Huang H, et al. Construction and immunological evaluation of recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing SO7 of *Eimeria tenella* fusion DC-targeting peptide. *Veterinary parasitology*. 2017;236:7-13.
- [96] Zubcevic J, Santisteban MM, Perez PD, Arocha R, Hiller H, Malphurs WL, et al. A Single Angiotensin II Hypertensive Stimulus Is Associated with Prolonged Neuronal and Immune System Activation in Wistar-Kyoto Rats. *Frontiers in physiology*. 2017;8:592.
- [97] Rosa DD, Dias MMS, Grzeskowiak LM, Reis SA, Conceicao LL, Peluzio M. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition research reviews*. 2017;30:82-96.

- [98] Prado MR, Blandon LM, Vandenberghe LP, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, et al. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:1177.
- [99] Liu JR, Wang SY, Chen MJ, Chen HL, Yueh PY, Lin CW. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *The British journal of nutrition*. 2006;95:939-46.
- [100] Kim DH, Kim H, Jeong D, Kang IB, Chon JW, Kim HS, et al. Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2017;44:35-43.
- [101] Friques AG, Arpini CM, Kalil IC, Gava AL, Leal MA, Porto ML, et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Transl Med*. 2015;13:390.
- [102] Klippe BF, Duemke LB, Leal MA, Friques AG, Dantas EM, Dalvi RF, et al. Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Frontiers in physiology*. 2016;7:211.
- [103] Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. Probiotics History. *Journal of clinical gastroenterology*. 2016;50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015:S116-S9.
- [104] Farnworth ER. Kefir - A complex probiotic. *Food Science & Technology Bulletin Functional Foods*. 2005;2:1-17.
- [105] Garrote Graciela L.; Abraham AGDA, Graciela L. Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In: Vignolo FMRRGGM, editor. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* 2010.
- [106] Marshall MVC, M.Wendy Methods for making kefir and fermented milks based on kefir. 1985;52:451-6.
- [107] Tung YT, Chen HL, Wu HS, Ho MH, Chong KY, Chen CM. Kefir Peptides Prevent Hyperlipidemia and Obesity in High-Fat-Diet-Induced Obese Rats via Lipid Metabolism Modulation. *Molecular nutrition & food research*. 2018;62.

- [108] Santanna AF, Filete PF, Lima EM, Porto ML, Meyrelles SS, Vasquez EC, et al. Chronic administration of the soluble, nonbacterial fraction of kefir attenuates lipid deposition in LDLr(-/-) mice. *Nutrition*. 2017;35:100-5.
- [109] Amorim FG, Coitinho LB, Dias AT, Friques AGF, Monteiro BL, Rezende LCD, et al. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. *Food chemistry*. 2019;282:109-19.
- [110] Brasil GA, Silva-Cutini MA, Moraes FSA, Pereira TMC, Vasquez EC, Lenz D, et al. The benefits of soluble non-bacterial fraction of kefir on blood pressure and cardiac hypertrophy in hypertensive rats are mediated by an increase in baroreflex sensitivity and decrease in angiotensin-converting enzyme activity. *Nutrition*. 2018;51-52:66-72.
- [111] Rosa DD, Grzeskowiak LM, Ferreira CL, Fonseca AC, Reis SA, Dias MM, et al. Kefir reduces insulin resistance and inflammatory cytokine expression in an animal model of metabolic syndrome. *Food & function*. 2016;7:3390-401.
- [112] Carasi P, Racedo SM, Jacquot C, Romanin DE, Serradell MA, Urdaci MC. Impact of kefir derived *Lactobacillus* kefiri on the mucosal immune response and gut microbiota. *Journal of immunology research*. 2015;2015:361604.
- [113] Bourrie BC, Willing BP, Cotter PD. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:647.
- [114] Yilmaz I, Dolar ME, Ozpinar H. Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*. 2019;30:242-53.
- [115] Gomez-Guzman M, Toral M, Romero M, Jimenez R, Galindo P, Sanchez M, et al. Antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in spontaneously hypertensive rats. *Molecular nutrition & food research*. 2015;59:2326-36.
- [116] Aktas B, De Wolfe TJ, Safdar N, Darien BJ, Steele JL. The Impact of *Lactobacillus casei* on the Composition of the Cecal Microbiota and Innate Immune System Is Strain Specific. *PloS one*. 2016;11:e0156374.

[117] Panpatch W, Chancharoenthana W, Bootdee K, Nilgate S, Finkelman M, Tumwasorn S, et al. *Lactobacillus rhamnosus* L34 Attenuates Gut Translocation-Induced Bacterial Sepsis in Murine Models of Leaky Gut. *Infection and immunity*. 2018;86.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito periférico do tratamento com kefir na contratilidade do ventrículo esquerdo e na morfofisiologia da barreira intestinal, bem com o seu efeito na atividade simpática central e neuroinflamação em animais SHR.

2.2 Objetivos específicos

Confirmar que o tratamento com kefir pode reduzir a PAM a FC e hipertrofia cardíaca em animais SHR;

Avaliar se o kefir pode melhorar a “função cardíaca” em animais hipertensos;

Avaliar se o kefir é capaz de modificar a expressão de proteínas cardíacas envolvidas na dinâmica do cálcio;

Avaliar se o kefir pode melhorar ou reverter alterações morfopatofisiológicas da barreira epitelial intestinal;

Avaliar se o tratamento com kefir reduz níveis sorológicos de endotoxinas (LPS);

Avaliar se o kefir pode reduzir atividade simpática em regiões do cérebro envolvidas no controle cardiovascular (PVN e RVLM);

Avaliar se o kefir reduz neuroinflamação em regiões do cérebro envolvidas no controle simpático cardiovascular (PVN e RVLM);

Capítulo 1

Artigo 1: Long-term treatment with kefir probiotics ameliorates cardiac function in spontaneously hypertensive rats.

Long-term treatment with kefir probiotics ameliorates cardiac function in spontaneously hypertensive rats

Mirian A Silva-Cutini^a, Simone A Almeida^b, Andrews M Nascimento^a, Gláucia R Abreu^b, Nazaré S Bissoli^b, Dominik Lenz^a, Denise C Endringer^a, Girlandia A Brasil^a, Ewelyne M Lima^a, Vinicia C Biancardi^{c*}, and Tadeu U Andrade^{a*}

a Department of Pharmacy, University Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil.

b Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil.

c Anatomy, Physiology, and Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Auburn University, AL, United States of America.

*Corresponding authors:

Tadeu Uggere de Andrade, PhD

Phone: (+55) 27 3421-2091 Fax: (+55) 27 3421 2087

Av. Comissário José Dantas de Melo 21

Boa Vista, Vila Velha, ES, Brazil. 29102-920

tadeu.uggere@uvv.br

Vinicio Campana Biancardi, PhD

Phone: (+1) 334 844 5304 Fax: (+1) 334 844 5388 217 Greene

Hall.

College of Veterinary Medicine, Auburn University, AL, USA. 36849

vbiancardi@auburn.edu

ABSTRACT

This work evaluated the effects of long-term kefir treatment in cardiac function (cardiac contractility and calcium-handling proteins) and the central nervous system (CNS) control of the sympathetic signaling in spontaneously hypertensive rats (SHR). Male normotensive rats (WKYs) and SHRs were divided into three groups: WKYs and SHRs treated with vehicle, and SHRs treated with milk fermented by the grains of kefir (5%; SHR-Kefir; oral gavage, 0.3mL/100g daily/9 weeks). At the end of treatment, mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were measured by direct arterial catheterization. Hemodynamic parameters (left ventricular systolic pressure, left ventricular isovolumetric relaxation time constant, maximal and minimal pressure decay) were acquired through a left ventricular catheter implantation. Left ventricle protein expressions of phospholamban (PLB), its phosphorylated form (p-PLB) and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) were determined by Western blot. Tyrosine hydroxylase (TH) protein expression was evaluated via immunofluorescence within the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus and the rostral ventrolateral medulla (RVLM). SHR-Kefir group presented lower MAP and HR compared to SHRs. Kefir treatment ameliorated cardiac hypertrophy and promoted reduced expression of PLB, p-PLB, and SERCA2a contractile proteins. Within the PVN and RVML, TH protein overexpression observed in SHRs was reduced by probiotic treatment. In addition, kefir improved cardiac hemodynamic parameters in SHR-treated animals. Altogether, the data show that long-term kefir treatment reduced blood pressure by mechanisms involving reduction of cardiac hypertrophy, improvement of cardiac contractility and calcium-handling proteins, and reduction in the CNS regulation of the sympathetic activity.

Keywords: Probiotics, Hypertension, Cardiac hypertrophy, Sympathetic activity, Cardiac contractility.

Highlights

- Kefir treatment improves cardiac contractility in hypertensive animals;
- This effect is accompanied by normalization of cardiac-handling proteins expression;
- Sympathetic activity evaluated by TH expression within PVN and RVLM is improved;
- These results should account for the benefic effects of Kefir in hypertension.

1. Introduction

Hypertension is associated with increased cardiovascular morbidity and mortality worldwide [1]. Long-term hypertension ultimately leads to left ventricular hypertrophy and subsequent heart failure [2, 3]. Heart failure is characterized by the hyperactivity of neurohumoral pathways, particularly an increase in the sympathetic drive, which is initially a compensatory mechanism to maintain cardiac performance and stimulate contractility [4]. However, over the long term, sympathoexcitation is closely associated with end-organ damage. In this context, the reduction of sympathetic activity, as well as the regression of cardiovascular hypertrophy and improvement of cardiac contractility, is currently regarded as important therapeutic targets in reducing complications of hypertension [2, 5-7].

Guidelines for the management of high blood pressure propose lifestyle modifications, including changes in dietary approaches, to lower blood pressure, to control other risk factors and to reduce the number of doses of antihypertensive drugs [8]. Hence, the interest of functional foods and their mechanisms of action to prevent and alleviate diseases related to

cardiometabolic disorders have increased in the last few years [9-11]. The potential of probiotic foods in alleviating chronic diseases, including hypertension, has been discussed [9, 11, 12]. However, the specific underlying mechanisms by which this dietary approach contributes to health promotion are not fully understood.

Several complex mechanisms are involved in hypertension. Recently, our group has shown that kefir, a probiotic beverage, has substantial cardiovascular effects, such as being able to prevent atherosclerosis in hypercholesteremic mice [13] and reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHRs) [14-16]. Potential mechanisms involved in the benefits of kefir during hypertension include improvement of endothelial dysfunction and enhancement of baroreflex sensitivity as well as cardiac autonomic control of heart rate (HR) [14, 15]. In addition, our group has shown that hypertensive animals treated with the nonbacterial fraction of kefir have an improvement in baroreflex sensitivity and a decrease in angiotensin-converting enzyme activity [16].

In addition to the mechanisms mentioned above, elevated sympathetic activity is implicated in the development of target organ damage, such as cardiac hypertrophy and heart failure [7, 17]. The effects of probiotic kefir on cardiac contractility and central nervous system regulation of sympathetic activity are not known.

Within the central nervous system, the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus and the rostral ventrolateral medulla (RVLM) are critical areas of a neural network that regulates and controls sympathetic outflow and cardiovascular function [18].

Therefore, in this work, it has been investigated whether kefir promotes cardiovascular health by reducing the activity of the cardioregulatory central nervous system nucleus (PVN and RVLM) of the sympathetic nervous system and ameliorating cardiac hypertrophy, cardiac contractility, and the participation of calcium-handling proteins in SHR animals.

2. Methods

2.1. *Experimental groups*

Eight-week-old male normotensive Wistar Kyoto rats (WKYs) and Spontaneously Hypertensive Rats (SHRs) were obtained from the breeding unit at University Vila Velha (UVV), Brazil. The rats were housed in rooms controlled for temperature ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), humidity ($50 \pm 5\%$) and lighting (12 h day/12 h night), and standard rat chow (Purina Labina, SP-Brazil) and water were freely available at all times. All animal protocols were approved by the Institutional Committee on Animal Care (CEUA-UVV, Protocol #2016-405), and all experimental procedures were performed in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals as recommended by the National Institutes of Health (NIH) [19].

The animals were separated into three groups ($n = 10$ animals each): WKY control group treated with vehicle (whole milk); SHR group treated with vehicle; SHR-Kefir group treated with milk fermented by kefir grains. The animals were treated daily by oral gavage for a period of nine weeks at a dose of 0.3 mL / 100 g body weight as previously described [15]. The dose and period of treatment is based in previous work

showing that 8 weeks of kefir treatment promotes decrease in blood pressure in SHRs [14]. The experimental group used for tyrosine hydroxylase (TH) studies was performed at Auburn University, AL, USA, and all animal guidelines were likewise followed.

2.2. Kefir preparation.

The kefir grains (kindly donated by Dr. Célia Lucia de Luces Fortes Ferreira from the Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil) were added to pasteurized whole milk in a ratio of 5% (w/v) and kept at room temperature (23°C). After 24 h, this mixture was strained through a plastic sieve, and the filtered product was refrigerated (4°C) to permit yeast growth for 24 h [15]. After completion of this process, the kefir was fully prepared for administration. Kefir beverages were prepared daily.

As previously described, the dominant microflora of the kefir used in this work includes various beneficial bacteria (*Acetobacter* sp., *Acetobacter aceti*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc* spp.), as well as *Lactobacillus kefiranofaciens*, and yeasts (*Candida famata*, *Candida krusei*) [15].

2.3. Blood pressure and heart rate measurements.

To randomly divide the animals into the experimental groups, the basal blood pressure levels in all groups were indirectly acquired before starting the treatment utilizing a tail-cuff manometer (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA). The animals were placed inside a warming chamber (approximately 34°C) for 30 min before MAP measurement acquisitions. A minimum of three measurements per animal was acquired to ensure consistent basal MAP levels.

After the treatment, MAP and HR were determined by direct arterial pressure measurement in each group. For these measurements, a catheter filled with saline (PE-50) was inserted into the right carotid artery under anesthesia (ketamine 100 mg/Kg i.p., Syntec do BrasilLtda.; xylazine 10 mg/Kg, i.p., König laboratories, S.A.). The MAP and HR were recorded using a pressure transducer coupled to an MP-100 System Guide (model MP100-CE; Biopac Systems, Santa Barbara, CA, USA).

2.4. Hemodynamic parameters

The left ventricle systolic pressure (LVSP) and left ventricular (LV) function of the rats were assessed as previously described [20, 21]. After MAP and HR measurements, the catheter was advanced to the left ventricle. After an additional 15 min of basal level measurements, functional parameters were measured as LV +dP/dtmax, which is the maximum rate of ventricular pressure increase, or the positive peak value of the first derivative of the left ventricular pressure, as well as the rate of pressure decay ($-dP/dt_{min}$) and the time constant of isovolumetric relaxation of LV (Tau). The signal was expressed in mmHg/s. Following this procedure, the catheter was withdrawn from the LV, and the MAP was measured again to determine whether damage to the aortic valve had occurred. Animals with a decrease in diastolic blood pressure higher than 10 mmHg would suggest damage to the aortic valve. No animals suffered damage to the aortic valve in our studies. The data were analyzed using LabChart software, version 7 (AD Instruments, Castle Hill, Australia).

2.5. Cardiac hypertrophy

Hearts were removed after hemodynamic measurements, cleaned with saline and weighed. The left ventricle, including the interventricular septum, was separated. The weight of the left ventricle was obtained. The ratio of the left ventricle weight (LVW) to the body weight (BW) was used as an index of cardiac hypertrophy [22].

2.6. Western blot analysis

Western blots were performed to determine phospholamban (PLB), phosphothreonine 17-phospholamban (p-PLB) and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) proteins, as previously described [20]. Briefly, total proteins contained in the left ventricle tissue were isolated and measured by the Bradford method. The proteins were separated by electrophoresis using SDSPAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, MA, USA). After incubation with blocking solution, the membranes were incubated with specific primary antibodies as follows: anti-PLB (1:1000, Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-p-PLB (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), and anti-SERCA2a (1:2500, Abcam, Cambridge, MA, USA).

The anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (1:3000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) primary antibody was used as an endogenous control. Binding of the primary antibody was detected with the use of horseradish peroxidaseconjugated (HRP) secondary antibodies [1:15,000]: anti-goat IgG (Millipore, Bedford, USA), anti-rabbit IgG (Millipore, Bedford, USA) and anti-mouse IgG (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Immunoreactive bands were detected with a chemiluminescence reaction (Luminata HRP Substrate-Millipore) followed by densitometric analysis using ImageJ software, version 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). GAPDH expression levels were used to normalize protein expression.

2.7. Brain immunofluorescence analysis

Another group of rats was transcardially perfused with 0.01 mol/L PBS (150 mL) and 4% PFA (350 mL). Brains were postfixated for 3 h in 4% PFA followed by cryoprotection in PBS containing 30% sucrose for three days at 4°C. Sections of 30 µm containing the PVN, and 40 µm containing the RVLM were collected. The slices were subjected to immunohistochemistry as previously described [23]. Briefly, slices containing the PVN and the RVLM were preincubated in 10% donkey blocking serum for 1 h, followed by overnight incubation of slices in tyrosine hydroxylase primary antibody (TH monoclonal anti-mouse antibody, 1:250, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Within the PVN, a vasopressin marker (VP polyclonal anti-guinea pig antibody, 1:10.000, Peninsula Laboratories International, CA, USA) was added to the cocktail and used as an anatomical marker. Immunofluorescence was achieved by the use of a secondary reaction with anti-mouse Alexa Fluor 488 and anti-guinea pig Alexa Fluor 647, respectively (all secondary antibodies used were diluted 1:250, Jackson ImmunoResearch, PA, USA). TH density in the PVN and RVLM was evaluated as an indicator of sympathetic activity. The absorption control of primary antibodies was used to indicate specific antibody binding sites.

2.8. Confocal imaging

Immunofluorescence was examined with a Nikon Eclipse TE2000-E inverted microscope coupled to a Nikon A1 confocal laser microscope as previously described

[23, 24]. Briefly, images from consecutive optical focal planes were taken (PVN 30 μm sections: 20-30 images, 1 μm intervals; RVLM 40 μm sections: 30-40 images, 1 μm intervals), and a projection image of the sections was then generated. Each channel was acquired sequentially to minimize crossover artifacts among the channels. TH density was measured using ImageJ software.

2.9. Statistical analysis

The values are expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM). The D'Agostino-Pearson omnibus and the Kolmogorov-Smirnov normality tests were used to verify whether variables had a normal (Gaussian) distribution. Statistical comparisons between the parametric means of different groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. A value of $P<0.05$ was considered significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism® software version 6.7.

3. Results

3.1. Long-term treatment of kefir decreased blood pressure and normalized heart rate in SHR animals

Direct arterial pressure measurement was used to evaluate whether kefir treatment altered MAP and HR in hypertensive animals (**Fig. 1**). After 9 weeks of treatment, a higher MAP and HR values in SHRs were found when compared to WKYs ($P<0.01$). SHRs treated with kefir presented lower MAP and HR values ($P<0.01$) compared to untreated SHRs. Kefir treatment normalized the HR levels in SHRs, but the MAP levels remained higher compared with WKYs ($P<0.01$) (**Fig.1A-B**).

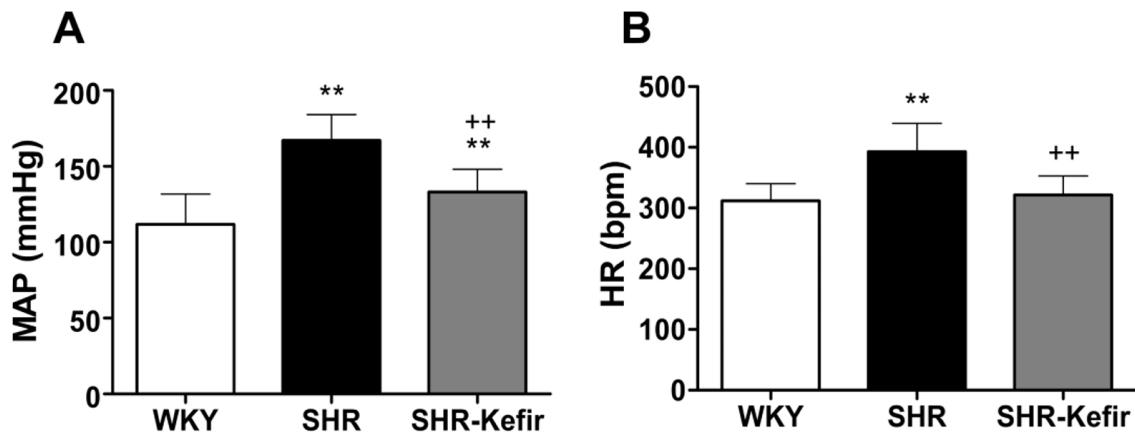


Fig. 1. Effects of long-term administration of kefir on the (A) mean arterial pressure (MAP) and (B) heart rate (HR) in SHR animals. Kefir treatment ameliorates the MAP (A), whereas the HR is normalized (B) in SHR-treated animals. Data are expressed as the mean \pm SEM. $n = 5$ in each group. ** $P < 0.01$ vs. WKY; ++ $P < 0.01$ vs. SHR. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

3.2. Kefir ameliorates the left ventricle-to-body weight ratio index (LVW/BW) in hypertensive animals

The results for the LVW/BW index for all groups are shown in **Fig. 2**. The SHRs showed an increase in the LVW/BW ratio ($P < 0.01$) compared to the WKYs.

Kefir treatment reduced the LVW/BW ratio in the SHR-Kefir ($P < 0.05$) compared to the untreated SHRs. The ratio was still higher in the SHR-Kefir group compared with the WKYs ($P < 0.05$).

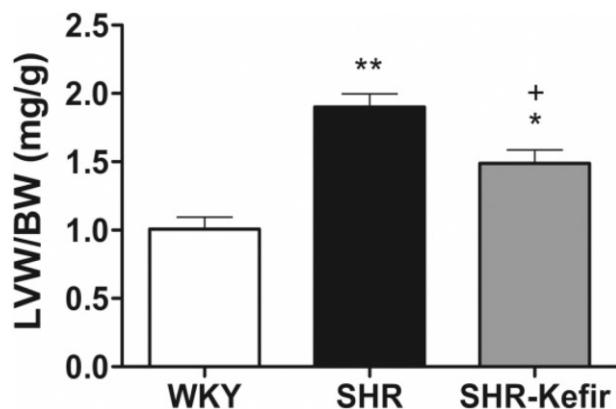


Fig. 2. Kefir treatment reduces the cardiac hypertrophy in the SHRs. Summary data showing improvement of the LVW/BW index in the SHR-Kefir group compared to the SHRs. Data are expressed as the mean \pm SEM. $n = 5$ in each group. * $P < 0.05$ vs. WKY; ** $P < 0.01$ vs. WKY; + $P < 0.05$ vs. SHR. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

3.3. Kefir improved cardiac function in hypertensive animals

Hemodynamic variables in the left ventricle were analyzed to investigate whether kefir treatment ameliorated cardiac functions in hypertension (**Fig. 3**). An increase in the LVSP in SHRs were found when compared to WKYs ($P<0.01$). Kefir-treated SHRs presented lower LVSP values ($P<0.01$) compared to SHRs (**Fig. 3A**). The SHR group had a lower Tau ($P<0.01$) compared to the WKY group, and kefir treatment increased time relaxation ($P<0.05$) (**Fig. 3B**). LV catheterization showed differences in both the maximum rate of pressure rise ($+dP/dt$) and the maximum LV relaxation rate ($-dP/dt$) during hypertension. The SHR group had an increase in $+dP/dt$ ($P<0.01$) compared to the WKY group. Kefir treatment in SHRs decreased $+dP/dt$ ($P<0.01$) compared to SHRs (**Fig. 3C**). The SHR group had a lower $-dP/dt$ ($P<0.05$) compared to the WKY group, and kefir treatment increased the $-dP/dt$ ($P<0.01$) compared to the SHRs (**Fig. 3D**). Note that while kefir ameliorated all hemodynamic variables studied, it did not normalize to normotensive levels ($P<0.01$), except for the $-dP/dt$ values.

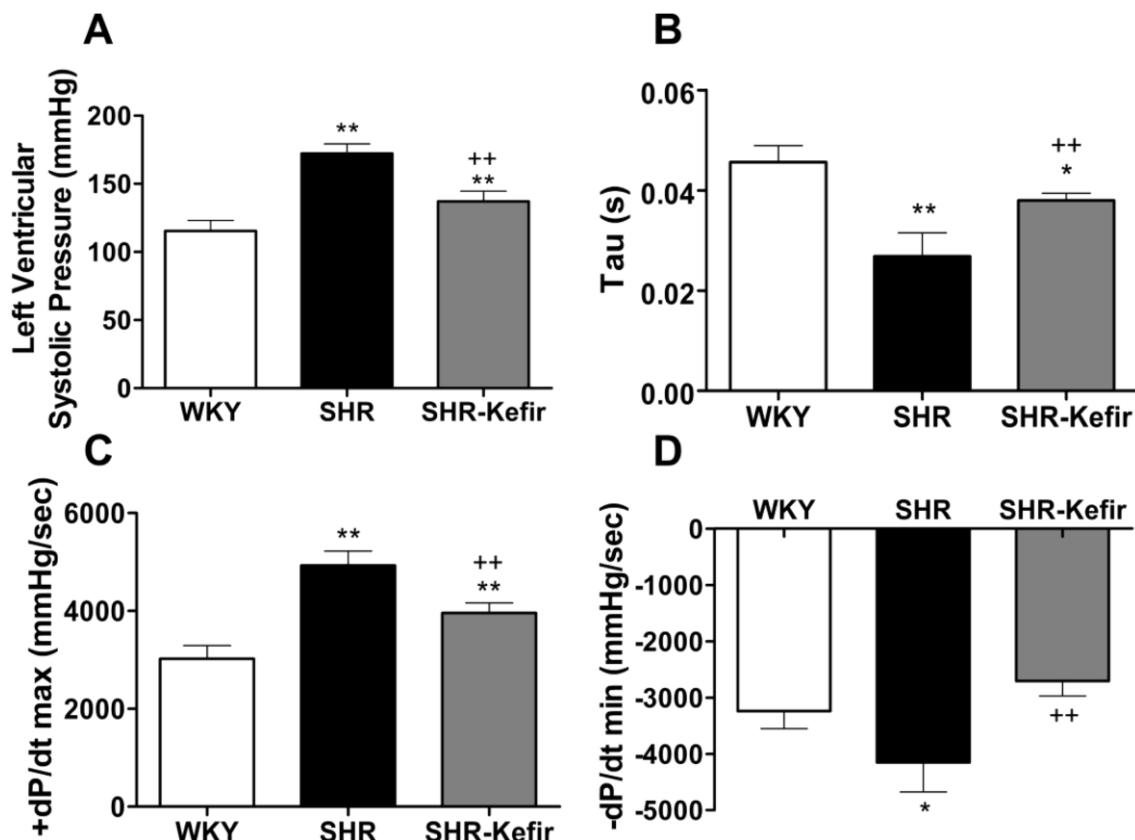


Fig. 3. Effects of the long-term administration of kefir on the left ventricle systolic pressure (LVSP) (A), the time constant of isovolumetric relaxation (Tau) (B), the positive first derivatives dP/dt maximum left ventricle (C), and the negative positive first derivatives dP/dt minimum (D).

The data are expressed as the mean \pm SEM. $n = 5$ in each group. ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ vs. WKY; ++ $P < 0.01$ vs. SHR. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

3.4. Kefir treatment normalized the calcium-handling proteins in hypertensive animals

To investigate whether kefir treatment ameliorates cardiac contractility, calcium-handling proteins in the LV of the animals were analyzed (**Fig. 4**). The total PLB protein and the phosphorylated PLB fraction (p-PLB) in the SHR group ($P < 0.05$) were increased compared to the WKY group ($P < 0.05$). Normalized levels of PLB and p-PLB were observed in the SHR group treated with kefir compared to the WKY group (**Fig. 4A-B**).

The SHR group also showed a significant increase in the phosphorylated PLB/PLB total ratio ($P < 0.05$) compared with the WKY ($P < 0.05$) an effect that was prevented by kefir in the SHR-Kefir group (**Fig. 4C**). The SERCA2a protein also increased in the SHR group ($P < 0.05$) and normalized by kefir treatment ($P < 0.01$) compared to the WKY group (**Fig. 4D**).

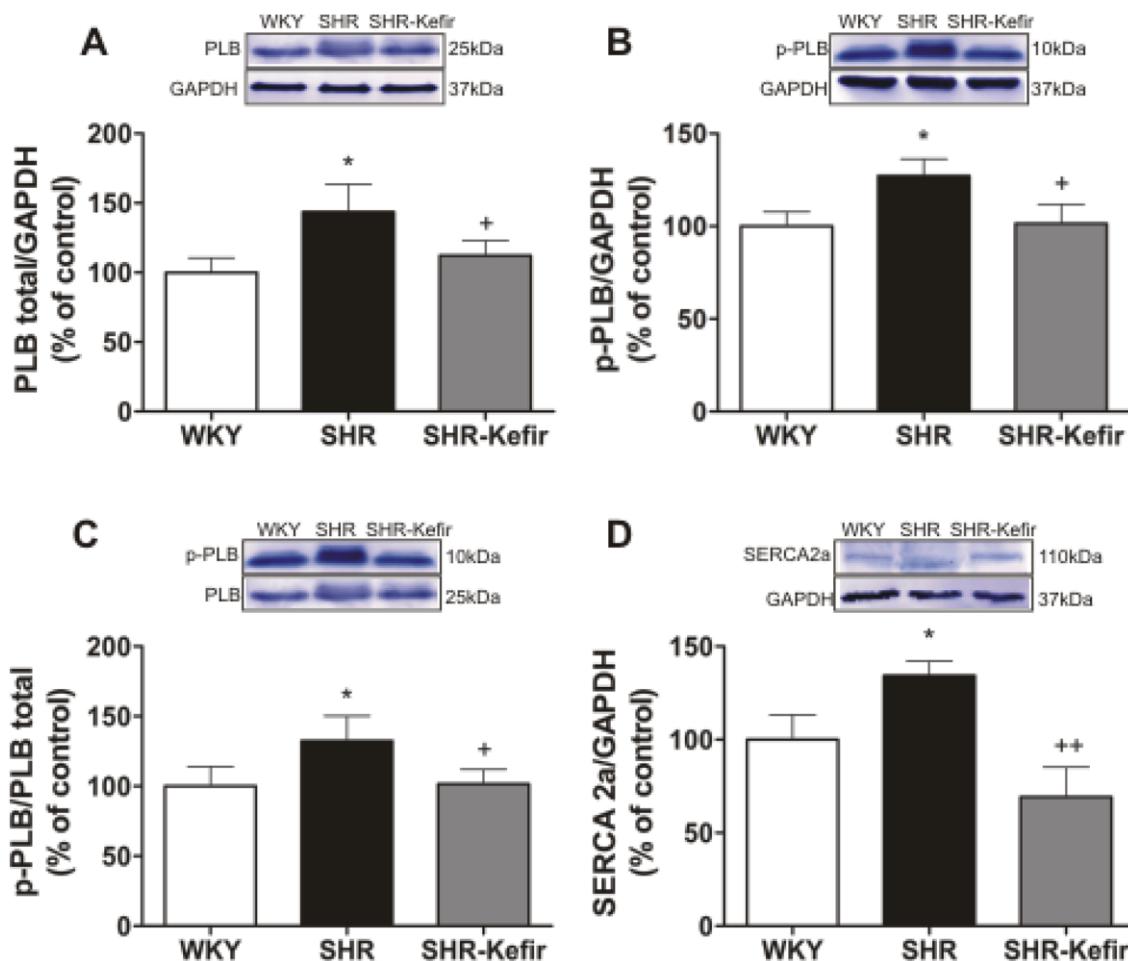


Fig. 4. Effects of the long-term administration of kefir on the calcium-handling proteins in the left ventricle. (A) PLB: phospholamban. (B) p-PLB: p-Thr17-PLB. (C) p-PLB/PLB ratio and (D) SERCA2a: SR Ca^{2+} -ATPase. The signal from each protein was normalized by the endogenous control (GAPDH). Note that PLB, pPLB, and SERCA2a are increased in the SHR group. The kefir treatment in the SHR-Kefir group normalized all three contractile cardiac proteins, as well as the p-PLB/PLB ratio. Data are expressed as the mean \pm SEM. $n = 5$ in each group. * $P < 0.05$ vs. WKY; $^+P < 0.05$ vs. SHR and $^{++}P < 0.01$ vs. SHR. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

3.5. Probiotics normalized sympathetic signaling within the PVN of SHRs

To evaluate whether kefir treatment altered the increased sympathetic signaling within the PVN and RVLM during hypertension, TH density measurements were used as an indicator of sympathetic activity (**Fig. 5**). Within the PVN, TH density values were higher in the SHRs ($P < 0.01$) compared to the WKYs. Likewise, higher immunofluorescence density of TH was observed within the RVLM of the SHRs ($P < 0.05$) compared to the WKYs. Kefir treatment normalized TH levels in both nuclei, suggesting its action in diminishing sympathetic activity (PVN: $P < 0.01$ and RVLM: $P < 0.05$, arbitrary units [AU]; compared to the SHR group, respectively).

