



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Nariana Regina Pereira

**EFEITO VASODILATADOR DE UM HIDROLISADO DE SORO DE LEITE (*whey protein*)  
APÓS DIGESTÃO *in vitro*: IMPORTÂNCIA DO ENDOTÉLIO E DO ÓXIDO NÍTRICO**

FLORIANÓPOLIS

2019

Nariana Regina Pereira

**EFEITO VASODILATADOR DE UM HIDROLISADO DE SORO DE LEITE (*whey protein*)  
APÓS DIGESTÃO *in vitro*: IMPORTÂNCIA DO ENDOTÉLIO E DO ÓXIDO NÍTRICO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos.

FLORIANÓPOLIS

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Nariana Regina

EFEITO VASODILATADOR DE UM HIDROLISADO DE SORO DE LEITE  
(whey protein) APÓS DIGESTÃO in vitro: IMPORTÂNCIA DO  
ENDOTÉLIO E DO ÓXIDO NÍTRICO / Nariana Regina Pereira ;  
orientador, José Eduardo da Silva Santos, 2019.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Farmacologia. 3. hipertensão. 4.  
peptídeos. 5. whey protein. I. da Silva Santos, José  
Eduardo. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Nariana Regina Pereira

**EFEITO VASODILATADOR DE UM HIDROLISADO DE SORO DE LEITE (*whey protein*)  
APÓS DIGESTÃO *in vitro*: IMPORTÂNCIA DO ENDOTÉLIO E DO ÓXIDO NÍTRICO**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior  
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

---

Prof. Dr. Rui Daniel Schroder Prediger  
Coordenador do Programa

---

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos  
Orientador

Florianópolis, 17 de abril de 2019.

Este trabalho é dedicado a todas as almas em busca de sentido.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha mãe, Sonia. Minha super-heroína, símbolo de mulher forte e batalhadora e que não deixa o mundo escolher o seu lugar, ela vai lá e mostra o seu lugar. Obrigada mãe, pelas incontáveis horas de apoio e por estar comigo em todos os altos e baixos desse trabalho, e da minha vida.

Ao meu pai, Leonel por ter me ensinado a correr atrás de meus objetivos e não deixar que ninguém me diga o que é melhor para mim, a não ser eu mesma. E além disso, ter me ensinado que não existe outra saída, a não ser fazer acontecer. “Não tem não dá certo, tem que dar.”

Ao meu irmão Juliano, com sua companhia sempre presente e reconfortante, por ser o melhor exemplo de pessoa em quem me espelhar e por estar junto comigo em todos os momentos.

À Suellen por sempre me oferecer um abraço apertado, sempre me apoiar e melhorar meu dia com sua presença contagiante. Você faz a diferença.

Ao Kleber, por servir de porto quando eu precisei ficar e também de mar quando eu precisei partir, e por ser um pilar incontestável na construção desse trabalho, o qual sem seu fiel apoio não seria possível de ser concluído.

Ao meu orientador, José Eduardo, fonte inesgotável de entusiasmo. Obrigado por ouvir minhas ideias, sempre me impulsionar a ser melhor e por ser um orientador “portas abertas” que sempre esteve lá quando eu precisei. E principalmente por entender minhas limitações e respeitá-las.

Aos meus amigos Fabian, Isa e Maria que estiveram presentes em momentos decisivos ao longo desses 2 anos, estendendo a mão para me segurar, e as vezes me empurrando quando eu precisei cair na água.

À minha família LabCardio: Angélica, por ser essa amiga doce e carinhosa que vibrou comigo em cada vitória, e me consolou em cada derrota; Thiago e Elaine, por serem meus bons espelhos e fonte de inspiração, além de me fornecerem tantos conselhos preciosos para minha construção no meio acadêmico; Ruy e Natália, por dividirem comigo tantos momentos na convivência diária, por sempre me apoiarem e me fortalecerem; Stefane, por fazer cada coisinha ao seu alcance para animar nossos dias, e claro, sempre me fazer rir com seu jeitinho especial; Adriane, pela prontidão em ajudar com qualquer detalhe deste trabalho, bem como com conselhos.

Aos meus professores da graduação, Eduardo Manoel, Luiz e Januária, por terem me mostrado o caminho para chegar até aqui; e à professora Daniela por ter sido meu exemplo de “quem eu queria ser quando crescesse”.

Aos professores que compuseram a banca examinadora, Dr. Jamil Assreuy, Dr. Arquimedes Gasparotto, Dr. Daniel Fernandes e Adair Roberto Soares dos Santos pelas contribuições para este trabalho.

Aos amigos que esse Programa de Pós-Graduação me possibilitou fazer, Murilo, Filipe, Jheni, Mama e Robertinha. Podem ter certeza que os momentos que dividimos ao longo desse mestrado estarão guardados em minha memória.

A MSc. Luisa Ozorio, e Dra. Carolline Mellinger, pelo preparo e disponibilização dos hidrolisados usados nesse trabalho, bem como pela troca de conhecimentos e parceria ao longo deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, obrigada pelo auxílio e disponibilidade.

As instituições de fomento CAPES, CNPQ e FAPESC pelo auxílio financeiro.

Aos animais, meu pesar e respeito, por terem me concedido os meios para o conhecimento.

“Só quando nos perdemos, em outras palavras, só quando perdemos o mundo, é que começamos a nos encontrar, entendemos onde estamos e compreendemos a infinita extensão de nossas relações.”

(H. D. Thoreau)

## RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica ocorre quando mecanismos fisiológicos de controle da pressão se encontram ineficientes. Essa condição afeta 32,5% de adultos no Brasil. Devido a disfunção arterial contribuir para a hipertensão, a procura por novos agentes que possuam atividade nos vasos se mantém foco de muitos estudos. Dessa maneira, os efeitos vasculares de peptídeos derivados de alimentos têm sido amplamente investigados. Dentre eles, peptídeos derivados do soro de leite são descritos como inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA). O presente estudo teve como objetivo investigar a hipótese de que metodologias de digestão *in vitro* poderiam potencializar o efeito vasodilatador de peptídeos derivados de soro de leite. Além do mais, o mecanismo de ação envolvido nesta atividade vasodilatadora foi explorado em vasos de condutância e resistência, em ratos. Nossos resultados revelaram que as frações de hidrolisado de soro de leite submetidas à digestão *in vitro* (denominado HDE) exerceram relaxamento concentração-dependente com maior potência em aorta e artérias mesentéricas, quando comparado à hidrolisados não digeridos. Ademais, o relaxamento máximo induzido por HDE foi reduzido de  $94 \pm 7\%$  em anéis com endotélio intacto, para  $10 \pm 9\%$  em anéis sem endotélio funcional, indicando que esse relaxamento é dependente de endotélio. Notavelmente, a incubação de anéis de aorta com  $50 \mu\text{g/mL}$  de HDE não interferiu na resposta contrátil à angiotensina II após adição de angiotensina I, sugerindo que não há atividade inibitória sobre a ECA. Por outro lado, o relaxamento vascular induzido por HDE em aorta foi abolido por L-NAME (inibidor das sintases de óxido nítrico), c-PTIO (sequestrador de NO) e ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel, bem como pelo TEA (bloqueador de canais de potássio ativados por cálcio). Por outro lado, apesar do ODQ bloquear o relaxamento induzido por HDE em artérias de resistência, apenas uma inibição parcial foi obtida após incubação com L-NAME. Além disso, em artérias mesentéricas, o TEA não foi capaz de reduzir a atividade de HDE. Esses achados confirmam a hipótese de que produtos obtidos após digestão de hidrolisados de soro de leite induzem vasorrelaxamento com maior potência comparado com hidrolisados não digeridos. Esse efeito não parece ser relacionado à inibição da ECA e ocorre de maneira dependente de endotélio. Apesar da diferença encontrada, o relaxamento induzido por HDE é ao menos em parte relacionado à ativação da via da via NO/guanilato ciclase em aorta e artérias de resistência. São necessários estudos adicionais para explorar a eficácia desses produtos em modelos *in vivo*.

**Palavras-chave:** hipertensão, peptídeos, *whey protein*, óxido nítrico, endotélio.

## ABSTRACT

Systemic arterial hypertension occurs when physiological mechanisms of blood pressure control are ineffective. This condition affects about 32,5% of adults in Brazil. Because arterial dysfunction contributes to hypertension, the search for new agents with activity in vessels remains the focus of several studies. In this way, the vascular effects of food-derived peptides have been widely investigated in the last decades. Among them, peptides derived from whey protein are described as inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE). The present study was designed to investigate the hypothesis that *in vitro* digestion approaches could potentiate the vasodilatory effects of whey protein-derived peptides. Besides, the mechanism of action involved in such vasodilatory action was further explored in both conductance (aorta) and resistance (small mesenteric) arteries from rats. Our results revealed that the whey protein hydrolysed fractions subjected to *in vitro* digestion (here named HDE) present enhanced concentration-dependent vasodilatory effect in both aorta and small mesenteric arteries, compared with non-digested hydrolysates. Besides, the maximal relaxation induced by HDE was reduced from  $94 \pm 7\%$  in endothelium-intact to  $10 \pm 9\%$  in endothelium-denuded aortic rings, indicating that this relaxation was highly dependent on endothelial function. Notably, the previous exposure of aortic rings to  $50 \mu\text{g/mL}$  HDE did not prevent angiotensin II-mediated contractile responses obtained after addition of angiotensin I, suggesting the lack of any inhibitory effect on ACE activity. On the other hand, HDE-induced vascular relaxation in aortic rings was abolished by L-NAME (a nitric oxidase synthase inhibitor), c-PTIO (a nitric oxide scavenger), and ODQ (a soluble guanylate cyclase inhibitor), as well as by TEA (a non-selective calcium-activated potassium channel blocker). Differently, although ODQ did block the relaxation induced by HDE in small mesenteric arteries, only partial inhibition was found after incubation with L-NAME. Moreover, in these resistance arteries, TEA failed to reduce the activity of HDE. These findings confirm the hypothesis that products obtained after digestion of whey protein hydrolysates can induce vascular relaxation with enhanced potency, compared with non-digested products. This effect does not appear to be associated with ACE inhibition and occurs in an endothelium-dependent manner. Moreover, despite the differences found, HDE-induced relaxation is at least in part associated with the activation of the nitric oxide/guanylate cyclase pathway in both conductance and resistance arteries. Additional experiments must be carried out to explore the efficacy of these products in *in vivo* models.