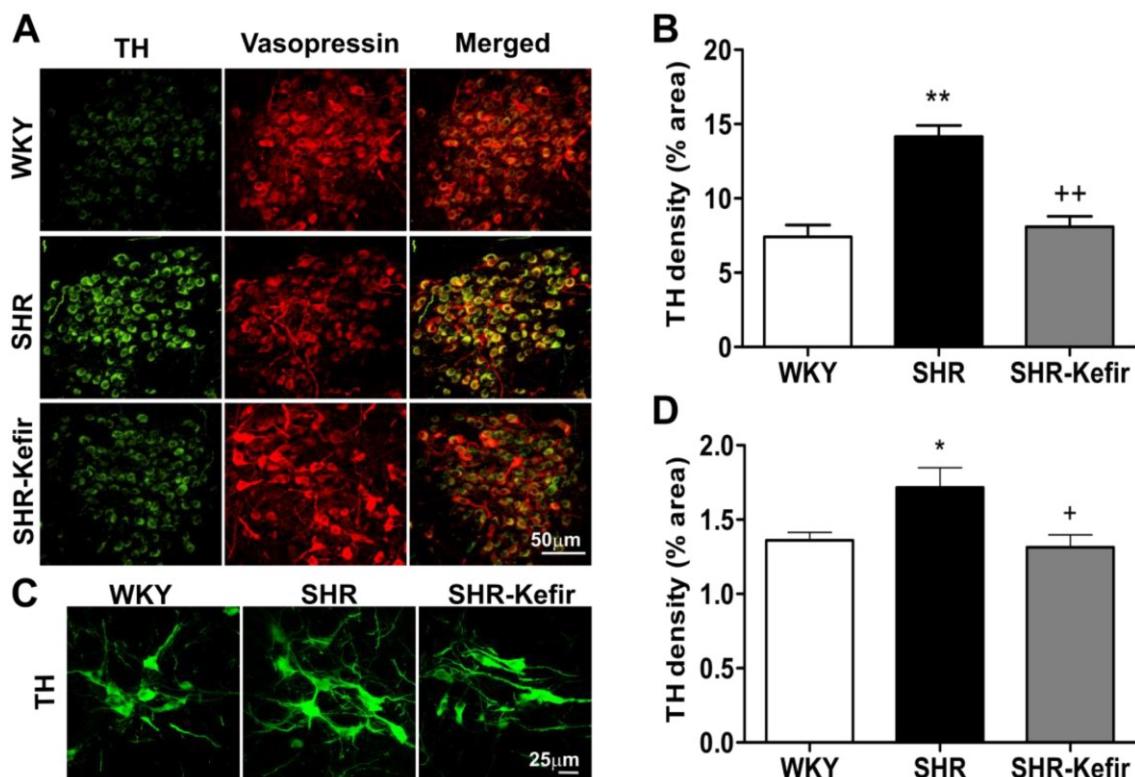


Fig. 5. Long-term treatment with kefir normalizes levels of tyrosine hydroxylase (TH) within the paraventricular nucleus of rostral ventrolateral medulla (C, D) in hypertensive animals.

Densitometry the hypothalamus (A, B) and the analysis was used to quantify TH levels within the PVN (B) and RVLM (D) in all three animal groups as an indicator of sympathetic activity. Summary data show increased TH density in SHR untreated within the PVN (B) and the RVLM (D), which was normalized with kefir treatment. Data are expressed as the mean \pm SEM. $n = 5$ in each group. * $P < 0.05$ vs. WKY; $^+P < 0.05$ vs. SHR and $^{++}P < 0.01$ vs. SHR. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

4. Discussion

This study was designed to investigate the long-term effects of kefir treatment on cardiac function in SHRs, and their potential effects on calcium-handling proteins. This study also investigates the effects of kefir on sympathetic signaling within the central cardiovascular nuclei of the animals. The main findings of this study are summarized as follows: (i) long-term kefir treatment improved hemodynamic parameters (LVSP, $+dP/dT$, $-dP/dT$ and Tau) on the left ventricle of SHRs; (ii) kefir-treated SHRs presented normalized cardiac protein expression of PLB, p-PLB, and SERCA2a compared to untreated hypertensive animals; and (iii) long-term kefir treatment normalized TH within the PVN and RVLM of SHRs.

Hypertension is a significant risk factor for the development of cardiac hypertrophy with consequent heart failure disease [3]. Studies by Lin et al. have shown that probiotic-fermented purple sweet potato may mediate an antihypertrophic effect in SHRs [5]. Likewise, studies have also shown that probiotic supplementation attenuates cardiac hypertrophy in a heart failure model [25]. Moreover, it has been shown that fermented milk contains bioactive peptides with blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects [26]. In that sense, a meta-analysis suggested that probiotic fermented milk has BP-lowering effects in pre-hypertensive and hypertensive subjects [27]. Previous work from our group demonstrated that kefir treatment of hypertensive animals for sixty days has shown a significant attenuation of the basal MAP, HR, and cardiac hypertrophy [14]. However, the specific underlying mechanisms by which kefir reduces cardiac hypertrophy, such as its effects on LV hemodynamic and calcium-handling proteins in SHRs, were not known.

The effects of a probiotic can be explained by production and action of bioactive peptides or the direct action of bacteria on gut microbiota. Jeong et al. [28] showed modulation of gut microbiota and increase in fecal water content in mice receiving *Lactobacillus kefiranofaciens*. Additionally, bioactive peptides from Cow milk kefir [29]

and from Caprine kefir [30] were reported to have Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibitory activity. This ACE-inhibitory peptides should account to the antihypertensive effect of kefir. Recently, our group has reported that the non-bacterial fraction of kefir also reduces hypertension, indicating the participation of bioactive compounds in this effect [16].

Previous studies have shown that hypertrophied hearts display alterations in myocardial contractility [2, 25, 31]. Heart contractility and relaxation were evaluated using the first derivative ($+dP/dT_{max}$ and $-dP/dT_{min}$) and the active isovolumetric relaxation of the left ventricle in diastole using Tau (time constant of isovolumetric relaxation) [20, 32]. The results from this work shows that kefir probiotics ameliorate cardiac contractility.

Likewise, previous results have shown that probiotics reduce the amplitude of spontaneous heart contractions by mechanisms that involve a negative inotropic effect, suggesting that the negative inotropic effect is possibly connected with the activation of protein kinase C, which possesses an inhibiting activity on myocardial contractility [33].

Alterations in intracellular Ca^{2+} homeostasis have been implicated as underlying mechanisms of contractile dysfunction in failing hearts. The contraction in cardiac muscle is due to a balance between sarcolemmal (SL) and sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} transport [34]. Ca^{2+} -regulating proteins (PLB, SERCA2a) have direct effects on myocardial contractility [6, 31, 35].

Phosphorylation of PLB is responsible for its inactivation, resulting in the activation of SERCA2a and, consequently, in the increase of calcium uptake by the SR, thus contributing to the contractility [36, 37]. Beta-adrenergic signaling also regulates contractility by regulating the excitation-contraction coupling by higher retention of Ca^{2+} (via PLB phosphorylation and increased Ca^{2+} uptake by SERCA) [38].

Here, it is shown that hypertension increased the left ventricular expression of PLB, p-PLB, SERCA and the p-PLB/PLB total ratio.

Previous data report controversial data on cardiac contractility protein levels. While it has been shown that hypertension did not affect the left ventricle expression of PLB, p-PLB, SERCA2a [39], another group found decreased expression of PLB and

increased expression of SERCA2a in SHRs [6]. In our hands, as above-mentioned, an increase in PLB and SERCA2a expression in SHR was found, suggesting a dysregulation of calcium homeostasis. The phosphorylation of PLB favors the activation of SERCA2a, increasing cardiac contractility [31, 32]. Such dysregulation is normalized by kefir treatment (PLB, p-PLB, and SERCA2a protein expression), a possible mechanism by which kefir contributes to ameliorating cardiac contractility.

Within the central nervous system, the PVN and the RVLM play a crucial role in central cardiovascular regulation and sympathetic nerve activity [18]. The PVN is an integrative site within the brain that influences sympathetic vasomotor tone directly via the collateral PVN-intermediolateral cell column of the thoracolumbar spinal cord (IML) projections, indirectly, or via the PVN-RVLM connections or both mechanisms via PVN neurons that branched axons targeting the IML and RVLM [40]. The RVLM is a nucleus that phenotypically contains adrenergic neurons (characterized by tyrosine hydroxylase [TH]containing neurons, which are critical for maintaining blood pressure and vasomotor tone via projections to the sympathetic preganglionic neurons within the IML [41-43]. Most barosensitive RVLM neurons are TH immunoreactive[43].

Given that TH is a rate-limiting enzyme in the biosynthesis of the catecholamines, dopamine, adrenaline, and noradrenaline [22], it has been previously used as an indicator of sympathetic activity [7, 44, 45].

An increase in TH protein levels within the PVN and RVLM of untreated SHRs were find. Likewise, previous work has reported increased protein levels of TH, associated with sympathoexcitation within the PVN [46], and upregulation of TH gene expression positively correlated with an increase in systolic blood pressure within the RVLM of SHRs [47]. Treatment of SHRs with kefir normalized the TH density in both the PVN and RVLM. An increase in the sympathetic drive from the PVN and RVLM has been linked with left ventricle hypertrophy in hypertensive experimental models and humans [7, 48-50]. Hence, these results suggest that kefir may contribute to the reduction of cardiac hypertrophy in this model of hypertension, via a decrease in sympathetic activity. The adrenergic synapses in the PVN are involved in cardiac function. The injection of alpha-adrenergic agonist into the PVN increased HR, pressure peak and dP/dt peak data in the left ventricle, suggesting that PVN participates in the control of cardiac contractile function [51].

Studies involving measurement of the renal sympathetic nerve activity, which is increased in SHRs, are warranted, considering the limitation of TH density interpretation as an indicative but not a functional measurement of sympathetic activity.

In summary, there are studies that show that components of the catecholaminergic and angiotensin II systems are closely related in areas of the brain associated with blood pressure control [52, 53] and may interact with one another in this process. Moreover, β -adrenergic stimulation may increase Ca^{2+} influx by phosphorylation of PLB and therefore by stimulating SERCA, increasing Ca^{2+} content in SR favoring cardiac contractility [54].

In conclusion, our findings show that long-term kefir treatment reduced blood pressure, at least in part, by the reduction of cardiac hypertrophy, ameliorated cardiac function by improvement of cardiac contractility and of calcium-handling proteins and by the reduction of the sympathetic activity. These findings suggest that kefir has beneficial effects on hypertension and might be used as a coadjutant to alleviate hypertension.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES; Finance Code 001) and by the Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES; grant number 0279/2016).

References

- [1] Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. *Circulation*. 2016;134:441-50.
- [2] Chen-Izu Y, Chen L, Banyasz T, McCulle SL, Norton B, Scharf SM, et al. Hypertension-induced remodeling of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes occurs prior to hypertrophy development. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;293:H3301-10.
- [3] Messerli FH, Rimoldi SF, Bangalore S. The Transition From Hypertension to Heart Failure: Contemporary Update. *JACC Heart Fail*. 2017;5:543-51.
- [4] de Lucia C, Eguchi A, Koch WJ. New Insights in Cardiac beta-Adrenergic Signaling During Heart Failure and Aging. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:904.
- [5] Lin PP, Hsieh YM, Kuo WW, Lin CC, Tsai FJ, Tsai CH, et al. Inhibition of cardiac hypertrophy by probiotic-fermented purple sweet potato yogurt in spontaneously hypertensive rat hearts. *International journal of molecular medicine*. 2012;30:1365-75.
- [6] Plackic J, Preissl S, Nikonova Y, Pluteanu F, Hein L, Kockskamper J. Enhanced nucleoplasmic Ca(2+) signaling in ventricular myocytes from young hypertensive rats. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016;101:58-68.
- [7] Song XA, Jia LL, Cui W, Zhang M, Chen W, Yuan ZY, et al. Inhibition of TNF-alpha in hypothalamic paraventricular nucleus attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by inhibiting neurohormonal excitation in spontaneously hypertensive rats. *Toxicology and applied pharmacology*. 2014;281:101-8.
- [8] Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of hypertension*. 2013;31:1281-357.
- [9] Brown L, Poudyal H, Panchal SK. Functional foods as potential therapeutic options for metabolic syndrome. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2015;16:914-41.
- [10] Khan MI, Anjum FM, Sohaib M, Sameen A. Tackling metabolic syndrome by functional foods. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2013;14:287-97.
- [11] Pimenta FS, Luaces-Regueira M, Ton AM, Campagnaro BP, Campos-Toimil M, Pereira TM, et al. Mechanisms of Action of Kefir in Chronic Cardiovascular and

- Metabolic Diseases. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. 2018;48:1901-14.
- [12] Khalesi S, Sun J, Buys N, Jayasinghe R. Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. Hypertension. 2014;64:897-903.
- [13] Santanna AF, Filete PF, Lima EM, Porto ML, Meyrelles SS, Vasquez EC, et al. Chronic administration of the soluble, nonbacterial fraction of kefir attenuates lipid deposition in LDLr^{-/-} mice. Nutrition. 2017;35:100-5.
- [14] Klippe BF, Duemke LB, Leal MA, Friques AG, Dantas EM, Dalvi RF, et al. Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. Frontiers in physiology. 2016;7:211.
- [15] Friques AG, Arpini CM, Kalil IC, Gava AL, Leal MA, Porto ML, et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. J Transl Med. 2015;13:390.
- [16] Brasil GA, Silva-Cutini MA, Moraes FSA, Pereira TMC, Vasquez EC, Lenz D, et al. The benefits of soluble non-bacterial fraction of kefir on blood pressure and cardiac hypertrophy in hypertensive rats are mediated by an increase in baroreflex sensitivity and decrease in angiotensin-converting enzyme activity. Nutrition. 2018;51-52:66-72.
- [17] Cohn JN. Sympathetic nervous system activity and the heart. American journal of hypertension. 1989;2:353S-6S.
- [18] Chen QH, Toney GM. In vivo discharge properties of hypothalamic paraventricular nucleus neurons with axonal projections to the rostral ventrolateral medulla. Journal of neurophysiology. 2010;103:4-15.
- [19] National Research Council IfLAR, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eighth Edition ed. Washington, DC: National Academies Press; 2011.
- [20] Nascimento AM, Lima EM, Brasil GA, Caliman IF, Silva JF, Lemos VS, et al. Serca2a and Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger are involved in left ventricular function following cardiac remodelling of female rats treated with anabolic androgenic steroid. Toxicology and applied pharmacology. 2016;301:22-30.
- [21] Wang X, Ren B, Liu S, Sentex E, Tappia PS, Dhalla NS. Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat. Journal of applied physiology. 2003;94:752-63.