**Keywords:** hypertension, peptides, whey protein, nitric oxide, endothelium.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão geral dos principais mecanismos de regulação da pressão arterial (PA).....	20
Figura 2 - Cascata de eventos intracelulares no processo de contração celular do músculo liso vascular. ....	22
Figura 3 - Principais fatores endoteliais envolvidos no relaxamento do músculo liso vascular.....	23
Figura 4 - Alterações vasculares que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão arterial.....	28
Figura 5 - Esquema de utilização do soro de leite para formação de peptídeos com atividade vascular.....	33
Figura 6 - Fluxograma do processo de produção dos hidrolisados. ....	36
Figura 7 - Fluxograma do processo de digestão de HLA inativado por temperatura. ....	38
Figura 8 - Registro típico apresentando o protocolo experimental padrão utilizado para experimentos em anéis de aorta. ....	40
Figura 9 - Influência do método de inativação da pepsina sobre o relaxamento induzido pelos hidrolisados de soro de leite em anéis de aorta de rato. ....	48
Figura 10 - Digestão in vitro do HLA-IT levou ao aumento de potência vasorrelaxante.....	49
Figura 11 - Remoção mecânica do endotélio funcional diminui significativamente a atividade vasorrelaxante do HDE. ....	50
Figura 12 - Via do NO/guanilato ciclase participa do relaxamento produzido pelo HDE em aorta.....	51
Figura 13 - Bloqueio não seletivo de canais de potássio sensíveis ao $Ca^{2+}$ inibe relaxamento exercido pelo HDE.....	52
Figura 14 - Canais de potássio sensíveis ao $Ca^{2+}$ de condutância intermediária e baixa não influenciam o relaxamento produzido pelo HDE. ....	53
Figura 15 - Inibição das vias da Akt/PI3K e EROs não interfere no relaxamento causado pelo HDE. ....	54
Figura 16 - Antagonismo de receptores para acetilcolina e bradicinina não interfere no relaxamento causado pelo HDE.....	54
Figura 17 - Bloqueio da COX não interfere no relaxamento causado pelo HDE. ....	55

Figura 18 - HDE não foi capaz de interferir na resposta contrátil exercida pela angiotensina I.....	55
Figura 19 - HDE não interfere na mobilização de $Ca^{2+}$ extracelular.....	56
Figura 20 - Relaxamento exercido pelo HDE não foi alterado pela presença do tecido perivascular (PVAT) em anéis de aorta.....	57
Figura 21 - HDE é capaz de gerar relaxamento dependente de concentração em artérias de resistência. ....	58
Figura 22 - NO participa de relaxamento induzido pelo HDE, mas não pela acetilcolina, em artérias mesentéricas de resistência. ....	59
Figura 23 - Canais de $K^+$ sensíveis ao $Ca^{2+}$ e canais de $K^+$ dependentes de voltagem não participam do relaxamento causado pelo HDE. ....	60
Figura 24 - Canais de $K^+$ sensíveis ao ATP não participam do efeito vasodilatador exercido pelo HDE em artérias de resistência.....	61
Figura 25 - Produtos da ciclooxigenase não reduzem o relaxamento causado pelo HDE em artérias de resistência.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
AC	adenilato ciclase
AMP	monofosfato de adenosina
AMPc	monofosfato de adenosina cíclica
AMPK	inibidor da proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BH <sub>4</sub>	tetraidrobiopterina
CCR	curva concentração resposta
CE <sub>50</sub>	concentração efetiva mediana
CEUA	Comissão de ética no Uso de Animais
CO	monóxido de carbono
COX	ciclooxigenase
c-PTIO	carboxi-PTIO
DAG	diacilglicerol
ECA	enzima conversora de angiotensina
EDHF	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
eNOS	sintase de óxido nítrico endotelial
EPM	erro padrão da média
EROS	espécies reativas de oxigênio
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMN	flavina mononucleotídeo
GMPc	monofosfato de guanosina cíclica
GPCR	receptores acoplados à proteína G
GCs	guanilato ciclase solúvel
G $\alpha$	subunidade $\alpha$ da proteína G
HDE	hidrolisado de digestão entérica
HDG	hidrolisado de digestão gástrica
HLA-IP	hidrolisado de soro de leite atomizado inativado por pH

HLA-IT	hidrolisado de soro de leite atomizado inativado por temperatura
HLL-IP	hidrolisado de soro de leite liofilizado inativado por pH
HLL-IT	hidrolisado de soro de leite liofilizado inativado por temperatura
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
IKCa	canais de potássio sensíveis ao Ca <sup>2+</sup> de condutância intermediária
iNOS	sintase de óxido nítrico induzida
IP	receptor da prostaciclina
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-trisfosfato
L-NAME	N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster
MLC	cadeias leves de miosina
MLCK	quinase de cadeia leve da miosina
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzida
NE	noradrenalina
nNOS	sintase de óxido nítrico neuronal
NO	óxido nítrico
ODQ	1H- [1,2,4] oxadiazolo [4,3a] quinoxalina-1
OMS	Organização Mundial da Saúde
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ânion superóxido
PA	pressão arterial
PGI <sub>2</sub>	prostaciclina
PI3K/Akt	fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase
PIP <sub>2</sub>	fosfatidilinositol 4,5- bifosfato
PKA	proteína quinase A
PKG	proteína quinase G
PLC	fosfolipase C
PVAT	tecido perivascular
R <sub>máx</sub>	relaxamento máximo

RS	retículo sarcoplasmático
Rp-PET	Rp-8-Br-PET-cGMPS
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo sarcoplasmático
SKCa	canais de potássio sensíveis ao Ca <sup>2+</sup> de condutância baixa
SNC	sistema nervoso central
TEA	tetraetilamônio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1	Mecanismos de regulação da pressão arterial .....	19
1.2	Papel dos vasos no controle da pressão arterial .....	20
1.2.1	Como ocorre a vasoconstrição .....	21
1.2.2	Como ocorre a vasodilatação .....	22
1.3	Diferenças nas vias de relaxamento entre vasos de condutância e resistência.....	25
1.4	Hipertensão arterial .....	27
1.4.1	Papel do no e da disfunção arterial na hipertensão.....	28
1.5	Peptídeos no tratamento da hipertensão.....	29
1.5.1	O primeiro peptídeo com atividade anti-hipertensiva.....	29
1.5.2	Peptídeos derivados de alimentos com atividade no sistema cardiovascular .....	30
1.6	Proteína de soro de leite como fonte de peptídeos com ação cardiovascular.....	31
1.7	Por que utilizar o soro de leite como fonte de produtos com atividades cardiovasculares? .....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
2.1	Objetivo geral .....	34
2.2	Objetivos específicos.....	34
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
3.1	Fornecimento dos hidrolisados de proteína do soro de leite.....	35
3.1.1	Preparo do hidrolisado do soro de leite .....	35
3.1.2	Digestão <i>in vitro</i> do hidrolisado de soro de leite .....	37
3.2	Drogas.....	37

3.3	Animais.....	38
3.4	Preparações vasculares: montagem e avaliação da viabilidade .....	39
3.4.1	Anéis de aorta .....	39
3.4.2	Anéis em artérias mesentéricas de resistência .....	41
3.5	Avaliação do efeito vasodilatador dos hidrolisados .....	42
3.6	Protocolos de investigação do mecanismo de ação envolvido no efeito vasorrelaxante do hde em anéis de aorta .....	42
3.6.1	Avaliação da participação da via do NO/guanilato-ciclase .....	43
3.6.2	Avaliação da participação de canais de potássio .....	43
3.6.3	Avaliação da participação da via da fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/AKT) e espécies reativas de oxigênio (EROS) .....	43
3.6.4	Avaliação da participação dos receptores de bradicinina e acetilcolina ..	44
3.6.5	Avaliação da participação de produtos da ciclooxigenase .....	44
3.6.6	Investigação do efeito inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) na atividade vasorrelaxante do HDE.....	44
3.6.7	Investigação da participação da regulação da entrada de $Ca^{2+}$ no meio intracelular na atividade vasorrelaxante do HDE .....	44
3.7	Protocolos de investigação do mecanismo de ação envolvido no efeito vasorrelaxante do hde em artérias de resistência.....	45
3.8	Análise estatística.....	46
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
4.1	Atividade vasorrelaxante de hidrolisado de proteína de soro de leite em aorta.....	47
4.1.1	Influência da digestão <i>in vitro</i> sobre a atividade vasorrelaxante do HLA-IT em aorta.....	47
4.2	Mecanismo de ação da atividade vasorrelaxante do HDE em aorta .....	49
4.2.1	Envolvimento de fatores endoteliais no relaxamento exercido pelo HDE em orta.....	49

4.2.2 Contribuição da via do NO/guanilato-ciclase no relaxamento exercido pelo HDE em aorta .....	50
4.2.3 Participação de canais de potássio no relaxamento produzido pelo HDE em aorta.....	51
4.2.4 As vias AKT/PI3K e das espécies reativas de oxigênio não participam do relaxamento induzido pelo HDE em aorta .....	53
4.2.5 Os antagonistas dos receptores de acetilcolina e bradicinina não foram capazes de reverter o relaxamento induzido pelo HDE em aorta .....	53
4.2.6 Os produtos da cicloxigenase não tem participação no relaxamento causado pelo HDE em aorta .....	55
4.2.7 HDE não exerceu efeito sobre a atividade contrátil da angiotensina I.....	55
4.2.8 Ausência de efeito do HDE sobre contrações induzidas por $\text{CaCl}_2$ .....	55
4.2.9 Presença do tecido perivascular não altera o relaxamento exercido pelo HDE em aorta .....	56
4.3 Atividade vasorrelaxante de HDE em artérias mesentéricas de resistência.....	57
4.3.1 Contribuição da via do NO/guanilato-ciclase no relaxamento exercido pelo HDE em artérias de resistência.....	58
4.3.2 Canais de potássio não participam do relaxamento induzido pelo HDE em artérias de resistência.....	59
4.3.3 Produtos da cicloxigenase não reduzem o relaxamento causado pelo HDE em artérias de resistência .....	61
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Mecanismos de regulação da pressão arterial

A pressão arterial é controlada por diversos mecanismos fisiológicos, sendo capazes de gerar efeitos a curto, médio e longo prazo, conforme resumido na **Figura 1**. Os mecanismos de curto prazo corrigem pequenas mudanças momentâneas de pressão, enquanto que os de médio prazo controlam mudanças que ocorrem por um período maior, e os de longo prazo levam ao controle e equilíbrio da pressão por meses e anos (Waghmare; Srivastava, 2016).

Dentre os mecanismos de controle a curto prazo está o reflexo dos barorreceptores, que estão localizados no sino carotídeo e arco aórtico, os quais, com a elevação da pressão arterial mandam impulsos ao centro vasomotor, levando à diminuição do tônus simpático nos vasos e coração. Também se pode destacar os quimiorreceptores, que são sensíveis à hipóxia tecidual e como resposta levam ao estímulo do centro vasomotor e respiratório, aumentando a pressão arterial, o débito cardíaco e a frequência respiratória. Além desses dois mecanismos, também existe a resposta isquêmica do sistema nervoso central (SNC), que é ativada quando há uma queda mais acentuada da pressão arterial, e conseguinte a isquemia do centro vasomotor no bulbo, resultando em estimulação do sistema nervoso simpático (Manning; Norman, 1972; e Waghmare; Srivastava, 2016).

Já no que tange os mecanismos de controle de médio prazo, um deles é através do deslocamento de fluido capilar, em que o aumento da pressão causa uma transferência do fluido capilar para o meio extracelular, levando à diminuição de volume plasmático e conseqüentemente, da pressão arterial. Além disso, também há o relaxamento por estresse circulatório, que acontece quando há uma elevação da pressão arterial por aumento de volume sanguíneo, ocorrendo um lento estiramento dos vasos, especialmente em reservatórios venosos, como do fígado e pâncreas. Como resposta, há um relaxamento das artérias para que o volume sanguíneo aumentado possa ser acomodado (Guyton *et al.*, 1969 e Waghmare & Srivastava, 2016).

Por último, os mecanismos de controle a longo prazo da pressão, são eficazes e complexos, e são exercidos principalmente pelos rins, geralmente através de diurese e natriurese. O que ocorre é que quando a pressão arterial se eleva acima do

normal, isso faz com que os rins passem a excretar sódio e água em uma taxa mais elevada do que a taxa de entrada dessas substâncias no organismo, levando à diminuição do volume sanguíneo e conseqüente retorno da pressão ao basal. Além disso, há mecanismos indiretos que funcionam quando o contrário ocorre, e há uma queda na pressão. Isso resulta na liberação de renina pelas células justaglomerulares nos rins, que leva à formação de angiotensina I através da quebra do angiotensinogênio, que após é convertido em angiotensina II. A angiotensina II por sua vez, age como vasoconstritor e também estimula a secreção de aldosterona, que aumenta a reabsorção de sódio e água (Guyton 1991; Manning & Norman 1972; Waghmare & Srivastava 2016 e Yim & Yoo, 2008).



**Figura 1 - Visão geral dos principais mecanismos de regulação da pressão arterial (PA).** Fluxograma demonstrando um apanhado geral dos principais mecanismos de controle da pressão arterial, a curto, médio e longo prazo, conforme descrito. Fonte: Autora.

## 1.2 Papel dos vasos no controle da pressão arterial

Há muito tempo existe o conhecimento de que a resistência vascular periférica tem um papel muito importante no controle da pressão arterial (Green & Kepchar, 1959). Como indicação disso, muitos dos eventos descritos anteriormente são baseados na liberação de substâncias que agem diretamente nos vasos sanguíneos, como as catecolaminas pelo sistema nervoso simpático, que atuarão também gerando

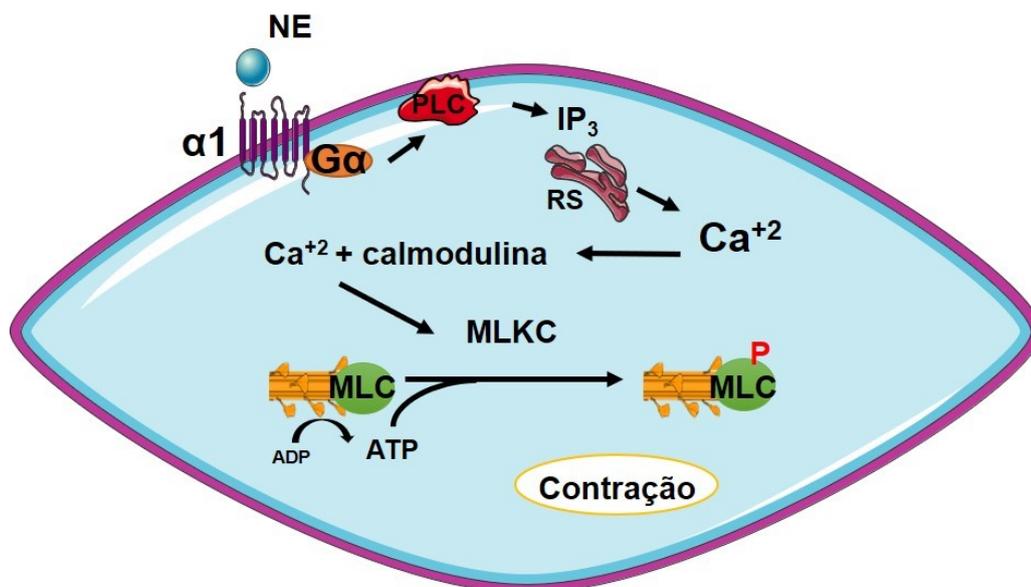
vasoconstrição. Diante disso, é notável a importância dos vasos para a manutenção da pressão arterial, sendo sua participação detalhada a seguir.

### 1.2.1 Como ocorre a vasoconstrição

Para evidenciar a participação dos vasos sanguíneos no controle da pressão, pode-se iniciar com a compreensão dos mecanismos vasoconstritores. No que tange o funcionamento das artérias, para que ocorra a vasoconstrição, os agonistas de modo geral produzem mudanças nas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma do músculo liso vascular. Os eventos intracelulares clássicos decorrentes da ativação de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos pela noradrenalina após estimulação simpática, são bem conhecidos e estão detalhados na **Figura 2**. Em suma, a fosfolipase C (PLC) é ativada pela subunidade  $\alpha$  da proteína Gq a qual o receptor está acoplado<sup>1</sup>. Essa PLC hidrolisa fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) em inositol 1,4,5-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $\text{IP}_3$  induz a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático, que ao complexar com a calmodulina, atua como mensageiro intracelular permitindo a ativação da miosina adenosina trifosfatase (miosina ATPase) pela actina. A miosina ATPase fornece trifosfato de adenosina (ATP) para a contração do músculo liso através da fosforilação das cadeias leves de miosina (MLC) pela quinase de cadeia leve da miosina (MLCK) dependente de calmodulina. Essas respostas contráteis são desencadeadas pela ação de diversos vasoconstritores em seus receptores, como a angiotensina II, vasopressina, nucleotídeos de adenosina, serotonina, endotelina, prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$ , histamina, entre outros (Frelin 2003; Webb, 2003 e Wier & Morgan, 2003).

---

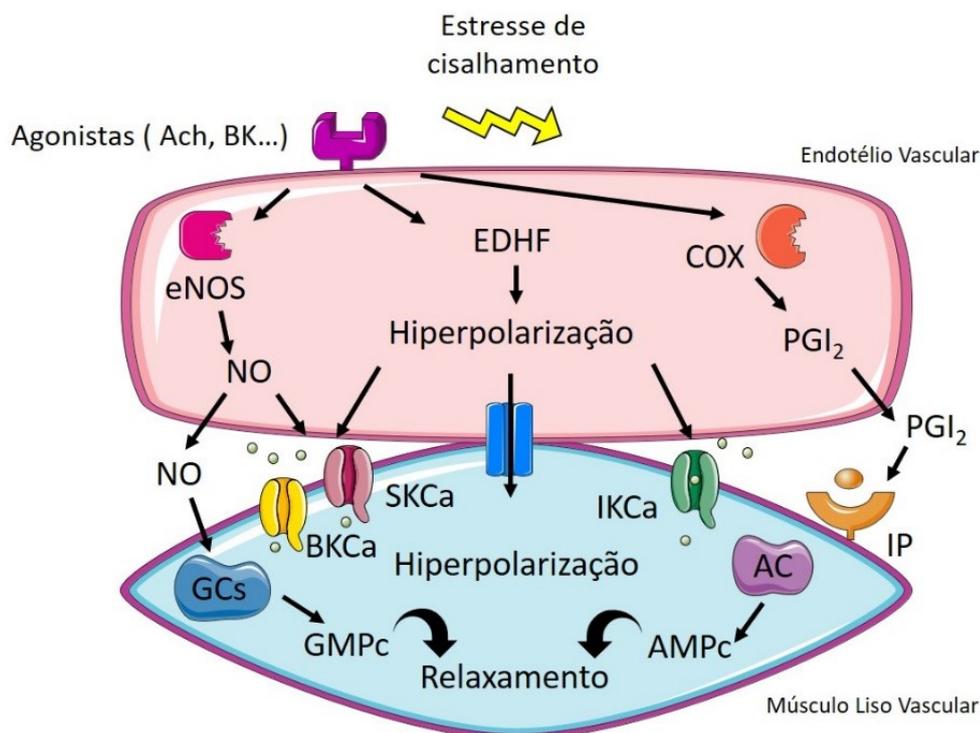
<sup>1</sup> A maioria dos receptores presentes em vasos e que causam aumento rápido do tônus, são receptores acoplados à proteína G (GPCR), como os receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos e  $\text{AT}_1$  para angiotensina II, dentre outros.



**Figura 2 - Cascata de eventos intracelulares no processo de contração celular do músculo liso vascular.** A ativação de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos pela noradrenalina (NE) leva à ativação da fosfolipase C (PLC) através da subunidade  $\alpha$  da proteína G ( $G\alpha$ ) acoplada ao receptor. A PLC por sua vez, hidrolisa fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) em inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ). O aumento de  $IP_3$  leva à liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS), que irá se ligar à calmodulina. O complexo formado por  $Ca^{2+}$  e calmodulina se liga à quinase da cadeia leve da miosina (MLKC), ativando-a. Esta, por sua vez passará a fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC) com consumo de ATP. A miosina se ligará à actina, levando à contração muscular. Fonte: Elaborado pela autora a partir de imagens disponíveis em Servier Medical Art (2017) e <https://mindthegraph.com>.