- [22] Shi YC, Lau J, Lin Z, Zhang H, Zhai L, Sperk G, et al. Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell metabolism*. 2013;17:236-48.
- [23] Biancardi VC, Stranahan AM, Krause EG, de Kloet AD, Stern JE. Cross talk between AT1 receptors and Toll-like receptor 4 in microglia contributes to angiotensin II-derived ROS production in the hypothalamic paraventricular nucleus. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2016;310:H404-15.
- [24] Higa-Taniguchi KT, Silva FC, Silva HM, Michelini LC, Stern JE. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;292:R1717-27.
- [25] Gan XT, Ettinger G, Huang CX, Burton JP, Haist JV, Rajapurohitam V, et al. Probiotic administration attenuates myocardial hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat. *Circulation Heart failure*. 2014;7:491-9.
- [26] Seppo L, Jauhainen T, Poussa T, Korpela R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American journal of clinical nutrition*. 2003;77:326-30.
- [27] Dong JY, Szeto IM, Makinen K, Gao Q, Wang J, Qin LQ, et al. Effect of probiotic fermented milk on blood pressure: a meta-analysis of randomised controlled trials. *The British journal of nutrition*. 2013;110:1188-94. [28] Jeong D, Kim DH, Kang IB, Kim H, Song KY, Kim HS, et al. Modulation of gut microbiota and increase in fecal water content in mice induced by administration of *Lactobacillus kefir* DN1. *Food & function*. 2017;8:680-6.
- [29] Ebner J, Asci Arslan A, Fedorova M, Hoffmann R, Kucukcetin A, Pischetsrieder M. Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. *Journal of proteomics*. 2015;117:41-57.
- [30] Quiros A, Hernandez-Ledesma B, Ramos M, Amigo L, Recio I. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of dairy science*. 2005;88:3480-7. [31] Berger RCM, Benetti A, Girardi ACC, Forechi L, de Oliveira RM, Vassallo PF, et al. Influence of Long-Term Salt Diets on Cardiac Ca²⁺ Handling and Contractility Proteins in Hypertensive Rats. *American journal of hypertension*. 2018;31:726-34.

- [32] Davis KL, Mehlhorn U, Schertel ER, Geissler HJ, Trevas D, Laine GA, et al. Variation in tau, the time constant for isovolumic relaxation, along the left ventricular base-to-apex axis. *Basic research in cardiology*. 1999;94:41-8.
- [33] Sobol KV, Korotkov SM, Nesterov VP. [Inotropic effect of a new probiotic product on myocardial contractility. Comparison with diazoxide]. *Biofizika*. 2014;59:959-66.
- [34] Ward ML, Crossman DJ, Cannell MB. Mechanisms of reduced contractility in an animal model of hypertensive heart failure. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2011;38:711-6.
- [35] Zwadlo C, Borlak J. Disease-associated changes in the expression of ion channels, ion receptors, ion exchangers and Ca(2+)-handling proteins in heart hypertrophy. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;207:244-56.
- [36] Tada M, Kirchberger MA, Katz AM. Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1975;250:2640-7.
- [37] Verboomen H, Wuytack F, De Smedt H, Himpens B, Casteels R. Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca²⁺ pumps and their modulation by phospholamban. *The Biochemical journal*. 1992;286 (Pt 2):591-5.
- [38] Yang JH, Saucerman JJ. Phospholemmann is a negative feed-forward regulator of Ca²⁺ in beta-adrenergic signaling, accelerating beta-adrenergic inotropy. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;52:1048-55.
- [39] Carneiro-Junior MA, Quintao-Junior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, da Cunha DN, et al. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2013;57:119-28.
- [40] Badoer E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2001;28:95-9.
- [41] Guyenet PG, Haselton JR, Sun MK. Sympathoexcitatory neurons of the rostroventrolateral medulla and the origin of the sympathetic vasomotor tone. *Prog Brain Res*. 1989;81:105-16.
- [42] Lipski J, Kanjhan R, Kruszewska B, Smith M. Barosensitive neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat *in vivo*: morphological properties and relationship to C1 adrenergic neurons. *Neuroscience*. 1995;69:601-18.

- [43] Schreihofner AM, Guyenet PG. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. *The Journal of comparative neurology*. 1997;387:524-36.
- [44] Burgi K, Cavalleri MT, Alves AS, Britto LR, Antunes VR, Michelini LC. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2011;300:R264-71.
- [45] Kang YM, Gao F, Li HH, Cardinale JP, Elks C, Zang WJ, et al. NF-kappaB in the paraventricular nucleus modulates neurotransmitters and contributes to sympathoexcitation in heart failure. *Basic research in cardiology*. 2011;106:1087-97.
- [46] Ogundele OM, Lee CC, Francis J. Age-dependent alterations to paraventricular nucleus insulin-like growth factor 1 receptor as a possible link between sympathoexcitation and inflammation. *J Neurochem*. 2016;139:706-21.
- [47] Reja V, Goodchild AK, Phillips JK, Pilowsky PM. Tyrosine hydroxylase gene expression in ventrolateral medulla oblongata of WKY and SHR: a quantitative real-time polymerase chain reaction study. *Auton Neurosci*. 2002;98:79-84.
- [48] Yu XJ, Zhang DM, Jia LL, Qi J, Song XA, Tan H, et al. Inhibition of NF-kappaB activity in the hypothalamic paraventricular nucleus attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating cytokines and attenuating oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology*. 2015;284:315-22.
- [49] Schlachter MP, Kaye DM, Lambert E, Sommerville M, Socratous F, Esler MD. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2003;108:560-5. [50] Ren XS, Ling L, Zhou B, Han Y, Zhou YB, Chen Q, et al. Silencing salusin-beta attenuates cardiovascular remodeling and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Scientific reports*. 2017;7:43259.
- [51] Mendonca MM, Santana JS, da Cruz KR, Ianzer D, Ghedini PC, Nalivaiko E, et al. Involvement of GABAergic and Adrenergic Neurotransmissions on Paraventricular Nucleus of Hypothalamus in the Control of Cardiac Function. *Frontiers in physiology*. 2018;9:670.
- [52] Phillips MI. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annual review of physiology*. 1987;49:413-35.
- [53] Maximino JR, Ferrari MF, Coelho EF, Fior-Chadi DR. Time course analysis of tyrosine hydroxylase and angiotensinogen mRNA expression in central nervous

system of rats submitted to experimental hypertension. *Neuroscience research.* 2006;55:292-9.

[54] Eisner DA, Caldwell JL, Kistamas K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circulation research.* 2017;121:181-95.



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal of Nutritional Biochemistry 66 (2019) 79–85

**Journal of
Nutritional
Biochemistry**

Long-term treatment with kefir probiotics ameliorates cardiac function in spontaneously hypertensive rats

Mirian A Silva-Cutini^{a,c}, Simone A Almeida^b, Andrews M Nascimento^a, Gláucia R Abreu^b, Nazaré S Bissoli^b, Dominik Lenz^a, Denise C Endringer^a, Girlandia A Brasil^a, Ewelyne M Lima^a, Vinicia C Biancardi^{c,*}, Tadeu U Andrade^{a,**}

^aDepartment of Pharmacy, University Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil

^bDepartment of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

^cAnatomy, Physiology, and Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Auburn University, AL, United States

Received 25 October 2018; received in revised form 12 December 2018; accepted 11 January 2019

PII: S0955-2863(18)31061-1

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.01.006>

Reference: JNB 8120

To appear in: *The Journal of Nutritional Biochemistry*

Received date: 25 October 2018

Revised date: 12 December 2018

Accepted date: 11 January 2019

Please cite this article as:

Silva-Cutini, M. A., S. A. Almeida, A. M. Nascimento, G. R. Abreu, N. S. Bissoli, D. Lenz, D. C. Endringer, G. A. Brasil, E. M. Lima, V. C. Biancardi and T. U. Andrade (2019). "Long-term treatment with kefir probiotics ameliorates cardiac function in spontaneously hypertensive rats." *J Nutr Biochem* **66**: 79-85.

Capítulo 2

Artigo 2: Kefir ameliorates hypertension via gut-brain mechanism in spontaneously hypertensive rats.

Kefir ameliorates hypertension via gut-brain mechanism in spontaneously hypertensive rats

Mirian Almeida Silva-Cutini^{a,b}, Francesca Elisabeth Mowry^a, Sarah Christine Peaden^a, Tadeu Uggere Andrade^{b*}, Vinicia Campana Biancardi^{a,c*}

a – Anatomy, Physiology, & Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Auburn University. 217 Greene Hall, Auburn, AL, USA. 36849

b – Department of Pharmacy, Universidade Vila Velha. Avenida Comissario Jose Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, BRA. 29107-372

c – Center for Neurosciences Research Initiative, Auburn University, Auburn, AL, USA. 36849

*Corresponding authors:

Vinicio C. Biancardi, PhD

217 Greene Hall,

Auburn, AL 36849

Phone: 334 844 5304

Fax: (+1) 334 844 5388

vbiancardi@auburn.edu

Tadeu Uggere Andrade

Avenida Comissario Jose Dantas de Melo, 21,

Boa Vista, Vila Velha, ES, BRA. 29107-372

Phone: (+55) 27 3421-2091

Fax: (+55) 27 3421 2087

tadeu.andrade@uvv.br

ABSTRACT

Hypertension is associated with gut dysbiosis and dysregulation of the gut-brain axis, and previous work has shown that probiotic treatments exert beneficial cardiovascular effects in humans and animal models of hypertension. Coupled with the evidence of elevated sympathetic outflow and chronic inflammation in hypertension, we hypothesized that both peripherally- and centrally-mediated mechanisms underlie the anti-hypertensive effects of kefir, a probiotic obtained from the fermentation of milk by kefir grains, in spontaneously hypertensive rats (SHR). Eight-week-old SHRs were treated by oral gavage with either a vehicle or kefir (0.3mL/100g/day for nine weeks) and age-matched with Wistar Kyoto (WKY) rats receiving vehicle. Compared to WKY, SHRs exhibited alterations in the wall of the jejunum (reduced number of Paneth cells/crypt and increased tunica muscularis thickness). SHR serum lipopolysaccharide (LPS) levels were increased compared to WKY, suggesting possible disruption of the gut-blood barrier. In addition, microglial activation was enhanced in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and rostral ventrolateral medulla (RVLM) of SHRs. Nine weeks of treatment with kefir normalized all of these parameters in SHRs and attenuated blood pressure elevations. Taken together, our findings indicate that the anti-hypertensive effects of long-term kefir treatment occur, at least in part, through improvement in the structural and functional integrity of the intestinal wall, possible amelioration of gut-blood barrier disruption, and protection against neuroinflammation within cardiovascular nuclei.

Keywords: Hypertension, probiotics, gut pathology, microglia, neuroinflammation

Highlights

- Kefir probiotic improves small intestine functionality in hypertensive rats;
- Kefir normalizes the tunica muscularis thickness and Paneth cell counts;
- Kefir also restores circulating serum endotoxin levels during hypertension;
- Kefir diminishes microglial activation within central cardioregulatory nuclei;
- Anti-hypertensive effects of kefir are both peripherally and centrally mediated

1. Introduction

Hypertension is a multifactorial disease associated with an increased risk of major cardiovascular events such as heart failure, stroke, and coronary heart disease (Benjamin, Virani et al. 2018). While the etiology of hypertension is complex, recent research has shown an association between hypertension, altered composition of the gut microbiome, gastrointestinal dysfunction, and dysregulated signaling along the gut-brain axis (Mell, Jala et al. 2015, Yang, Santisteban et al. 2015, Yang, Aquino et al. 2019). The possibility for a causative or contributory role of gut dysbiosis to hypertension suggests that non-pharmacological interventions capable of modulating the microbiome may be a potential strategy for improving outcomes in hypertensive individuals. The use of functional foods, including naturally occurring probiotics, have indeed been associated with cardiovascular benefits. Of note, human clinical trials have shown that the use of probiotics moderately decreases systolic blood pressure (BP) in hypertensive patients (reviewed in (Khalesi, Sun et al. 2014)).

Kefir is a safe, nutraceutical dairy product produced via fermentation of the lactic acid bacteria and yeast naturally present in kefir grains (Ahmed, Wang et al. 2013). Friques and collaborators were the first to demonstrate improvements in cardiovascular function with kefir treatment in spontaneously hypertensive rats (SHRs), an experimental model of essential hypertension (Friques, Arpini et al. 2015). Daily kefir treatment decreased BP, attenuated endothelial dysfunction, restored intravascular reactive oxygen species (ROS)/nitric oxide (NO) dysregulation, and increased recruitment of endothelial progenitor cells. Of note, these effects were time-dependent, occurring at a significant level following eight weeks of treatment (Friques, Arpini et al. 2015). Long-term treatment with kefir in SHRs has also been shown to improve cardiac hypertrophy and enhance cardiac autonomy of baroreflex sensitivity and heart rate in this model (Klippele, Duemke et al. 2016). Despite the evidence that kefir diminishes BP and promotes improvement in overall cardiovascular function during hypertension, the underlying mechanisms, in particular in the gut wall pathology, and central mechanisms for such beneficial effects, are not fully elucidated.

Previous studies have shown that gut dysbiosis, combined with peripheral and central inflammation, leads to the development, establishment, and maintenance of high BP

(Yang, Santisteban et al. 2015, Santisteban, Qi et al. 2017, Yang, Aquino et al. 2019). Aberrant control of central cardioregulatory regions, such as the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and the rostral ventrolateral medulla (RVLM), is directly involved in the pathogenesis of hypertension (Allen 2002, Guyenet, Stornetta et al. 2018). Within those regions, microglial activation has been associated with the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines, leading to neuroinflammation during hypertension (Shi, Diez-Freire et al. 2010, Santisteban, Ahmari et al. 2015). Recently, Raizada's group (Sharma, Yang et al. 2019) has demonstrated that the inhibition of microglial activation within the PVN is associated with alterations in gut microbial communities and strong attenuation of gut pathology during hypertension.

Therefore, we hypothesized that the cardiovascular improvements observed in SHRs following long-term kefir treatment result from a combination of peripherally- and centrally-mediated mechanisms, namely, restoration of the intestinal structure, reduction of circulating endotoxins, and decreasing microglial activation within cardioregulatory nuclei of the Central Nervous System.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental groups

Eight-week-old male Wistar Kyoto (WKY) and SHR rats (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) were maintained in the animal care facility at Auburn University in Auburn, AL, USA. The rats were housed in temperature (20-26°C), humidity (30-70%), and light (12 h day/12 h night) controlled rooms with standard rat chow and water freely available at all times. The Auburn University Institutional Animal Care and Use Committee approved all animal protocols and experimental procedures (2017-3055). Animals were randomly divided into three experimental groups ($n = 9/\text{group}$): 1) control WKY treated with vehicle (whole milk; 3.25% milk fat), 2) control SHR treated with vehicle, and 3) SHR-Kefir treated with kefir beverage.