### 1.2.2 Como ocorre a vasodilatação

Outra importante atribuição dos vasos sanguíneos no controle da pressão arterial, se dá através de seus mecanismos de vasodilatação. Dentre as substâncias vasodilatadoras que participam do controle da pressão, vale destacar aquelas oriundas do endotélio, que é a camada de células presente na parte interior do vaso sanguíneo. O endotélio é essencial para que ocorra o vasorrelaxamento, conforme descreveu Furchgott *et al.*, 1980. Hoje em dia, se sabe que as principais substâncias vasodilatadoras liberadas pelas células endoteliais são o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina ( $PGI_2$ ) (Fortes *et al.*, 2001), conforme representado na **Figura 3**.



**Figura 3 - Principais fatores endoteliais envolvidos no relaxamento do músculo liso vascular.**

Estímulos de agonistas levam à ativação da sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS), que catalisará a formação de óxido nítrico (NO). Esse NO por sua vez, se difundirá para a célula do músculo liso vascular, ativando a guanilato ciclase solúvel (GCs) e levando ao aumento intracelular de GMPc, que culminará no relaxamento do músculo liso. Já o mecanismo de relaxamento do EDHF é através da hiperpolarização da célula endotelial. Essa hiperpolarização atravessará para a célula muscular através de junções mioendoteliais. Além disso, também ocorrerá a abertura de canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$  de condutância baixa (SKCa) e intermediária (IKCa), contribuindo para a hiperpolarização e consequente relaxamento da célula muscular lisa. Quanto aos produtos da ciclooxygenase (COX), eles são formados a partir do ácido araquidônico, e um exemplo deles é a  $PGI_2$ . Essa substância se difunde para a célula muscular e ao se ligar ao seu receptor (denominado IP) leva à ativação da adenilato ciclase (AC), aumentando a disponibilidade de AMPc e culminando no relaxamento. Fonte: Elaborado pela autora a partir de imagens disponíveis em Servier Medical Art (2017) e <https://mindthegraph.com>.

Em 1980 foi que Furchgott percebeu que o endotélio não só era essencial para a vasodilatação, como também era capaz de liberar uma substância vasodilatadora, identificada como sendo o mecanismo pelo qual a acetilcolina causava relaxamento em aorta de ratos. A substância em questão a que ele se referia foi mais tarde, em 1987, identificada como óxido nítrico, por Moncada e seus colaboradores (Moncada *et al.*, 1988).

O óxido nítrico é sintetizado através de suas sintases, que possuem três diferentes isoformas: a sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS), a induzida (iNOS) e

a endotelial (eNOS)<sup>2</sup>. Para que a síntese ocorra, as sintases utilizam L-arginina como substrato, além de oxigênio e fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzida (NADPH) como co-substratos. Além disso, a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) são utilizadas como co-fatores. Assim, a NOS transfere elétrons da NADPH via FAD e FMN para o grupamento heme no domínio amino-terminal da oxigenase, que se liga ao cofator BH<sub>4</sub> e à L-arginina. Desta maneira, ocorre ativação de O<sub>2</sub> para oxidar a L-arginina em L-citrulina e NO. Para que esse processo ocorra, é necessário o aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular, formando o complexo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina e ativando a NOS (Forstermann & Sessa, 2012; Masters *et al.*, 1995; Stuehr *et al.*, 2001).

A característica do NO de ser uma substância bastante lipofílica faz com que facilmente se difunda através da membrana das células do músculo liso vascular, levando à ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) no citosol, que por sua vez, aumenta a disponibilidade de monofosfato de guanosina cíclica (GMPc) (Ignarro, 1991; Rapoport & Murad, 1983). A partir de então, ocorre ativação da proteína quinase G (PKG), que por mecanismos diferentes, como por exemplo, a abertura de canais de K<sup>+</sup> e consequente hiperpolarização da célula, leva à vasodilatação (Archer *et al.*, 1994). O NO também leva à vasodilatação por diminuir a disponibilidade de Ca<sup>2+</sup> no citosol ativando a ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) (Cornwell *et al.*, 1991), que recaptura Ca<sup>2+</sup> para seus estoques intracelulares (Fortes *et al.*, 2001; Furchgott; Zawadski, 1980; Ignarro *et al.*, 1987; Ignarro 1989). Além disso, conforme Bolotina (1994), o óxido nítrico também é capaz de abrir canais de K<sup>+</sup> diretamente, contribuindo para a hiperpolarização.

Além do óxido nítrico, outro importante fator com atividade vasodilatadora liberado pelo endotélio, como citado anteriormente, é conhecido como EDHF. Apesar de bastante estudado, existem diversas hipóteses sobre qual substância exerceria essa função, incluindo o próprio K<sup>+</sup> (Weston *et al.*, 1998) e também o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Takeshita *et al.*, 2000). No entanto, a maior parte das evidências aponta que o EDHF está relacionado a um aumento de condutância da membrana celular, e aumento na movimentação de íons K<sup>+</sup>. Desta maneira, os canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao Ca<sup>2+</sup> são bastante importantes para essa resposta, uma vez que há

---

<sup>2</sup> Também conhecidas como NOS1, NOS2 e NOS3, respectivamente.

ativação desses canais, principalmente os de condutância baixa e intermediária em respostas mediadas por EDHF (Cocks *et al.*, 1995; Félétou *et al.*, 2005). Como consequência disso, ocorre uma hiperpolarização das células endoteliais, que é transmitida por junções mioendoteliais para as células do músculo liso, levando ao relaxamento (para revisão, ver Félétou & Vanhoutte, 2006).

Outra substância que contribui para a vasodilatação dependente do endotélio é a PGI<sub>2</sub>. Ela foi descoberta em 1976 (Vane *et al.*, 1976), e em 1977 foi mostrado que, além da potente atividade antiagregante plaquetária, também era formada em tecidos de artérias e veias em humanos (Moncada *et al.*, 1977). Quando liberada pelo endotélio, a PGI<sub>2</sub> se liga a seus receptores, denominados IP, que através da estimulação de proteínas Gs ativam a adenilato ciclase (AC), aumentando os níveis de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) no meio intracelular. Dentre outras funções, o AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), que reduz a atividade da MLCK, diminui a concentração de MLC fosforilada e leva ao relaxamento vascular (Birukov *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2001).

### 1.3 Diferenças nas vias de relaxamento entre vasos de condutância e resistência

Apesar dos principais mediadores vasodilatadores já terem sido descritos, existe um interesse crescente nas diferentes distribuições desses mecanismos de vasodilatação entre vasos de resistência e de condutância. Desta maneira, sabe-se que esses vasos diferem na resposta a determinadas substâncias. Um exemplo disso é o relaxamento exercido pela acetilcolina, um vasodilatador clássico, que age em receptores muscarínicos nas células endoteliais e causa liberação de NO. Já foi mostrado que o relaxamento exercido pela acetilcolina tem o envolvimento obrigatório do endotélio (Furchgott & Zawadski, 1980). Porém, também se sabe que os fatores endoteliais envolvidos em seu relaxamento, podem variar dependendo do calibre do vaso e do leito vascular (Duling, 1997).

Em aorta (artéria de condutância) de camundongos, a resposta vasodilatadora para a acetilcolina se mostrou inteiramente dependente de óxido nítrico, uma vez que a incubação com L-NAME, inibidor não seletivo das sintases de óxido nítrico, é capaz de abolir totalmente o seu efeito (Wanstall *et al.*, 2001). Por sua vez, a acetilcolina causa vasodilatação em vasos da pele de humanos, por mecanismos dependentes principalmente de NO e prostaciclina, uma vez que tanto o L-NAME, quanto inibidores

das ciclooxygenases foram capazes de reduzir a vasodilatação da acetilcolina nesse tecido, sendo a inibição em maior escala quando administrados em conjunto (Kellogg *et al.*, 2005).

Em se tratando de artérias de resistência, como pequenas artérias mesentéricas, evidências apontam que o relaxamento causado por acetilcolina não tem um envolvimento obrigatório do NO, já que essa resposta persiste mesmo após incubação com substâncias que afetam sua produção, como inibidores da sintase de NO e oxihemoglobina (Garland, C.J., McPherson, 1992). Uma vez que o NO não seria o principal mediador de vasodilatação em artérias de resistência, e tampouco parece ser a prostaciclina, as evidências apontam em direção ao EDHF como principal mediador de vasodilatação nessas artérias (Waldron *et al.*, 1999). Nesse sentido, a participação de canais de K<sup>+</sup> merece destaque, sendo que em muitos desses vasos a utilização de bloqueadores de canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao Ca<sup>2+</sup> de condutância baixa, intermediária e alta é capaz de reduzir significativamente o relaxamento induzido por acetilcolina, ao contrário do L-NAME, sendo esse achado acentuado quanto menor o calibre do vaso (Hilgers *et al.*, 2006). Sendo assim, parece haver na literatura uma concordância de que a contribuição do óxido nítrico para o relaxamento causado por acetilcolina diminui conforme diminui o calibre do vaso, sendo que em vasos menores há um aumento da contribuição do EDHF e canais de K<sup>+</sup> (Shimokawa *et al.*, 1996; Tomioka *et al.*, 1999).

Além da acetilcolina, outras substâncias já demonstraram diferenças de efeitos em artérias de condutância e resistência, como é o caso da quercetina, que induziu a uma resposta vasodilatadora maior em artérias coronárias de resistência de coelhos do que nas de condutância, embora as duas respostas sejam endotélio-independentes (Rendig *et al.*, 2001). A histamina também gerou respostas diferentes em dois tipos de vasos, provocando contração significativa em artérias coronárias de condutância de porco sem nenhum efeito em artérias de resistência. Também a prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), capaz de provocar vasoconstrição mais intensa nessas artérias de condutância, apresenta efeito menor ou inexistente em artérias de resistência (Nakayama *et al.*, 1989). Já foi demonstrado heterogeneidade em respostas funcionais entre artérias de condutância e resistência também em estados patológicos, como na hipertensão. Por exemplo, em ratos Lyon hipertensos, houve uma redução do relaxamento dependente de endotélio para agonistas vasodilatadores em aorta, sendo que em artérias mesentéricas de resistência essa resposta

permaneceu a mesma, em comparação com ratos normotensos (Freitas *et al.*, 2003). Também em artérias de resistência, em modelo experimental associado à obesidade, houve um aumento de resposta contrátil para a noradrenalina e uma diminuição da resposta vasodilatadora para acetilcolina, enquanto em artérias de condutância as respostas permaneceram inalteradas (Brien *et al.*, 1998).

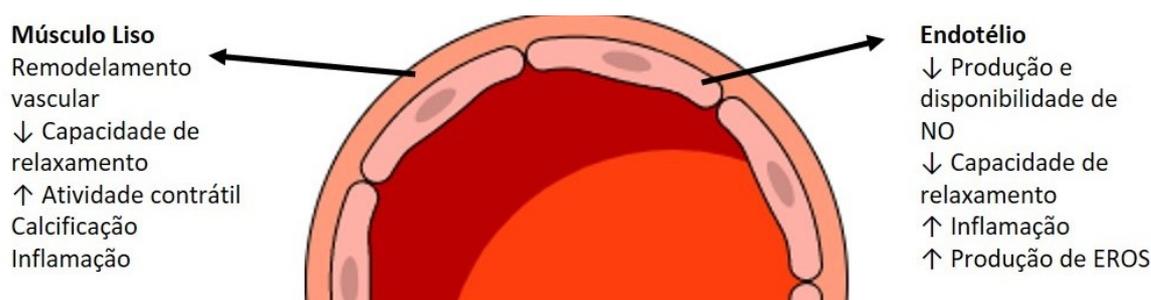
#### 1.4 Hipertensão arterial

Quando os mecanismos de controle da pressão arterial se tornam inefetivos, ocorre uma condição denominada hipertensão. Segundo a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, a hipertensão é uma condição clínica multifatorial, que se caracteriza pela elevação sustentada dos níveis pressóricos para valores  $\geq 140$  e/ou  $\geq 90$  mmHg. Essa condição está frequentemente associada com distúrbios metabólicos, alterações de órgãos-alvo e é agravada por outros fatores de risco, como dislipidemia, obesidade e diabetes mellitus (Malachias *et al.*, 2016). Altamente prevalente, foi estimado que cerca de 36,2% dos adultos norte americanos com idade  $\geq 20$  anos entre 2009 e 2012 tinham valores elevados de pressão arterial, somando um total de 80 milhões de indivíduos (Mozaffarian *et al.*, 2015). Já no Brasil, a hipertensão acomete cerca de 32,5% de indivíduos adultos, aproximadamente 36 milhões, e mais de 60% dos idosos, contribuindo para 50% das mortes por doenças cardiovasculares (Scala *et al.*, 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a pressão arterial elevada é um fator de risco importante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, juntamente com aumento de glicose e lipídeos séricos, obesidade e sobrepeso, gerados por comportamentos de risco, como a falta de exercício físico, má alimentação, fumo e uso abusivo de álcool. Além disso, as doenças cardiovasculares são a causa número 1 no ranking de mortes por doenças não transmissíveis no mundo, com 17,9 milhões de mortes estimadas em 2016, representando 31% do total de casos de mortes, sendo 85% devido a infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (WHO, 2018). Em virtude desses dados alarmantes, destaca-se a importância do conhecimento de novas estratégias para o gerenciamento de condições como a hipertensão arterial.

#### 1.4.1 Papel do NO e da disfunção arterial na hipertensão

Os vasos sanguíneos possuem um papel importante no desenvolvimento da hipertensão, uma vez que os mesmos são alvo de mudanças funcionais, estruturais e mecânicas, incluindo disfunção endotelial, remodelamento vascular, inflamação e rigidez arterial, conforme ilustrado na **Figura 4**. Dentre as principais mudanças vasculares já descritas em hipertensos, destaca-se a diminuição da biodisponibilidade de NO (Calver *et al.*, 1992; Forte *et al.*, 1997), reduzindo a capacidade do endotélio de causar relaxamento. Além disso, também há aumento da resposta contrátil no músculo liso vascular, calcificação tanto da camada endotelial quanto da muscular, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), além de fibrose e remodelamento de matriz extracelular na camada adventícia (para revisão, ver Cameron *et al.*, 2016, e Harvey *et al.*, 2016).



**Figura 4 - Alterações vasculares que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão arterial.** Ilustração demonstrando os principais fatores vasculares que se encontram alterados na hipertensão e sua localização no vaso. Fonte: Elaborado pela autora a partir de imagens disponíveis em <https://mindthegraph.com>.

A ligação entre a disfunção endotelial e a hipertensão é antiga, sendo que estudos da década 70 e 80 demonstraram que a capacidade da acetilcolina causar relaxamento em aorta era menor em ratos SHR (do inglês, *spontaneously hypertensive rat*) quando comparados a ratos normotensos (Konishi & Su, 1983; Cohen & Berkowitz, 1976). Sendo assim, a disfunção endotelial mostrou ter um papel importante na fisiopatologia da hipertensão. Mais tarde, descobriu-se que pacientes com hipertensão possuíam um déficit na liberação de óxido nítrico endotelial, contribuindo para o aumento da resistência vascular periférica e para a resposta diminuída a vasodilatadores (Panza *et al.*, 1993). Isto posto, sabe-se que a redução da biodisponibilidade do NO tem papel principal no desenvolvimento da hipertensão,

sendo resultado de uma diminuição em sua produção, e também de sua inativação devido a um aumento no estresse oxidativo. Isso se dá ao fato de que o NO reage com espécies reativas de oxigênio, principalmente o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (para revisão, ver Cameron *et al.*, 2016).

Uma vez que a associação entre hipertensão e a disfunção endotelial já está bem estabelecida, pode-se considerar os vasos como um alvo terapêutico para o tratamento da doença, tendo como objetivo a melhora na biodisponibilidade do NO. Algumas medicações utilizadas para tratamento da hipertensão, dentre outras funções, possuem efeitos benéficos sobre a disfunção endotelial. Um exemplo seriam os bloqueadores de canais de cálcio, que contribuem na restauração da biodisponibilidade de NO em pacientes com hipertensão (Salveti *et al.*, 2001). Esse efeito se dá principalmente através de sua ação antioxidante, protegendo a célula endotelial de prejuízos gerados por radicais livres (Mak *et al.*, 1992). Além disso, antagonistas de receptores  $AT_1$  para a angiotensina e também inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) possuem potencial para melhora da função vascular por mecanismos não bem esclarecidos, mas que podem estar relacionados à inibição dos efeitos da angiotensina, que causa disfunção endotelial através da indução de aumento no estresse oxidativo (Griendling *et al.*, 1994). Ademais, alguns  $\beta$ -bloqueadores possuem importantes propriedades antioxidantes e também auxiliam no relaxamento dependente de óxido nítrico (Prieto *et al.*, 2012).

Considerando-se o papel do NO na fisiopatologia da hipertensão, e a relevância de manter-se sua biodisponibilidade em valores adequados, destaca-se o interesse na busca por novas ferramentas farmacológicas capazes de influenciar e/ou auxiliar em sua liberação, biodisponibilidade e ativação de suas vias de sinalização.

## 1.5 Peptídeos no tratamento da hipertensão

### 1.5.1 O primeiro peptídeo com atividade anti-hipertensiva

A história do uso de peptídeos para o tratamento de condições cardiovasculares, data de décadas atrás, mais precisamente em 1970. Com a descoberta feita pelo cientista brasileiro Sérgio Ferreira, de um peptídeo proveniente do veneno da *Bothrops jararaca* que potencializava a atividade da bradicinina (Ferreira, 1965), a

qual possui entre outros efeitos ação vasodilatadora, instalou-se um interesse nas atividades vasculares de peptídeos. Trabalhando com John Vane, Sérgio Ferreira acabou por descobrir que os peptídeos também possuíam potente atividade inibitória sobre a ECA (Ferreira *et al.*, 1970).

A partir desse ponto, tornou-se crescente o interesse em testar peptídeos para tratamento da hipertensão. Vane, que na época era professor de Farmacologia Experimental em uma universidade na Inglaterra e também consultor da indústria americana Squibb, ao apresentar o conceito dos inibidores da ECA para a companhia, levantou interesse da mesma pelo produto, como meio de ingressar no mercado de tratamentos para doenças cardiovasculares. Essa história resultou no primeiro ensaio clínico realizado na Inglaterra, para testar em humanos os peptídeos que até então só tinham sido testados em animais. Esse acontecimento foi seguido da aprovação pela agência regulatória norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) para um teste clínico também nos Estados Unidos, patrocinado pela Squibb, no qual de 17 pacientes com hipertensão essencial, 14 tiveram os valores pressóricos reduzidos por meio do tratamento com os peptídeos derivados do veneno da *Bothrops jararaca*. Essa história resultou na síntese, aprovação, produção e comercialização do medicamento hoje conhecido como captopril, no início dos anos 1980, abrindo caminho para uma nova abordagem para o tratamento da hipertensão (Vane e Smith, 2003).

#### 1.5.2 Peptídeos derivados de alimentos com atividade no sistema cardiovascular

Seguindo a descoberta de peptídeos com atividade no sistema cardiovascular, houve um crescente interesse no desenvolvimento de peptídeos de origem alimentar, que também possuísem tais efeitos, inclusive atividade inibidora sobre a ECA. Em vista da pouca tolerância a drogas sintéticas e busca de um estilo de vida mais saudável, o mercado dos alimentos bioativos para prevenção e tratamento de doenças está cada vez mais forte (Torruco-uco, 2008).

Diversos peptídeos de origem vegetal e animal já foram avaliados acerca da atividade sobre o sistema cardiovascular, principalmente *in vitro*. Um exemplo de fonte alimentar para esses peptídeos seria a proteína de soja, cujos efeitos descritos incluem a supressão da elevação de  $Ca^{2+}$  intracelular evocada pela angiotensina II em células de músculo liso vascular (Kumrungsee *et al.*, 2014). Nesse contexto, a

suplementação com peptídeos derivados de soja preta em indivíduos com hipertensão leve levou à redução nos valores da pressão arterial sistêmica (Kwak *et al.*, 2013). Voltando às avaliações *in vitro*, alguns estudos sugerem que a atividade inibitória da ECA é o mecanismo de ação dos peptídeos derivados da soja (Nakahara *et al.*, 2011) e da proteína glicina (Gouda *et al.*, 2006).