2.2. Kefir Fermentation

The kefir beverage was prepared daily throughout the nine-week treatment period, as previously described (Brasil, Silva-Cutini et al. 2018). Briefly, kefir grains were added to pasteurized whole milk in a ratio of 5% (w/v) and kept at room temperature (23°C).

After 24 h, a plastic sieve was used to strain the mixture, and the filtered product was refrigerated (4°C) for 24 h to permit yeast growth. The resultant kefir was administered by oral gavage (0.3 mL/100g BW) (Friques, Arpini et al. 2015). Kefir grains were kindly donated by Dr. Ferreira from the Federal University of Vicos, Minas Gerais, Brazil.

2.3. BP measurements

Non-invasive BP measurements were performed with a volume pressure recording tail-cuff system for rats, per the manufacturer's protocol (CODA-6; Kent Scientific Corporation, CT, USA). Animals were acclimated to the holder and cuffs for three consecutive days before baseline BP measurements. During the treatment period, BP measurements were taken weekly and consisted of five acclimation cycles, followed by twenty consecutive BP measurements. An average of the consecutive BP measurements for each group was used for statistical analysis.

2.4. Lipopolysaccharide (LPS) assay

At the conclusion of the nine-week treatment, a subgroup of animals was deeply anesthetized (isoflurane 5%) and sacrificed by rapid decapitation. Trunk blood was immediately collected into sterile, pyrogen-free tubes and incubated for 30 min at 4°C. Blood was centrifuged at 7000 g for 10 min at 23°C. Serum was collected and stored at -20°C until use. Serum concentrations of LPS were analyzed by a colorimetric detection method (microplate reader, Spectrophotometer) using the Pierce™*Limulus* Amebocyte Lysate (LAL) Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (CAT: 88282; Thermo Scientific, Rockford, IL), according to the manufacturer's instructions.

2.5. Histological analysis

Histological samples from the small intestine were prepared as previously described (Giblot Ducray, Globa et al. 2016). Briefly, samples were fixed in Bouin's solution (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) for 48h at room temperature. Samples were washed in 70% alcohol to remove excess fixative, embedded in paraffin, and sectioned at 6 µm with a microtome (Reichert-Jung 2040 Autocut, Leica Biosystems Nusslock GmbH, Heidelberger Straße 17-19, 69226 Nussloch, Germany). Tissue sections were mounted with Eukitt Mounting Medium (Electron Microscopy

Sciences, Hatfield, PA), and examined by light microscopy using a digital camera (QImagingRetiga 2000R) coupled to an optical microscope (Nikon Eclipse E800).

2.5.1. Goblet cells staining and morphology assessment

Sections were stained with Alcian blue/Periodic Acid-Schiff (PAS), counter-stained with hematoxylin, and differentiated with acid alcohol prior to dehydration, clearance, and mounting (Gill, Frost et al. 1974). 20x magnification of each histological section at areas where the villi were not bent or overlapping was obtained to quantify goblet cells. The number of goblet cells/villus, villus length, and tunica muscularis thickness were measured using ImageJ software (NIH; <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

2.5.2. Paneth cells

Sections were stained with phloxine-tartrazine, as previously described (Di Sabatino, Miceli et al. 2008). Briefly, sections were rehydrated with xylene and ethanol, treated with hematoxylin followed by a 0.5% phloxine-0.5% aqueous calcium chloride solution, and blotted dry. The final steps included differentiation with a saturated solution of tartrazine in Cello solvent, followed by a brief rinse with absolute ethanol and dehydration with xylene (Di Sabatino, Miceli et al. 2008). The number of Paneth cells/crypt was counted in each histological section, working at 60x magnification (Cazorla, Maldonado-Galdeano et al. 2018). Quantifications were conducted in a blinded manner by a single researcher.

2.6. Immunohistochemistry

Animals were transcardially perfused with 0.01 mol/L phosphate-buffered saline (PBS; 150 ml) followed by 4% formaldehyde (PFA; 350 ml). Brains were post-fixed for 3 h in 4% PFA and cryoprotected in PBS containing 30% sucrose for 3 days at 4°C. Slices of 30 µm and 40 µm containing the PVN and RVLM, respectively, were collected by cryostat sectioning (Microm cryostat HM 525). Samples were stored at -20°C in cryoprotectant solution [450 mL dH₂O, 300 mL ethylene glycol (Aldrich, USA), 200 mL glycerol (RNase-Free; Sigma, USA), 75 mL 0.3M PBS] until used.

Slices were pre-incubated in PBST (0.01M PBS, 0.04% NaN₃, 0.1% Triton) containing 10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch, USA) for 1 h. Primary

antibodies included anti-rabbit ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA1; 1:2000; Wako Chemicals, USA), anti-guinea pig vasopressin (VP; 1:10000; Peninsula Laboratories International, USA), and anti-mouse tyrosine hydroxylase (TH; 1:250; Santa Cruz Biotechnology, USA). Samples were incubated for 48h (IBA1) or 24h (VP and TH) with primary antibodies in PBST, washed with PBS, and incubated with secondary antibodies for 4 hrs [Alexa Fluor® AffiniPure Donkey IgG (H+L) anti-mouse 488 (1:250), anti-rabbit 594 (1:250), and anti-guinea pig (1:50); Jackson ImmunoResearch, USA]. Samples were washed and mounted onto slides with Vectashield Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories, USA).

Immunofluorescence was examined with a Nikon Eclipse TE2000-E inverted microscope coupled to a Nikon A1 confocal laser microscope. Full-thickness z-stack images were taken at 60x magnification. VP and TH stains were used as anatomic markers for the PVN and RVLM, respectively. Maximum projection images of IBA1 staining were used to assess microglial morphology, as previously described (Morrison and Filosa 2013). Briefly, a series of digital transformations were performed using ImageJ Software (NIH) to generate a skeletonized image. Total branch length and endpoints were calculated for each image using the AnalyzeSkeleton plugin, and a relative reduction in these values was indicative of increased microglial activation.

2.7. Statistical analysis

The values are expressed as mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). Statistical comparisons were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test. A value of $p<0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism® 7 Software.

3. Results

3.1. Long-term treatment of kefir diminishes BP in SHRs

To evaluate whether kefir treatment altered BP in hypertensive animals, BP was measured before the onset of treatment, and weekly during the kefir treatment period. After nine weeks of treatment, SHR MAP was significantly greater in SHRs (178.5 ± 3.32 mmHg) as compared to SHR-Kefir (149.3 ± 3.21 mmHg), as well as WKY

(122.7 ± 2.72 mmHg), indicating that long-term kefir treatment mitigated further MAP elevations in these animals (**Fig. 1**).

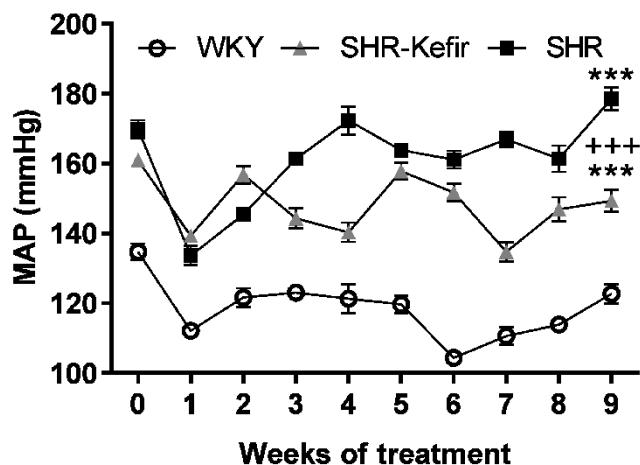


Fig. 1. Kefir treatment prevents increase in mean arterial pressure (MAP) in hypertensive animals. MAP of normotensive WKY (n=9) spontaneously hypertensive rats (SHR; n=9), and hypertensive rats treated with kefir (SHR-Kefir; n=9). Results were compared by one way ANOVA and Tukey post-hoc test. Values are expressed as mean \pm SEM; *** $P<0.0001$ vs. WKY; +++ $P<0.0001$ vs. SHR

3.2. Pathophysiological alterations in gut epithelial barrier during hypertension are partially rescued by kefir treatment

Paneth cell (**Fig.2A-C**) and goblet cell (**Fig.2D-F**) populations were used as indices of epithelial barrier integrity in the small intestine. In SHRs, both the number of Paneth cells/crypt (1.66 ± 0.16 cells) and the number of goblet cells/villus (12.23 ± 0.77 cells) were decreased compared to WKY (Paneth cells/crypt: 2.44 ± 0.17 ; goblet cells/villus: 16.69 ± 1.23). The number of Paneth cells/crypt was normalized with kefir treatment (2.23 ± 0.31 cells/crypt) (**Fig.2G**). Conversely, the number of goblet cells/villus was unaltered in SHR-Kefir animals (11.41 ± 0.56 cells) compared to control SHR (**Fig. 2H**).

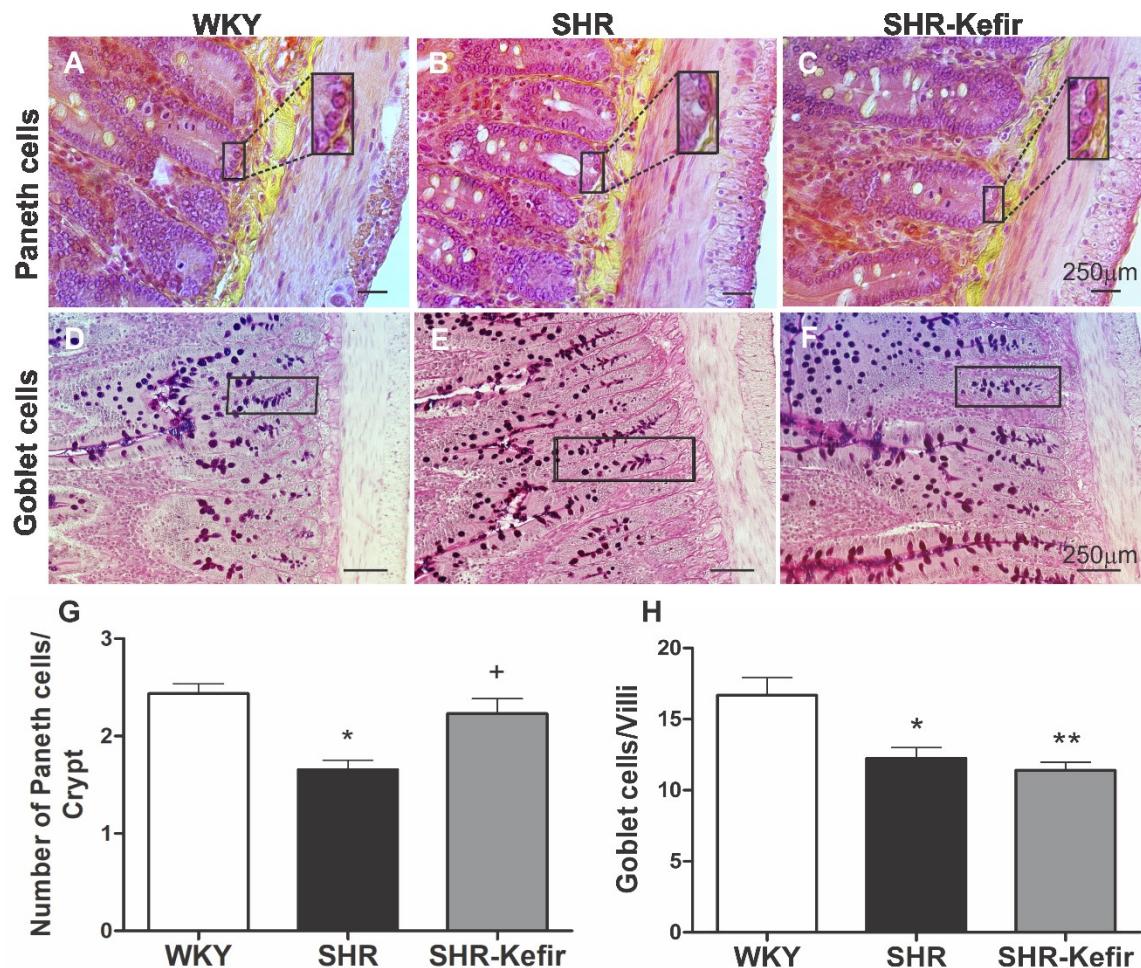


Fig. 2. Kefir treatment rescues morphological and pathophysiological alterations as seen within cross sections of the small intestine. Samples from each group (normotensive WKY (n=6), spontaneously hypertensive rats (SHR; n=6), and hypertensive rats treated with kefir (SHR-Kefir; n=4)) were stained with phloxine-tartrazine (A-C) and Alcian blue/Periodic Acid-Schiff (PAS) and hematoxylin (D-F) to quantify Paneth and goblet cells, respectively. G-H summarizes data of the number of Paneth cells/crypt (G), and the number of goblet cells/villus (H). Results were compared by one way ANOVA and Tukey post-hoc test. Values are expressed as mean \pm SEM; *P<0.01 vs. WKY; **P<0.001 vs. WKY; + P<0.01 vs. SHR. Boxes in A-C indicate digitally enlarged Paneth cells at a higher magnification. Boxes within D-F indicate the enumerated goblet cells within each villus. Scale 250 μ m.

3.3. Morphological changes in gut epithelial barrier during hypertension are rescued by kefir treatment

The effects of kefir treatment on tunica muscularis thickness (**Fig. 3A-C**) and average villus length (**Fig. 3D-F**) were analyzed within the small intestine. The thickness of the tunica muscularis was increased in SHRs ($58.72 \pm 2.34 \mu\text{m}$) compared to WKY ($43.92 \pm 1.53 \mu\text{m}$), and this alteration was reversed by kefir treatment ($48.75 \pm 0.85 \mu\text{m}$).

No differences were observed in villus length between groups (WKY: $231.7 \pm 16.15 \mu\text{m}$; SHR: $212.6 \pm 13.52 \mu\text{m}$; SHR-Kefir group: $240.0 \pm 15.16 \mu\text{m}$).