#### 1.6 Proteína de soro de leite como fonte de peptídeos com ação cardiovascular

Além da soja, outras proteínas de fonte alimentar têm levantado interesse quando se trata de saúde cardiovascular. É o caso de proteínas derivadas de leite. A  $\beta$ -lactoglobulina, uma das proteínas do leite, quando hidrolisada, pode gerar sequências de peptídeos com atividade inibitória da ECA *in vitro* (Mullally *et al.*, 1997). Outra fonte proteica do leite, a caseína, já demonstrou possuir peptídeos com efeitos vasorrelaxantes em aorta e artérias mesentéricas de ratos (Kanso *et al.*, 2014). Além disso, já foram investigados peptídeos derivados da caseína capazes de induzir produção de NO em cultura de células endoteliais, bem como relaxamento dependente de endotélio em aorta (Hirota *et al.*, 2011). Para se ter uma ideia, até o presente momento existem cerca de 168 trabalhos publicados na base de dados Pubmed com as palavras “peptídeos do leite” e “hipertensão”.

O soro de leite, comumente conhecido como *whey protein*, muito utilizado como suplementação por atletas de alta performance, também possui peptídeos com potencial atividade sobre o sistema cardiovascular. Alguns estudos já demonstraram atividade inibitória da ECA *in vitro* por hidrolisados de proteína de soro de leite (Mullally *et al.*, 1997b e O’Keeffe *et al.*, 2017), bem como atividade anti-hipertensiva em animais SHR (Martin *et al.*, 2015; Tavares *et al.*, 2012 e Wang *et al.*, 2012).

#### 1.7 Por que utilizar o soro de leite como fonte de produtos com atividades cardiovasculares?

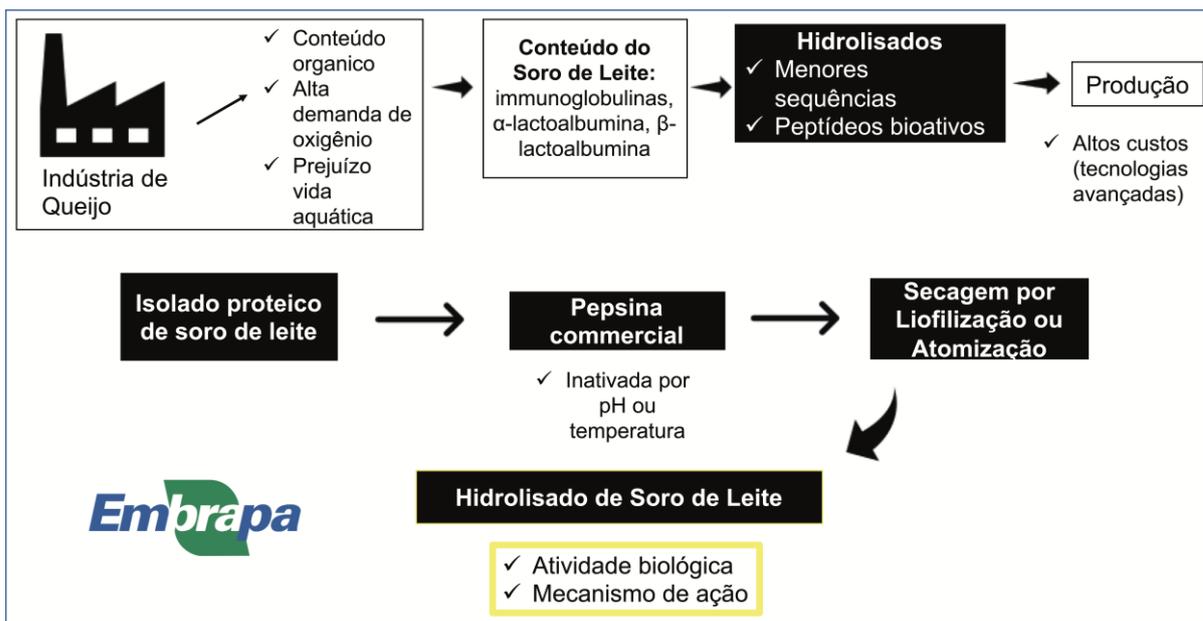
Segundo o Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo, o soro de leite é um dos principais problemas ambientais da produção de lácteos, uma vez que grande parte da produção de queijo, principal gerador de soro de leite, é feita por pequenas empresas que não dão o destino adequado para este resíduo, subutilizando-o para alimentação animal ou desprezando em rios, sendo um problema

devido à alta demanda bioquímica de oxigênio necessária para degradá-lo (Kaan *et al.*, 2019).

O soro de leite é composto principalmente por  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas, dentre outras proteínas, sendo fonte rica para o desenvolvimento de produtos com atividades biológicas variadas (para revisão, ver Haraguchi *et al.*, 2006). Sendo assim, além da utilização do soro de leite para produção de suplemento para atletas de alto rendimento, tem-se a possibilidade de uso para produção de alimentos funcionais, capazes de promover a saúde e reduzir o risco de doenças (Tavares *et al.*, 2012). Dito isso, a hidrólise tem maior potencial para gerar peptídeos bioativos, ficando à frente dos produtos feitos de proteína intacta, destacando-se a hidrólise enzimática das proteínas de soro de leite como principal metodologia para este fim, ficando à frente da hidrólise química, por exemplo (Madureira *et al.*, 2010).

Segundo estudos realizados no nosso laboratório, em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), peptídeos hidrolisados de leite, foram capazes de gerar atividade vasorrelaxante em aorta de ratos (Mellinger-Silva *et al.*, 2015). Tendo em mente os altos custos de produção de peptídeos com atividade biológica devido às altas tecnologias necessárias, este estudo visa investigar a atividade de hidrolisados de soro de leite a partir de pepsina comercial de custo reduzido e que passaram por dois processos diferentes de inativação da enzima (pH e temperatura) e tecnologias de secagem (atomização e liofilização), conforme esquematizado na **Figura 5**, além de frações que passaram por um processo que simula a digestão gastrointestinal.

Desta maneira, nossos resultados pretendem testar a hipótese de que esses peptídeos possuem ação vasodilatadora em banho de órgão isolado e que seu mecanismo de ação não se baseia somente em inibição da ECA.



**Figura 5 - Esquema de utilização do soro de leite para formação de peptídeos com atividade vascular.** O esquema apresentado acima retrata os processos acerca da utilização do soro de leite para formação de peptídeos bioativos. Primeiramente destacam-se os motivos em relação ao uso desses peptídeos seguido de sua composição e características relevantes. Após, encontram-se esquematizados os principais pontos na produção do hidrolisado até sua formação e uso para estudos de atividade biológica. Fonte: Elaborado pela autora.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito vascular de hidrolisados de proteínas de soro de leite, antes e após digestão *in vitro* em aorta e artérias mesentéricas de resistência de ratos.

### 2.2 Objetivos específicos

- a. Estabelecer o efeito do hidrolisado de proteína de soro de leite obtido por hidrólise através de pepsina comercial e secado por diferentes técnicas, selecionando a melhor fração para investigação do mecanismo de ação.
- b. Caracterizar o efeito da simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre a atividade vasodilatadora dos hidrolisados de proteína de soro de leite.
- c. Identificar a participação do endotélio vascular no efeito induzido pelo hidrolisado de maior potência e eficácia.
- d. Investigar a participação da via do óxido nítrico/guanilato ciclase solúvel/proteína quinase G no efeito vasorrelaxante induzido pelo hidrolisado.
- e. Avaliar a participação de canais de potássio no efeito vasorrelaxante induzido pelo hidrolisado.
- f. Investigar a participação da via da fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt) e espécies reativas de oxigênio (EROS) no efeito vasorrelaxante induzido pelo hidrolisado.
- g. Analisar a participação dos receptores de bradicinina e acetilcolina no efeito vasorrelaxante induzido pelo hidrolisado.
- h. Avaliar a participação de produtos da cicloxigenase no efeito vasorrelaxante induzido pelo hidrolisado.
- i. Determinar a atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA) no efeito vasorrelaxante induzido pelo hidrolisado.
- j. Investigar a participação da regulação da entrada de  $Ca^{2+}$  no meio intracelular no efeito vasorrelaxante induzido pelo hidrolisado.
- k. Caracterizar o mecanismo de ação da atividade vasodilatadora do hidrolisado de proteína de soro de leite em artérias mesentéricas de resistência, bem como as diferenças em relação aos mecanismos envolvidos em aorta.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Fornecimento dos hidrolisados de proteína do soro de leite

Os hidrolisados utilizados neste trabalho foram produzidos a partir de isolado proteico de soro de leite, pela doutoranda Luísa Ozorio, do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O hidrolisado e a padronização dos métodos de secagem, atomização e liofilização foram desenvolvidos na EMBRAPA Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ) sob orientação da Profa. Dra. Lourdes Maria Correa Cabral, do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro e da Dra. Caroline Mellinger Silva, pesquisadora da EMBRAPA, como parte da dissertação de mestrado da mesma autora. Para maior detalhamento, consultar Mellinger-Silva et al. (2015) e Ozorio (2015).