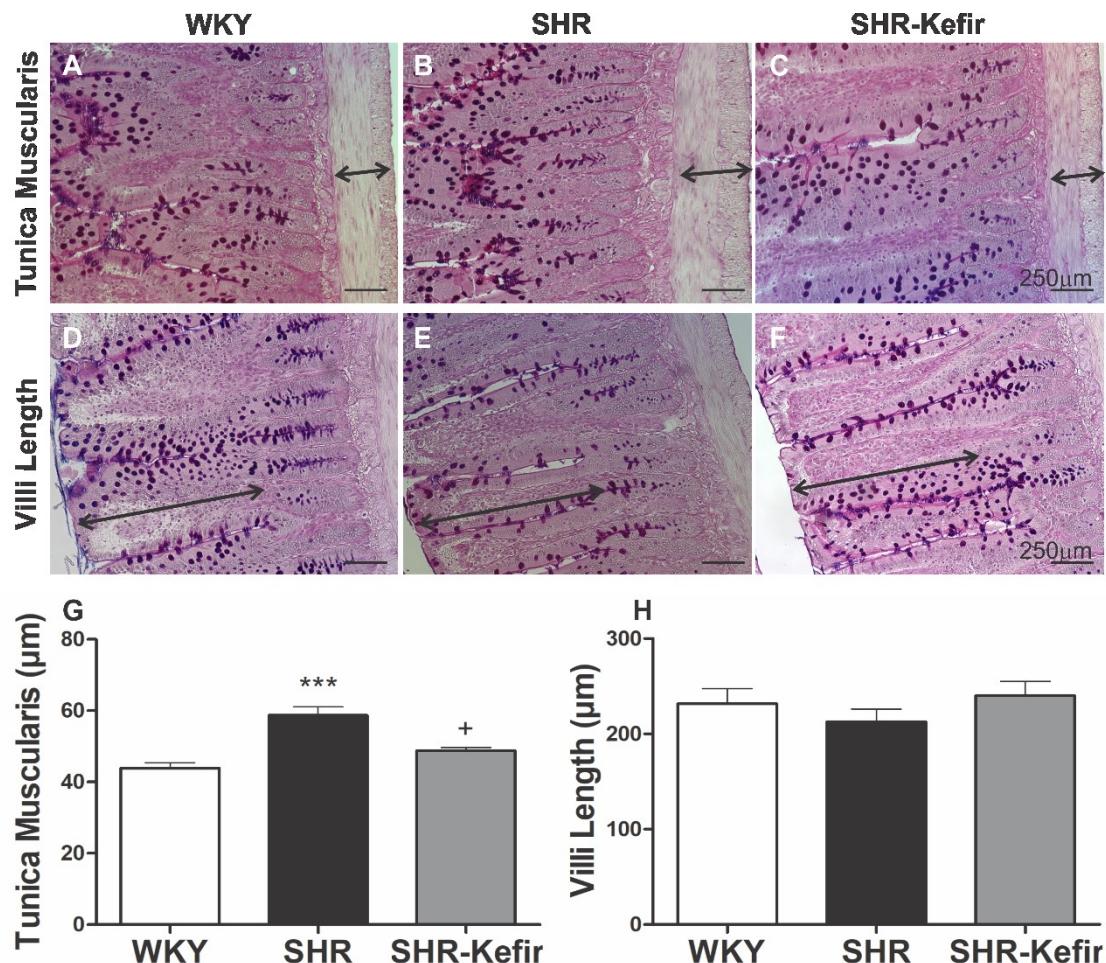


Fig. 3. Kefir treatment rescues morphological changes in the Tunica Muscularis of hypertensive animals. Cross sections of the small intestine of normotensive WKY (n=6), Spontaneously Hypertensive rats (SHR; n=6), and hypertensive rats treated with kefir (SHR-Kefir; n=4) were stained with Alcian blue/Periodic Acid-Schiff (PAS) and hematoxylin to analyze Tunica Muscularis Thickness (A-C) and Villi Length (D-F). Graphs G-H summarize tunica muscularis thickness data (G), and villi length (H). Results were compared by one way ANOVA and Tukey post-hoc test. Values are expressed as mean \pm SEM; ***P<0.0001 vs. WKY; +P<0.01 vs. SHR. Arrows in A-C indicate the measured thickness of the Tunica Muscularis. Arrows in D-F specify the length of each villus.

3.4. Elevated serum endotoxin levels in SHRs are reversed by kefir treatment

Blood serum LPS concentrations were increased in SHRs ($0.71 \pm 0.04 \text{ EU/mL}$) as compared to WKY ($0.54 \pm 0.07 \text{ EU/mL}$). Normalized LPS levels were found in the SHR-Kefir group ($0.54 \pm 0.02 \text{ EU/mL}$) (Fig. 4).

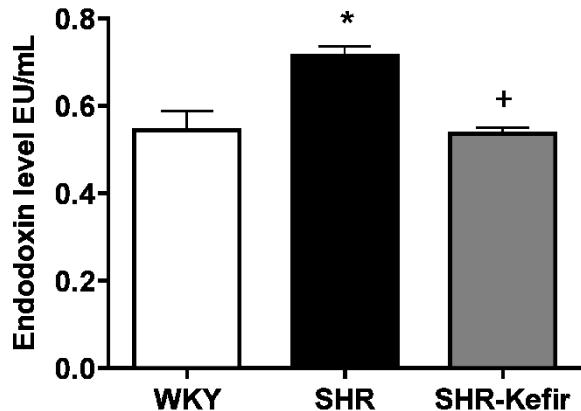


Fig. 4. Elevated serum endotoxin levels in spontaneously hypertensive rats (SHR) are reversed by kefir treatment. Concentration of LPS in serum of normotensive WKY (n=3), SHR (n=4), and hypertensive animals treated with kefir (SHR-Kefir; n=3). The endotoxin level was normalized with kefir treatment. Results were compared by one way ANOVA and Tukey post-hoc test. Values are expressed as mean \pm SEM; *P<0.01 vs. WKY; + P<0.01 vs. SHR.

3.5. Neuroinflammation present in SHR is prevented by the use of probiotics

Alterations in microglial morphology were used to assess activation, such that reduced branching complexity, relative to that observed in WKYs, was indicative of microglial de-ramification towards an activated phenotype (Fig. 5A-C). Compared to WKYs, SHR microglia morphology presented decreased branch length (PVN: -45.6 \pm 3.5%; RVLM: -39 \pm 4.2%), and total endpoints (PVN: -44.5 \pm 3.2%; RVLM: -42.6 \pm 2.9%). Kefir treatment normalized microglia morphology in the PVN (branch length: -18.6 \pm 7.4%; end-points: -6.6 \pm 7.2%) and RVLM (branch length: -2.9 \pm 6.9%; end-points: 13.2 \pm 6.2%) of SHRs (Fig. 5D-G), suggesting a potential role for kefir in diminishing neuroinflammation during hypertension.

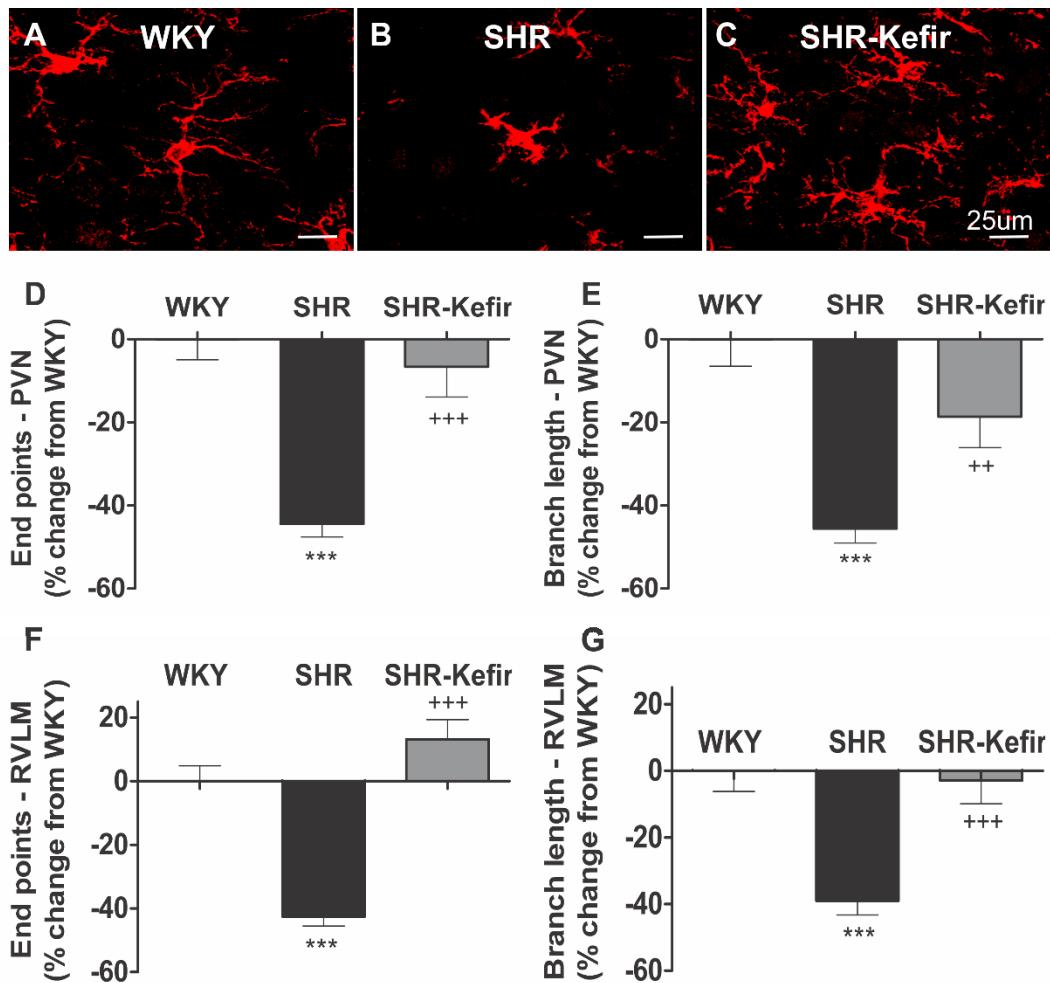


Fig. 5. Kefir prevents microglia activation within the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and rostral ventrolateral medulla (RVLM) in spontaneously hypertensive rats (SHR). A-C confocal images of microglia (IBA1) in normotensive WKY (n=5), SHR (n=5), and hypertensive animals treated with kefir (SHR-Kefir; n=5). D-G summary data showing a decrease of endpoints (D, F), and branch length (E, G) in the microglia within the PVN and RVLM of SHR treated with kefir. Results were compared by one way ANOVA and Tukey post hoc test. Values are expressed as mean \pm SEM ***P<0.0001 vs. WKY; +++P<0.0001 vs. SHR. Scale bar: 25 μ m.

4. Discussion

Our findings demonstrate that kefir treatment (1) improves small intestine functionality via normalization of the Paneth cell population and tunica muscularis thickness, (2) restores circulating serum endotoxin levels, and (3) reduces microglial activation in the PVN and RVLM. These results suggest that the anti-hypertensive effects of kefir are both peripherally- and centrally-mediated.

Kefir is representative of multiple strains of probiotics containing a complex, symbiotic mixture of more than 50 species of microorganism (Kim, Kim et al. 2017). Several studies, including our own, have demonstrated that the kefir probiotic decreases BP in SHR animals (Friques, Arpini et al. 2015, Klippel, Duemke et al. 2016, Brasil, Silva-Cutini et al. 2018, Silva-Cutini, Almeida et al. 2019). However, the underlying mechanisms of such effects have not been completely elucidated.

Evidence indicates a strong role for gut dysbiosis in the pathophysiology of hypertension, both in animal models (Yang, Santisteban et al. 2015, Santisteban, Qi et al. 2017) and in hypertensive patients (Kim, Goel et al. 2018). Additionally, an association is shown between hypertension and increased inflammation within cardioregulatory brain centers, driven by microglia cell activation (Shi, Diez-Freire et al. 2010, Santisteban, Kim et al. 2016, Takesue, Kishi et al. 2017). Based on these observations, we hypothesized that kefir treatment would ameliorate the deleterious alterations in gastrointestinal morphology, diminish neuroinflammation, and, ultimately, lower blood pressure in hypertensive animals.

Previous data have shown that pathophysiological alterations in the gut are age-dependent in the SHR model (Santisteban, Qi et al. 2017). Consistent with previous data, we found that SHRs with established levels of high blood pressure exhibited thinning of the intestinal tunica muscularis (Santisteban, Qi et al. 2017), and a reduction in small intestine goblet cell populations (Santisteban, Ahmari et al. 2015) when compared to WKY. Furthermore, we found a diminished number of Paneth cells in SHRs. Whereas kefir treatment did not improve the number of goblet cells in SHRs, both the thickness of the tunica muscularis and the number of Paneth cells were normalized in kefir-treated animals, reflecting improvements in morphological and functional aspects of the intestinal barrier.

Located at the base of the crypts of Lieberkühn, Paneth cells are specialized epithelial cells of the small intestine responsible for the secretion of diverse antimicrobial peptides that neutralize microbial products, such as LPS (Cazorla, Maldonado-Galdeano et al. 2018). In agreement with our data, administration of oral probiotics is shown to increase the number of Paneth cells with a consequent increase in ex vivo microbicide activity in the small intestine of mice (Cazorla, Maldonado-Galdeano et al. 2018).

In addition to a decreased number of Paneth cells, we found an increase in serum LPS in SHR animals. LPS is an immunogenic product resulting from the degradation of gram-negative bacterial membranes. LPS is used as a biomarker for gut epithelial health (Kim, Goel et al. 2018), given that the whole bacteria are not able to surpass intestinal cells (Galdeano and Perdigon 2004). Concurrent with the improvement of the morphology of the epithelial barrier, and the number of Paneth cells, kefir probiotic decreased circulating endotoxin in SHRs, suggesting an overall beneficial effect of kefir in gut morphophysiology during hypertension.

Systemic LPS is also able to cause chronic neuroinflammation in mice by mechanisms that involve tumor necrosis factor (TNF)- α receptors, microglia activation, and increased expression of brain inflammatory factors (Qin, Wu et al. 2007). Within the brain, the PVN and RVLM are key integrative centers for cardiovascular control (Gabor and Leenen 2012, Koba, Hanai et al. 2018). During hypertension, an association between Angiotensin II (AngII), microglia activation, and concomitant increase in sympathetic activity has been shown within the PVN of hypertensive animals (Shen, Li et al. 2015). Moreover, long-term systemic LPS-induced inflammation activates microglia and increases pro-inflammatory cytokines in the RVLM during neurogenic hypertension (Wu, Chan et al. 2012). Indeed, microglia, the innate immune cells of the brain, are among the primary mediators of neuroinflammation. Classically activated (M1 state) microglia exhibit morphological alterations towards an amoeboid form characterized by an enlarged cell soma and shortened processes (Kreutzberg 1996, Morrison and Filosa 2013, Takesue, Kishi et al. 2017). Consistent with previous reports, we found a decrease in microglial branch length and endpoints in the PVN and RVLM of SHRs, reflecting enhanced microglia activation. Kefir treatment normalized microglia morphology in both nuclei, suggesting that kefir diminished neuroinflammation during hypertension.

Plausible explanations for the effects of kefir over microglia activation is kefir's ability to improve gut pathology, with a consequent decrease in LPS, but also its ability to modulate the renin-angiotensin system. Our group has demonstrated that the soluble fraction of kefir, rich in active peptides, has inhibitory effects of the angiotensin-converting enzyme (ACE) (Brasil, Silva-Cutini et al. 2018). Additionally, Amorim and

collaborators have identified a list of thirty-five peptides from kefir with potential antihypertensive activity due to ACE inhibition (Amorim, Coitinho et al. 2019).

As for the association of microglia activation and increase in sympathetic activity during hypertension, we have previously shown that kefir diminishes tyrosine hydroxylase (TH) protein levels (a marker of sympathetic activity) within the PVN and RVLM (Silva-Cutini, Almeida et al. 2019) and that the soluble fraction of kefir improves baroreflex sensitivity (Brasil, Silva-Cutini et al. 2018).

Together, our results suggest that mechanisms by which kefir reduces BP may involve a decrease in neuroinflammation, via lowered circulating endotoxins, inhibition of Ang II activity, and an overall dampening of sympathetic activity.

In conclusion, our data indicate that long-term treatment with the probiotic kefir is beneficial in the management of hypertension by mechanisms that involve communication between the gut and brain, suggesting that kefir may help in the adjunct treatment of hypertension

Funding sources

This work was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES; Finance Code 001 and CAPES - PDSE 88881.133261/2016-01 to MAS), and Auburn University Start-Up funds to VCB. TUA receives a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: grant number 311925/2018-9).

Declaration of interest

None

Acknowledgments

The authors are thankful to Dr. Iryna Sorokulova, Ludmila Globa, and Dr. Henri Alexandre GiblotDucray, from the Department of Anatomy, Physiology, and Pharmacology; Auburn University, AL, for their excellent technical assistance.

References

- [1] Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2018;137:e67-e492.
- [2] Mell B, Jala VR, Mathew AV, Byun J, Waghulde H, Zhang Y, et al. Evidence for a link between gut microbiota and hypertension in the Dahl rat. *Physiological genomics*. 2015;47:187-97.
- [3] Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Carvajal JM, et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*. 2015;65:1331-40.
- [4] Yang T, Aquino V, Lobaton GO, Li H, Colon-Perez L, Goel R, et al. Sustained Captopril-Induced Reduction in Blood Pressure Is Associated With Alterations in Gut-Brain Axis in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Journal of the American Heart Association*. 2019;8:e010721.
- [5] Khalesi S, Sun J, Buys N, Jayasinghe R. Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension*. 2014;64:897-903.
- [6] Ahmed Z, Wang Y, Ahmad A, Khan ST, Nisa M, Ahmad H, et al. Kefir and health: a contemporary perspective. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;53:422-34.
- [7] Friques AG, Arpini CM, Kalil IC, Gava AL, Leal MA, Porto ML, et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of translational medicine*. 2015;13:390.
- [8] Klippen BF, Duemke LB, Leal MA, Friques AG, Dantas EM, Dalvi RF, et al. Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Frontiers in physiology*. 2016;7:211.
- [9] Santisteban MM, Qi Y, Zubcevic J, Kim S, Yang T, Shenoy V, et al. Hypertension-Linked Pathophysiological Alterations in the Gut. *Circulation research*. 2017;120:312-23.
- [10] Allen AM. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension*. 2002;39:275-80.
- [11] Guyenet PG, Stornetta RL, Holloway BB, Souza G, Abbott SBG. Rostral Ventrolateral Medulla and Hypertension. *Hypertension*. 2018;72:559-66.
- [12] Shi P, Diez-Freire C, Jun JY, Qi Y, Katovich MJ, Li Q, et al. Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension. *Hypertension*. 2010;56:297-303.

- [13] Santisteban MM, Ahmari N, Carvajal JM, Zingler MB, Qi Y, Kim S, et al. Involvement of bone marrow cells and neuroinflammation in hypertension. *Circulation research*. 2015;117:178-91.
- [14] Sharma RK, Yang T, Oliveira AC, Lobaton GO, Aquino V, Kim S, et al. Microglial Cells Impact Gut Microbiota and Gut Pathology in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Circulation research*. 2019.
- [15] Brasil GA, Silva-Cutini MA, Moraes FSA, Pereira TMC, Vasquez EC, Lenz D, et al. The benefits of soluble non-bacterial fraction of kefir on blood pressure and cardiac hypertrophy in hypertensive rats are mediated by an increase in baroreflex sensitivity and decrease in angiotensin-converting enzyme activity. *Nutrition*. 2018;51-52:66-72.
- [16] Giblot Ducray HA, Globa L, Pustovyy O, Reeves S, Robinson L, Vodyanoy V, et al. Mitigation of heat stress-related complications by a yeast fermentate product. *J Therm Biol*. 2016;60:26-32.
- [17] Gill GW, Frost JK, Miller KA. A new formula for a half-oxidized hematoxylin solution that neither overstains nor requires differentiation. *Acta cytologica*. 1974;18:300-11.
- [18] Di Sabatino A, Miceli E, Dhaliwal W, Biancheri P, Salerno R, Cantoro L, et al. Distribution, proliferation, and function of Paneth cells in uncomplicated and complicated adult celiac disease. *Am J Clin Pathol*. 2008;130:34-42.
- [19] Cazorla SI, Maldonado-Galdeano C, Weill R, De Paula J, Perdigon GDV. Oral Administration of Probiotics Increases Paneth Cells and Intestinal Antimicrobial Activity. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:736.
- [20] Morrison HW, Filosa JA. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation*. 2013;10:4.
- [21] Kim DH, Kim H, Jeong D, Kang IB, Chon JW, Kim HS, et al. Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2017;44:35-43.
- [22] Silva-Cutini MA, Almeida SA, Nascimento AM, Abreu GR, Bissoli NS, Lenz D, et al. Long-term treatment with kefir probiotics ameliorates cardiac function in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2019;66:79-85.

- [23] Kim S, Goel R, Kumar A, Qi Y, Lobaton G, Hosaka K, et al. Imbalance of gut microbiome and intestinal epithelial barrier dysfunction in patients with high blood pressure. *Clinical science*. 2018;132:701-18.
- [24] Santisteban MM, Kim S, Pepine CJ, Raizada MK. Brain-Gut-Bone Marrow Axis: Implications for Hypertension and Related Therapeutics. *Circulation research*. 2016;118:1327-36.
- [25] Takesue K, Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K. Activation of microglia within paraventricular nucleus of hypothalamus is NOT involved in maintenance of established hypertension. *Journal of cardiology*. 2017;69:84-8.
- [26] Galdeano CM, Perdigon G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *Journal of applied microbiology*. 2004;97:673-81.
- [27] Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007;55:453-62.
- [28] Koba S, Hanai E, Kumada N, Kataoka N, Nakamura K, Watanabe T. Sympathoexcitation by hypothalamic paraventricular nucleus neurons projecting to the rostral ventrolateral medulla. *The Journal of physiology*. 2018;596:4581-95.
- [29] Gabor A, Leenen FH. Central neuromodulatory pathways regulating sympathetic activity in hypertension. *Journal of applied physiology*. 2012;113:1294-303.
- [30] Shen XZ, Li Y, Li L, Shah KH, Bernstein KE, Lyden P, et al. Microglia participate in neurogenic regulation of hypertension. *Hypertension*. 2015;66:309-16.
- [31] Wu KL, Chan SH, Chan JY. Neuroinflammation and oxidative stress in rostral ventrolateral medulla contribute to neurogenic hypertension induced by systemic inflammation. *J Neuroinflammation*. 2012;9:212.
- [32] Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19:312-8.
- [33] Amorim FG, Coitinho LB, Dias AT, Friques AGF, Monteiro BL, Rezende LCD, et al. Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. *Food chemistry*. 2019;282:109-19.

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

No intestino o kefir foi capaz de normalizar células epiteliais de Paneth e a espessura da tunica muscular do intestino delgado (jejuno). Acredita-se que a melhoria da barreira intestinal durante o tratamento com kefir foi a responsável pela redução de endotoxina (LPS) plasmática desses animais.

No cérebro o kefir reduziu a ativação de microglia (células residentes do sistema imunológico localizadas no cérebro) sugerindo uma redução da neuroinflamação e também a atividade simpática em centros cardioregulatórios localizados no cérebro (PVN e RVLM). Trabalhos anteriores já demonstraram que o LPS plasmático aumentado é capaz de ativar a microglia. Assim, a redução de LPS pode ter colaborado para a redução da neuroinflamação observada. A neuroinflamação, por sua vez, está diretamente associada ao aumento da atividade simpática.

No coração, a redução da hiperatividade simpática pode ter colaborado para redução da hipertrofia cardíaca e consequente melhora da função cardíaca.

Analisados em conjunto nossos resultados indicam que existe uma relação entre a barreira intestinal, a ativação da microglia hipotalâmica (PVN) e bulbar (RVLM) e a atividade da TH nesses núcleos; parâmetros esses que estão alterados na hipertensão. Os efeitos benéficos sobre esses locais induzidos pelo tratamento com Kefir, ajudam a explicar provável redução da atividade simpática periférica, com melhoria da contratilidade cardíaca e proteínas relacionadas com a mobilização de cálcio no coração. Essas ações em conjunto contribuem para a redução da pressão arterial nos animais hipertensos.

APÊNDICE

METODOLOGIA DETALHADA

Capítulo 1

1. Grupos experimentais

Ratos Wistar Kyoto (WKYs) normotensos, machos, de oito semanas de idade, e ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) foram obtidos da unidade de criação na Universidade Vila Velha (UVV), Brasil. Os ratos foram alojados em salas com controle de temperatura ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($50 \pm 5\%$) e iluminação (12 h dia/12h noite). A ração padrão (Purina Labina, SP-Brasil) e a água foram estiveram disponíveis em todos os momentos. Todos os protocolos animais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados com Animais (CEUA-UVV, Protocolo nº 2016-405), e todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes para o cuidado e uso de animais de laboratório, conforme recomendado pelos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) (National Research Council 2011).

Os animais foram separados em três grupos ($n = 10$ animais cada): grupo controle WKY tratado com veículo (leite integral); Grupo SHR tratado com veículo; Grupo SHR-Kefir tratado com leite fermentado por grãos de kefir. Os animais foram tratados diariamente por gavagem oral durante um período de nove semanas a uma dose de 0,3 mL/100 g de peso corporal. A dose e o período de tratamento baseiam-se em trabalhos anteriores, mostrando que 8 semanas de tratamento com kefir promovem a diminuição da pressão arterial em SHRs (Klippen, Duemke et al. 2016). O grupo experimental usado para estudos de tirosina hidroxilase (TH) foi realizado na Universidade de Auburn, AL, EUA, e todas as diretrizes animais foram seguidas da mesma forma.

2. Preparo do Kefir

Os grãos de kefir (gentilmente cedidos pela Dra. Célia Lucia de Luces Fortes Ferreira da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil) foram adicionados ao leite

integral pasteurizado em uma proporção de 5% (p/v) e mantidos à temperatura ambiente (23 °C). Após 24h, esta mistura foi filtrada através de um peneira de plástico e o produto filtrado foi refrigerado (4 °C) para permitir o crescimento de leveduras durante 24hs (Friques, Arpini et al. 2015). Após a conclusão deste processo, o kefir estava totalmente preparado para administração. Bebidas de kefir foram preparadas diariamente.

3. Medidas de pressão arterial e frequência cardíaca

Para dividir aleatoriamente os animais nos grupos experimentais, os níveis de pressão arterial basal em todos os grupos foram adquiridos indiretamente antes do início do tratamento utilizando um manômetro de manguito de cauda (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, EUA). Os animais foram colocados dentro de uma câmara de aquecimento (aproximadamente 34 °C) por 30 min antes das aquisições da MAP. Um mínimo de três medições por animal foi adquirido para garantir níveis basais consistentes de PAM.

Após o tratamento dos animais, a fim de avaliar a pressão arterial média e frequência cardíaca, foi realizada a cateterização da artéria e veia femorais. Previamente, os animais foram anestesiados com Quetamina e Xilasina (100/10 mg/kg; I.P.) e uma incisão na região inguinal foi realizada para o isolamento do plexo vaso-nervoso, possibilitando a cateterização da artéria e veia femoral, respectivamente, utilizando cateteres de polietileno (PE10 acoplado à PE50, Clay Adans, USA). Os cateteres foram mantidos preenchidos com solução salina (NaCl 0,9%) e ocluídas com pinos de aço inoxidável. Em seguida, foi realizada uma perfusão com sal fisiológico gasoso (5% CO₂ em 95% O₂) aquecido (37 °C) seguida de uma solução composta por: NaCl 130 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂.2H₂O 1,6 mM, MgSO₄.6H₂O 1,17 mM, NaHCO₃ 14,9 mM, KH₂PO₄ 1,18 mM, EDTA 0,026 mM e glicose 11,1 mM, pH 7,4. A perfusão foi mantida a uma taxa constante de 4 mL/min com o auxílio de uma bomba de perfusão. A pressão de perfusão foi registrada por meio de um transdutor de pressão acoplado a um MP-100 System Guide MP100-CE; Biopac Systems, Santa Bárbara, CA, EUA (Franquini, do Nascimento et al. 2013).

4. Parâmetros hemodinâmicos

A pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) e a função do ventrículo esquerdo (VE) dos ratos foram avaliadas após as medidas de PAM e FC. Para isso, o cateter foi avançado para o ventrículo esquerdo. Após 15 min adicionais de medições no nível basal, os parâmetros funcionais foram medidos como LV +dP/dtmax, que é a taxa máxima de aumento da pressão ventricular, ou o valor de pico positivo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda, bem como o taxa de queda de pressão (-dP/dtmin) e a constante de tempo de relaxamento isovolumétrico de LV (Tau). O sinal foi expresso em mmHg/s. Após esse procedimento, o cateter foi retirado do VE e a PAM foi novamente medida para determinar se havia ocorrido dano na válvula aórtica. Animais com diminuição da pressão arterial diastólica maior que 10 mmHg indicariam danos na valva aórtica. Nenhum animal sofreu danos na valva aórtica em nossos estudos. Os dados foram analisados utilizando o software LabChart, versão 7 (AD Instruments, Castle Hill, Austrália)(Wang, Ren et al. 2003, Nascimento, Lima et al. 2016).

5. Hipertrofia cardíaca

Os corações foram removidos após medidas hemodinâmicas, limpos com solução salina e pesados. O ventrículo esquerdo, incluindo o septo interventricular, foi separado. O peso do ventrículo esquerdo foi obtido e a razão do peso do ventrículo esquerdo pelo o peso corporal foi usada como um índice de hipertrofia cardíaca (Biancardi, Stranahan et al. 2016).

6. Análise de Western blot

Western blots foram realizados para determinar as proteínas fosfolambam (PLB), fosfotreonina 17-fosfolambam (p-PLB) e retículo sarcoplasmático de Ca²⁺-ATPase (SERCA2a) (Nascimento, Lima et al. 2016). Proteínas totais contidas no tecido do ventrículo esquerdo foram isoladas e medidas pelo método de Bradford.

O método de bradford (bradford, 1976) é uma tecnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “ Coomassie brillant blue” BG-250. Este

método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniónica, que absorve fortemente em 505 nm(Compton and Jones 1985). O homogenato para quantificação de proteínas foi preparado a partir de 200mg de tecido do VE em 1mL de PBS. Após homogeneização o mesmo foi centrifugado por 10 min a 3500rpm a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas foi retirado e as amostras das proteínas do VE foram diluídas 1:30 em PBS. Para realização da curva de calibração de proteínas 1mg de albumina foi diluída em 1 mL de água deionizada, albumina foi utilizada nas concentrações 10%, 20%, 40%, 80% e 100%. As amostras, o branco bem como a curva foi realizada em triplicata adicionando 5 µL de cada das amostras, branco (água deionizada) e proteínas nas diferentes concentrações numa placa de 96 poços, em seguida 250 µL da solução de bradford (fotossensível) foram adicionados aos poços. A leitura da placa foi realizada a 595 nm e a média das amostras foi utilizada. A curva de calibração de proteínas foi considerada ideal quando $r^2 \geq 0,95$.

Após quantificação das proteínas, volume contendo 50 µg de proteínas foram completados para 10 µL com tampão de homogeneização e em seguida adicionados 10µL de Laemmli. As amostras foram separadas por eletroforese em SDSPAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose (Millipore, MA, EUA) usando corrente de amperagem de 0,25 A. Após incubação com solução de bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos como segue: anti-PLB (1: 1000, Abcam, Cambridge, MA, EUA), anti-p-PLB (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) e anti-SERCA2a (1: 2500, Abcam, Cambridge, MA, EUA) por 16 hs. O anticorpo primário anti-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (1: 3000, Santa Cruz Biotecnologia, Santa Cruz, CA, EUA) foi utilizado como controle endógeno. A ligação do anticorpo primário foi detectada com o uso de anticorpos secundários conjugados com peroxidase de rábano por 1hs (HRP) [1: 15.000]: IgG anti-cabra (Millipore, Bedford, EUA), IgG anti-coelho (Millipore, Bedford, EUA) e anti - mouse IgG (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As bandas imunorreativas foram detectadas com uma reação de quimiluminescência (Luminata HRP Substrate-Millipore) seguida de análise densitométrica usando o software ImageJ, versão 1.48

(National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Níveis de expressão de GAPDH foram usados para normalizar a expressão proteica.