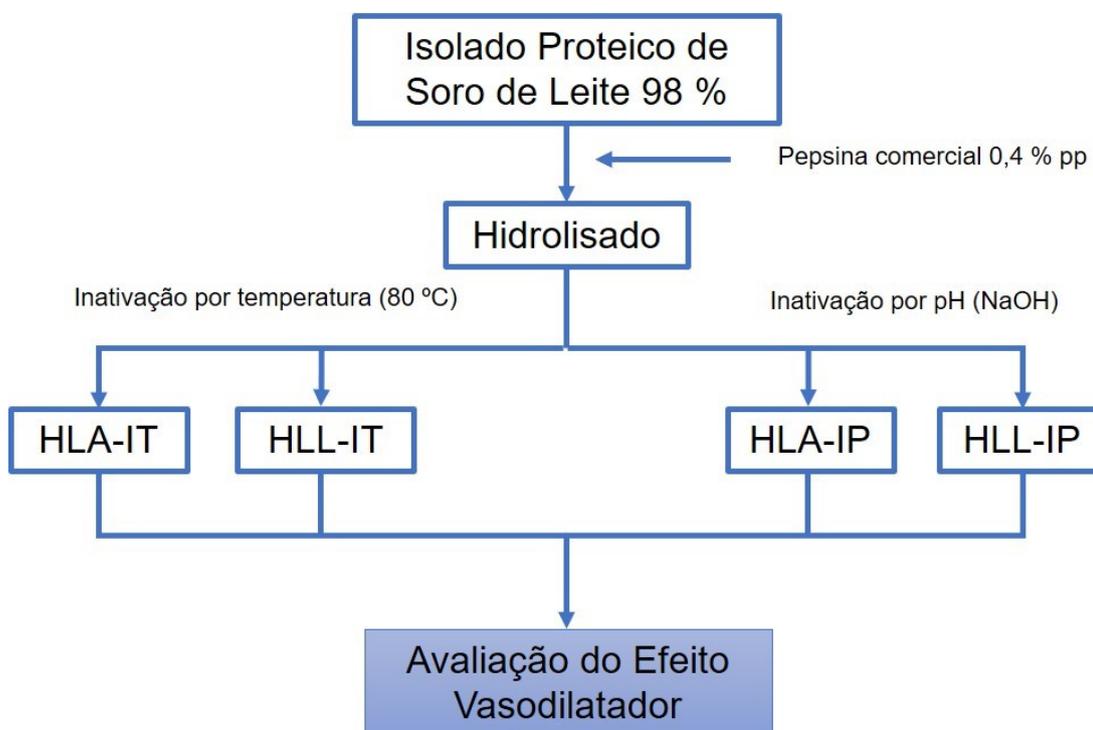
A partir da obtenção dos hidrolisados com atividade vasodilatadora em estudos prévios, como demonstrado em Mellinger-Silva *et al.* (2015), iniciou-se o processo de digestão *in vitro* dos hidrolisados, que também foram analisados no presente trabalho quanto à atividade sobre a função vascular.

##### 3.1.1 Preparo do hidrolisado do soro de leite

Para produção do hidrolisado utilizou-se isolado proteico de soro de leite, contendo 98% de proteínas, solubilizado em ácido clorídrico (HCl 1 M) (1,25%, p/v). Em seguida, realizou-se a hidrólise com pepsina comercial em diferentes concentrações (0,4%; 0,8%; 1,2%; 1,6% p/p) até obtenção da concentração enzima:substrato com perfil mais favorável para produção de hidrolisados com atividade vascular (0,4% p/p). Após a hidrólise, o preparado foi colocado em banho maria a 80 °C durante 5 minutos (inativação térmica da pepsina), ou foi adicionado NaOH 5 M (inativação da pepsina por pH) para que a enzima fosse inativada, seguido de resfriamento das amostras em água corrente para serem congeladas e liofilizadas, conforme diagrama apresentado na **Figura 6**. Para maiores detalhes ver Ozorio (2015).

Para secagem do hidrolisado de soro de leite utilizou-se dois processos distintos. A liofilização consistiu no congelamento das amostras, seguido de liofilização (-50 °C) por 48 h em liofilizador (modelo L101, LioTop, São Carlos, SP). Na secagem por atomização, o soro foi pulverizado para dentro de uma câmara sob uma vazão de ar comprimido de 3,5 Bar, vácuo de -60 mBar, temperatura de entrada ~190 °C e temperatura de saída em torno de 85 °C. A secagem foi realizada em atomizador Buchi MiniSpray Dryer 190 (Büchi Labortechnik, Flawil, Suíça). Para as amostras que foram secadas por liofilização em que a pepsina foi inativada por temperatura deu-se o nome de Hidrolisado de Soro de Leite Liofilizado Inativado por Temperatura (HLL-IT), e nos que a inativação foi feita por aumento de pH Hidrolisado de Soro de Leite Liofilizado Inativado por pH (HLL-IP). Já nos que foram secos por atomização, Hidrolisado de Soro de Leite Atomizado Inativado por Temperatura (HLA-IT) e inativados por pH, Hidrolisado de Soro de Leite Atomizado Inativado por pH (HLA-IP)

Para os experimentos em banho de órgão isolado, os hidrolisados aqui citados foram solubilizados em água destilada.



**Figura 6 - Fluxograma do processo de produção dos hidrolisados.** HLA-IT: Hidrolisado de soro de leite atomizado inativado por temperatura; HLL-IT: Hidrolisado de soro de leite liofilizado inativado por temperatura; HLA-IP: Hidrolisado de soro de leite atomizado inativado por pH; HLL-IP: Hidrolisado de soro de leite liofilizado inativado por pH. Para detalhes, ver Ozorio (2015). Fonte: autora.

### 3.1.2 Digestão *in vitro* do hidrolisado de soro de leite

Para verificar os efeitos do trato digestório sobre o hidrolisado, utilizou-se um processo *in vitro*, em que o HLA inativado por temperatura, escolhido devido ao melhor custo do processo de produção e potência da atividade vasorrelaxante, foi submetido a protocolos experimentais que simulam a digestão, baseados em um consórcio internacional, chamado COST INFOGEST (Minekus *et al.*, 2014), conforme esquema apresentado na **Figura 7**.

Na primeira etapa, que simula a fase oral da digestão, o HLA foi incubado com amilase salivar (1,87 g de amostra para 10 mL de saliva). A solução obtida foi diluída em água destilada com pH ajustado até 2,0 e aquecida a 37 °C.

Na segunda etapa, simulando a fase gástrica da digestão, a solução obtida na primeira etapa foi incubada com pepsina, mantendo-se em agitação magnética sob temperatura de 37 °C durante 1 h. Alíquotas desta parte do processo foram obtidas a fim de avaliar se o hidrolisado mantém atividade vasorrelaxante e qual sua amplitude, após passar somente pela digestão gástrica. A essas amostras se deu o nome de Hidrolisado de Digestão Gástrica (HDG).

Na terceira e última etapa, que visou mimetizar a fase entérica da digestão, ajustou-se o pH da solução obtida na segunda etapa para 7,0 com NaHCO<sub>3</sub>. Em seguida, adicionou-se pancreatina e sais biliares, mantendo-se a 37 °C sob agitação magnética durante 2 h com controle de pH (~7,0–7,5). Após a terceira etapa, a solução foi congelada e posteriormente liofilizada ou atomizada por processo descrito no item 3.1.1, sendo denominado, após essa fase, de Hidrolisado de Digestão Entérica (HDE).

### 3.2 Drogas

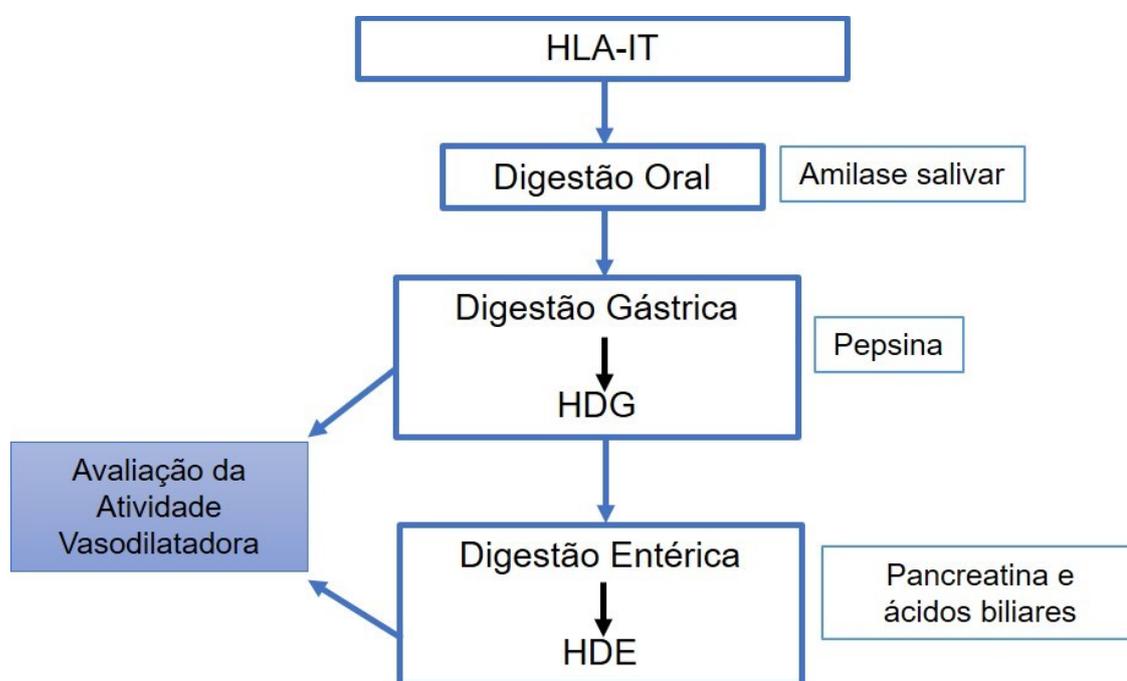
As drogas utilizadas para este estudo foram: acetilcolina, angiotensina I, apamina, apocinina, atropina, carboxi-PTIO (C-PTIO), dorsomorfina, 4-aminopiridina (4-AP), fenilefrina, glibenclamida, HOE-140, indometacina, N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3a] quinoxalina-1 (ODQ), Rp-8-Br-PET-cGMPS (Rp-PET), tempol, tetraetilamônio (TEA), TRAM-34 e wortmanina, adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MI, EUA).

Em sua maioria, as soluções para estoque foram dissolvidas em água destilada e diluídas em solução nutritiva para uso, com exceção de glibenclamida, ODQ,

wortmanina e apocinina que foram solubilizadas em DMSO, e da apamina, preparada em HCl 0,1 N.

O isolado proteico de soro de leite foi cedido pela empresa Alibra Ingredientes Ltda (Campinas, SP, Brasil), e a pepsina utilizada para hidrolisar esse isolado foi adquirida de Bela Vista Produtos Enzimáticos Ind. e Com. Ltda (Alto Bela Vista, SC, Brasil).