7. Análise de imunofluorescência cerebral

Outro grupo de ratos foi perfundido transcardialmente com 0,01 mol/L de salina tamponada com fosfato (PBS) (150 mL) e 4% de PFA (350 mL). Cérebros foram postfixed por 3h em 4% paraformaldeído (PFA) seguido de crioproteção em PBS contendo sacarose 30% por três dias a 4 °C. Seções de 30 µm contendo o PVN e 40 µm contendo o RVLM foram obtidas utilizando criostato. As regiões do cérebro foram identificadas com ajuda de um atlas cerebral anatômico. As fatias contendo o PVN e o RVLM foram pré-incubadas em soro bloqueador de burro a 10% durante 1h, seguido de incubação durante a noite em anticorpo primário de tirosina hidroxilase (anticorpo monoclonal anti-rato TH, 1:250, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Dentro do PVN, um marcador de vasopressina (VP anti-anticorpo policlonal de cobaia, 1:10.000, Peninsula Laboratories International, CA, EUA) foi adicionado ao coquetel e usado como um marcador anatômico. A imunofluorescência foi conseguida pela utilização de uma reacção secundária com Alexa Fluor 488 anti-murganho e Alexa Fluor 647 anti-cobaia, respectivamente (todos os anticorpos secundários utilizados foram diluídos 1: 250, Jackson Immuno Research, PA, USA). A densidade de TH no PVN e RVLM foi avaliada como um indicador da atividade simpática. O controle de absorção de anticorpos primários foi utilizado para indicar sítios de ligação de anticorpos específicos.

Imagem confocal

A imunofluorescência foi examinada com um microscópio invertido Nikon Eclipse TE2000-E acoplado a um microscópio confocal a laser Nikon A1. Imagens de planos focais ópticos consecutivos foram obtidas (seções PVN 30 µm: 20-30 imagens, intervalos de 1 µm; seções RVLM 40 µm: imagens 30-40, intervalos de 1 µm), e uma unica imagem de projeção das seções foi gerada . Cada canal foi adquirido sequencialmente para minimizar os artefatos de cruzamento entre os canais. A densidade de TH foi medida usando o software ImageJ.

Análise estatística

Os valores foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Os testes de normalidade de D'Agostino-Pearson e Kolmogorov-Smirnov foram usados para verificar se as variáveis tinham uma distribuição normal (Gaussiana). As comparações estatísticas entre as médias paramétricas dos diferentes grupos foram realizadas por análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste post hoc de Tukey. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® versão 6.7.

Capítulo 2

1. Animais e grupos experimentais

Ratos Wistar Kyoto (WKY) machos com oito semanas de idade e ratos SHR (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, EUA) foram mantidos na unidade de cuidados com animais da Universidade Auburn em Auburn, AL, EUA. Os ratos foram alojados em temperatura (20-26 ° C), umidade (30-70%) e luz (12 h dia / 12 h noite) quartos controlados com comida de rato padrão e água livremente disponíveis em todos os momentos. O Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da Universidade de Auburn aprovou todos os protocolos e procedimentos experimentais em animais (2017-3055). Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais ($n = 9/\text{grupo}$): 1) controle WKY tratado com veículo (leite integral; 3,25% de gordura do leite), 2) controle SHR tratado com veículo e 3) SHR-Kefir tratado com kefir bebida.

2. Fermentação do Kefir

A bebida de kefir foi preparada diariamente ao longo do período de tratamento de nove semanas. Os grãos de kefir foram adicionados ao leite integral pasteurizado em uma proporção de 5% (w/v) e mantidos à temperatura ambiente (23 °C). Após 24 hs, utilizou-se uma peneira de plástico para filtrar a mistura e o produto filtrado foi

refrigerado (4 °C) durante 24 hs para permitir o crescimento de levedura (Friques, Arpini et al. 2015). O kefir resultante foi administrado por gavagem oral (0,3 mL/100g de peso corporal). Os grãos de kefir foram gentilmente doados pelo Dr. Ferreira da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

3. Medida da pressão arterial

As medições não invasivas da PA foram realizadas com um sistema de manguito de cauda com registro de pressão de volume para ratos, de acordo com o protocolo do fabricante (CODA-6; Kent Scientific Corporation, CT, EUA). Os animais foram aclimatados ao suporte e aos punhos durante três dias consecutivos antes das medições da PA basal. Durante o período de tratamento, as medidas da PA foram realizadas semanalmente e consistiram em cinco ciclos de aclimatação, seguidos de vinte medidas consecutivas da PA. Uma média das medidas consecutivas da PA para cada grupo foi usada para análise estatística.

4. Ensaio de lipopolissacarídeo (LPS)

O sangue dos animais foi imediatamente coletado em tubos estéreis, livres de pirogênio e incubado por 30 min a 4 °C. Em seguida o sangue foi centrifugado a 7000 g durante 10 min a 23 °C. O soro foi coletado e armazenado a -20 °C até o uso. As concentrações sericas de LPS foram analisadas por um modo de detecção colorimétrica (leitor de microplacas, Espectrofotômetro) utilizando o Kit de Quantificação de Endotoxina Cromogica de Lisado de Amebito (LAL) PierceTM Limulus (CAT: 88282; Thermo Scientific, Rockford, IL), de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente as amostras de soro foram diluídas em quatro vezes em água livre de endotoxinas.

A solução estoque do padrão de endotoxina contendo aproximadamente 15-40 EU de endotoxina de *E. Coli* liofilizado foi diluída em 1 mL de água livre de endotoxinas. Misturar a solução por 15 min antes do uso com ajuda de um vórtex. Concentrações

finais de 1EU/mL, 0,5 EU/mL 0,25EU/mL e 0,1 EU/mL foram preparadas para construção da curva padrão de endotoxinas.

Solução lisado de amebócito limulus (LAL) contendo o lisado liofilizado foi reconstituído em 1,4 mL de água livre de endotoxinas e protegido da luz e refrigerado a 2-8°C.

Solução contendo substrato cromogênico contendo aproximadamente 7 mg de substrato liofilizado foi reconstituído em 6,5 mL de água livre de endotoxinas, obtendo-se então uma solução de aproximadamente 2 mM. A solução preparada foi armazenada a 2-8°C e protegida da luz.

Após a diluição dos reagentes e antes do preparo da placa, a mesma foi aquecida a 37°C por 10 min. Para preparo da curva padrão de endotoxinas, 50µL das diluições já preparadas (1EU/mL, 0,5 EU/mL 0,25EU/mL e 0,1 EU/mL) foram adicionadas à placa. Em seguida 50 µL das amostras de soro diluídas foram adicionadas à placa. Para o branco, 50 µL de água livre de endotoxinas foi usada. A placa foi então tampada e armazenada a 37°C por 5 min.

Após 5 min 50 µL da solução LAL preparada foi adicionada em cada poço. A placa foi tampada e homogeneizada gentilmente em um agitador de placa por 10 segundos. Logo após a placa foi mantida a 37° por 10 min. Depois dos 10 minutos, 100 µL da solução de substrato foi adicionada em cada poço. A placa foi então tampada e homogeneizada gentilmente em um agitador de placas por 10 segundos. A placa foi encubada a 37°C por mais 6 minutos. Por fim, 50 µL de solução de parada da reação (25% de ácido acético) foi adicionada em cada poço e a placa foi gentilmente homogeneizada em um agitador de placas por 10 segundos. A absorbância foi lida em um comprimento de onde de 405-410nm.

A média das absorbâncias do branco e da curva padrão foram utilizadas. A curva foi considerada otima quando $r^2 \geq 0,98$. A equação da reta foi usada para calcular a concentração de cada amostra de soro.

5. Análises histológicas

Após a retirada do intestino delgado, amostras da região do jejuno medindo 0,5 a 2 cm de comprimento foram imediatamente fixadas em solução de Bouin (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) por 10 a 15 min. Em seguida, as amostras foram cortadas em tamanho menores (5 a 7 mm de comprimento) para garantir que todo tecido estivesse submerso, para isso o agente fixador foi utilizado 20-30 vezes o volume do tecido. Após 48 hs de fixação a temperatura ambiente, o excesso de fixador foi lavado com álcool 70% até a maior parte da cor amarela fosse removida.

As amostras lavadas com álcool foram então colocadas em cassetes (VWR, Radnor, PA, EUA) e mantidas em álcool a 70% até o processamento no processador de tecidos (Tissue-Tek VIP, Miles / Sakura, Torrance, CA, EUA). Após o processamento, as amostras foram embebidas em blocos de parafina (Tissue-Tek TEC, Sakura, Torrance, CA, EUA). O tecido incorporado na parafina foi seccionado a 6 mm utilizando o microtomo (Reichert-Jung 2040 Autocut, Leica Biosystems NusslochGmbH, Heidelberger Straße 17-19, 69226 Nussloch, Alemanha).

Em seguida, os cortes foram desparafinados sem alterações, para posterior coloração, usando Hemo-De por três vezes (8 min, 5 min e 5 min), em ETOH 100% por duas vezes por 2 min cada, e em seguida com ETOH 95% por duas vezes por 2 min cada e por fim com ETOH 80% por 2 minutos.

O número de células caliciformes/vilosidades, o comprimento das vilosidades e a espessura da túnica muscular foram medidos usando o software ImageJ (NIH; <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

Coloração de células caliciformes (goblet) e avaliação morfológica

As secções foram coradas com azul de Alcian/Ácido Periódico de Schiff (PSA) (cora em roxo o muco no interior das células caliciformes), contrastadas com hematoxilina (secções previamente tratadas com hematoxilina (1 minuto), 0,5% phloxine em cloreto de cálcio aquoso a 0,5% (20 minutos)) e diferenciadas com álcool ácidificado antes da desidratação, depuração e montagem (Gill, Frost et al. 1974) . Após a coloração, os cortes foram colocados em ETOH 70% por 2min, ETOH 95% duas vezes por 2 min cada, ETOH 100% duas vezes por 2 min cada, Hemo-De 2 vezes até clarear (5 min, 10 min ou mais). A montagem das amostras foi realizada utilizando Meio de

Montagem Eukitt (ElectronMicroscopy Sciences, Hatfield, PA) e as imagens foram realizadas em ampliação de 20x. A quantificação da células caliciformes de cada secção histológica foi realizada em áreas onde as vilosidades não foram dobradas ou sobrepostas.

Células de Paneth

As secções foram tratadas com hematoxilina (1 minuto), 0,5% phloxine em cloreto de cálcio aquoso a 0,5% (20 minutos), e a diferenciação de células de Paneth foi realizada com uma solução saturada de phloxine-tartrazina em solução Cello (Biocompare, São Francisco, CA) seguida de uma breve lavagem com etanol absoluto e desidratação com xileno (Di Sabatino, Miceli et al. 2008). Com esta técnica, os grânulos Paneth mancham vermelho brilhante. Para coloração com nitrito de p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB), foram colocados em solução a 5% DMAB (Sigma-Aldrich, Poole, Inglaterra) por 1 minuto, transferido para solução de nitrito de sódio 1% por 1 minuto, e depois lavado com água da torneira e álcool ácido. O método DMABnitrite dá uma coloração azul intensa do citoplasma dependendo do alto teor de triptofano nos grânulos da célula de Paneth. O número de células Paneth/cripta foi contado em cada seção histológica, trabalhando com ampliação de 60x (Cazorla, Maldonado-Galdeano et al. 2018). As quantificações foram realizadas de maneira cega por um único pesquisador.

6. Imunohistoquímica

Os animais foram transcardialmente perfundidos com solução salina tamponada com fosfato 0,01 mol / L (PBS; 150 ml) seguido por paraformaldeído a 4% (PFA; 350 ml). Cérebros foram pós-fixados por 3h em 4% PFA e crioprotegidos em PBS contendo 30% de sacarose por 3 dias a 4 °C. Fatiadas de 30 µm e 40 µm contendo o PVN e o RVLM, respectivamente, foram coletadas por seccionamento do criostato (Microm criostato HM 525). As amostras foram armazenadas a -20 °C em solução crioprotetora [450 mL de dH₂O, 300 mL de etilenoglicol (Aldrich, EUA), 200 mL de glicerol (RNase-Free; Sigma, EUA), 75 mL de 0,3 M de PBS] até o uso.

As fatias foram pré-incubadas em PBST (0,01M PBS, 0,04% NaN₃, 0,1% Triton) contendo 10% de soro de burro normal (Jackson ImmunoResearch, EUA) durante 1h. Os anticorpos primários incluíam a molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado

anti-coelho 1 (IBA1; 1: 2000; Wako Chemicals, EUA), vasopressina anti-cobaia (VP; 1: 10000; Peninsula Laboratories International, EUA) e tirosina hidroxilase anti-rato (TH; 1: 250; Santa Cruz Biotechnology, EUA). As amostras foram incubadas por 48h (IBA1) ou 24h (VP e TH) com anticorpos primários em PBST, foram lavados com PBS e incubadas com anticorpos secundários por 4hs [Alexa Fluor® AffiniPure Donkey IgG (H + L) anti-mouse 488 (1: 250), anti-coelho 594 (1: 250) e anti-cobaia (1:50); Jackson ImmunoResearch, EUA]. As amostras foram lavadas e montadas em lâminas com Vectashield Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories, EUA).

A imunofluorescência foi examinada com um microscópio invertido Nikon Eclipse TE2000-E acoplado a um microscópio confocal a laser Nikon A1. Imagens de z-stack de espessura total foram tiradas com ampliação de 60x. As cores VP e TH foram utilizadas como marcadores anatômicos para o PVN e RVLM, respectivamente. Imagens de projeção máxima de coloração IBA1 foram usadas para avaliar a morfologia da microglia, como descrito. Resumidamente, uma série de transformações digitais foram realizadas usando o ImageJ Software (NIH) para gerar uma imagem esqueletizada. O comprimento total e os pontos finais dos ramos foram calculados para cada imagem usando o plug-in AnalyzeSkeleton, e uma redução relativa nesses valores foi indicativa de aumento da ativação da microglia.

Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida do teste post hoc de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® 7.

Referências bibliográficas

- [1] National Research Council IfLAR, Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eighth Edition ed. Washington, DC: National Academies Press; 2011.

- [2] Klippele BF, Duemke LB, Leal MA, Friques AG, Dantas EM, Dalvi RF, et al. Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. *Frontiers in physiology*. 2016;7:211.
- [3] Friques AG, Arpini CM, Kalil IC, Gava AL, Leal MA, Porto ML, et al. Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Transl Med*. 2015;13:390.
- [4] Franquini JV, do Nascimento AM, de Lima EM, Brasil GA, Heringer OA, Cassaro KO, et al. Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. *Steroids*. 2013;78:379-85.
- [5] Nascimento AM, Lima EM, Brasil GA, Caliman IF, Silva JF, Lemos VS, et al. Serca2a and Na(+)/Ca(2+) exchanger are involved in left ventricular function following cardiac remodelling of female rats treated with anabolic androgenic steroid. *Toxicology and applied pharmacology*. 2016;301:22-30.
- [6] Wang X, Ren B, Liu S, Sentex E, Tappia PS, Dhalla NS. Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat. *Journal of applied physiology*. 2003;94:752-63.
- [7] Biancardi VC, Stranahan AM, Krause EG, de Kloet AD, Stern JE. Cross talk between AT1 receptors and Toll-like receptor 4 in microglia contributes to angiotensin II-derived ROS production in the hypothalamic paraventricular nucleus. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2016;310:H404-15.
- [8] Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry*. 1985;151:369-74.
- [9] Gill GW, Frost JK, Miller KA. A new formula for a half-oxidized hematoxylin solution that neither overstains nor requires differentiation. *Acta cytologica*. 1974;18:300-11.
- [10] Di Sabatino A, Miceli E, Dhaliwal W, Biancheri P, Salerno R, Cantoro L, et al. Distribution, proliferation, and function of Paneth cells in uncomplicated and complicated adult celiac disease. *American journal of clinical pathology*. 2008;130:34-42.
- [11] Cazorla SI, Maldonado-Galdeano C, Weill R, De Paula J, Perdigon GDV. Oral Administration of Probiotics Increases Paneth Cells and Intestinal Antimicrobial Activity. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:736.