Os anestésicos cetamina e xilazina (Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) foram adquiridos e fornecidos pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC, com recursos provenientes da CAPES.



**Figura 7 - Fluxograma do processo de digestão de HLA inativado por temperatura.** HLA-IT: Hidrolisado de soro de leite atomizado inativado por temperatura; HDG: Hidrolisado de digestão gástrica; HDE: Hidrolisado de digestão entérica. Fonte: autora

### 3.3 Animais

Para os estudos realizados neste trabalho foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus* linhagem Wistar, com a idade de 3 a 4 meses, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os experimentos foram realizados com machos. Estes animais foram acondicionados no biotério experimental do Laboratório de Biologia Cardiovascular, em gaiolas ventiladas, com

controle de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e ciclo claro/escuro (12/12 h), com acesso à água e ração *ad libitum*.

Os protocolos experimentais empregados neste estudo foram aprovados pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC), sob protocolo nº 5371190815.

### 3.4 Preparações vasculares: montagem e avaliação da viabilidade

#### 3.4.1 Anéis de aorta

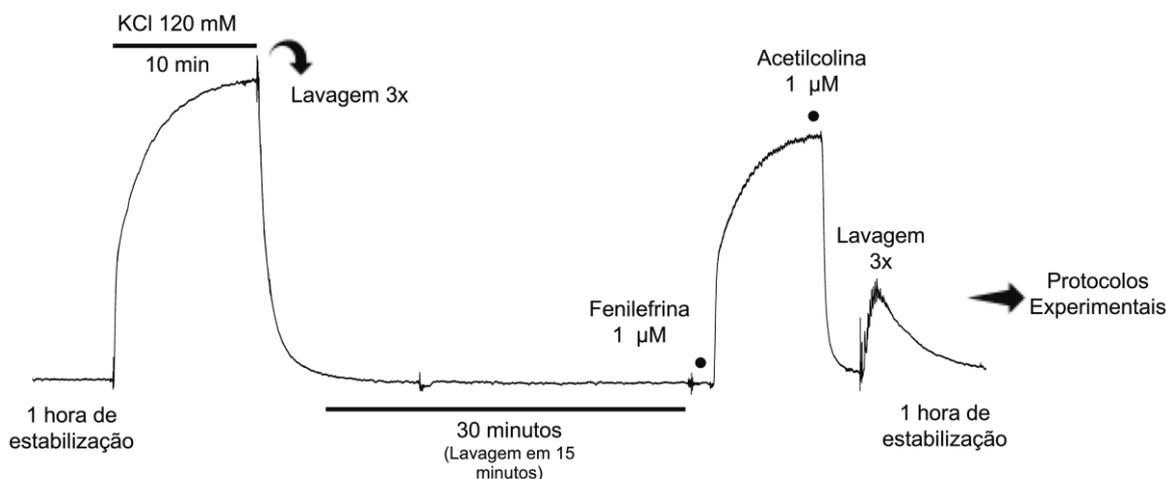
Os animais foram anestesiados com uma injeção de cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente) pela via intraperitoneal. Para confirmação da anestesia, verificou-se a ausência de reflexos caudais, oculares e nas patas.

Uma vez obtido o plano anestésico, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e foi realizada uma incisão partindo do abdome até o tórax, expondo a camada muscular. Realizou-se então uma toracotomia, evidenciando-se os órgãos da cavidade torácica. Após exsanguinação através do coração e retirada dos órgãos adjacentes, a artéria aorta foi exposta e isolada, sendo em seguida mantida em placa de Petri contendo solução nutritiva (composta por, em mM: NaCl, 131,3; KCl, 4,7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,18;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,17;  $\text{NaHCO}_3$ , 14,9; dextrose, 5,5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,6; EDTA, 0,03). O tecido perivascular (PVAT), bem como os demais tecidos adjacentes foram retirados e o vaso foi seccionado em anéis de aproximadamente 5 mm. Em alguns experimentos o tecido perivascular foi mantido e os anéis foram acondicionados no sistema da mesma maneira descrita a seguir.

Os anéis de aorta foram fixados no banho de órgãos através de hastes metálicas inseridas no lúmen das artérias, com o objetivo de mensurar a tensão isométrica do vaso. Estas hastes foram conectadas em um transdutor de força acoplado a um polígrafo digital e amplificador de sinal (PowerLab, AD Instruments, Austrália). O software para registro da variação de tensão utilizado foi o LabChart versão 8.0 para Windows (ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Durante todo o protocolo experimental a artéria foi mantida neste sistema de banho de órgão isolado, com solução nutritiva a 37 °C e borbulhamento contínuo com mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ).

Em nossos experimentos, os anéis de aorta foram submetidos à uma tensão de 3 g. Antes do início dos protocolos experimentais, os anéis foram mantidos em

repouso durante uma hora para estabilização, com realização de trocas de solução nutritiva e ajuste de tensão (se necessário) a cada 15 minutos, seguindo protocolo padrão, conforme registro típico apresentado na **Figura 8** e descrito a seguir.



**Figura 8 - Registro típico apresentando o protocolo experimental padrão utilizado para experimentos em anéis de aorta.** O protocolo experimental se inicia com a estabilização dos anéis no sistema de órgão isolado após seu isolamento. O período de estabilização ocorre durante 1 h, e em seguida é adicionado à cuba uma solução de KCl 120 mM, o que gera uma resposta contrátil. Essa contração é mantida por aproximadamente 10 minutos, seguida de 3 lavagens com solução nutritiva. Após, ocorre outro período de estabilização, com troca de líquido nutritivo no intervalo de 15 minutos. Em seguida, é feita incubação com fenilefrina (1  $\mu$ M), estabilizado por 10 minutos em platô contrátil e em seguida é incubado com acetilcolina (1  $\mu$ M), que irá gerar um relaxamento. É realizada uma lavagem (3x) seguido de novo tempo de estabilização de 1 h que antecede os protocolos experimentais.

Para avaliação da viabilidade do tecido utilizou-se uma solução nutritiva modificada, contendo 120 mM de KCl, que gerou um platô contrátil que foi mantido durante 10 minutos. Após esse período, as cubas foram lavadas 3 vezes com solução nutritiva regular, seguindo-se um novo período de estabilização de 30 minutos, com lavagem em 15 minutos.

Para verificar-se a integridade do endotélio, as preparações foram incubadas com fenilefrina (1  $\mu$ M), um agonista de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, durante 10 minutos, seguida da adição de um agonista muscarínico (acetilcolina 1  $\mu$ M). As preparações que alcançaram um relaxamento de no mínimo 80% em relação à contração induzida pela fenilefrina foram consideradas como possuindo endotélio funcional. Para protocolos em que se fez necessária a ausência de endotélio funcional, friccionou-se uma haste metálica no interior do vaso antes de acoplá-lo ao sistema, sendo utilizado

apenas os anéis que não apresentaram resposta vasodilatadora para a acetilcolina 1  $\mu$ M.

Após esse protocolo padrão inicial, os anéis foram novamente estabilizados em tensão basal de 3 g durante 60 minutos, com troca de solução nutritiva a cada 15 minutos, dando continuidade ao protocolo escolhido para cada preparação.

#### 3.4.2 Anéis em artérias mesentéricas de resistência

Para retirada e excisão das artérias mesentéricas de resistência os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente) pela via intraperitoneal.

Após obtenção do plano anestésico, verificado através da ausência de reflexos oculares e nas patas, foi realizada uma incisão na região abdominal para acesso aos órgãos presentes nessa cavidade. O intestino foi retirado e limpo em um frasco contendo solução nutritiva. As alças intestinais foram dispostas em uma placa de Petri de maneira a expor os ramos vasculares do leito mesentérico.

Com o auxílio de uma lupa e pinças oftálmicas, retirou-se o tecido perivascular adjacente aos vasos, expondo-se artérias de primeira e segunda ordem a partir da artéria mesentérica superior. Realizou-se uma pequena incisão na artéria escolhida e inseriu-se um fio de aço inoxidável no lúmen do vaso, possibilitando sua retirada e isolamento do restante do leito mesentérico.

Após isoladas, as artérias foram acomodadas em uma placa de Petri de fundo preto para melhor visualização, contendo solução nutritiva e foram seccionadas em anéis de aproximadamente 2 mm. Esses anéis foram posicionados, novamente com auxílio da lupa, no interior de uma câmara contendo solução nutritiva, acoplada à um miógrafo de fio (Danish Myo Technology, Aarhus, Dinamarca). Fixou-se os anéis na câmara através de dois fios que atravessam o lúmen do vaso e são presos com auxílio de quatro parafusos, para registro de tensão isométrica através do sistema de aquisição de dados, como descrito para experimentos em aorta. As câmaras do miógrafo foram mantidas com solução nutritiva a 37 °C e aeradas com carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) durante todo o protocolo experimental.

Os anéis foram submetidos à um período de estabilização de 45 minutos em que foi mantida a tensão do vaso em 7,5 mN, com troca de solução nutritiva a cada 15 minutos, seguido de administração de solução nutritiva modificada contendo KCl 120

mM. A presença do endotélio foi confirmada após 30 minutos de estabilização, com adição de fenilefrina e acetilcolina 10  $\mu$ M, semelhante ao protocolo em aorta isolada. Apenas anéis que atingiram >80% de resposta vasodilatadora foram utilizados em nosso estudo.

### 3.5 Avaliação do efeito vasodilatador dos hidrolisados

Para investigar a atividade vasodilatadora dos hidrolisados estudados neste trabalho, tanto em aorta quanto em pequenos vasos, utilizou-se artérias com e sem endotélio funcional, para verificação da participação do mesmo no efeito vasorrelaxante.

Após o período de estabilização, incubou-se os anéis com fenilefrina (1  $\mu$ M em aorta e 10  $\mu$ M em pequenos vasos) para obtenção de uma resposta contrátil. Depois de 10 minutos da adição de fenilefrina, durante a fase tônica de resposta contrátil, os anéis de aorta foram expostos a concentrações crescentes e cumulativas de HLA ou HLL (tanto os em que a pepsina foi inativada por temperatura quanto por pH), nas concentrações de 1, 3, 5 e 10 mg/mL. Seguindo o mesmo protocolo experimental, os preparados de HDG e HDE (concentrações finais nas cubas: 3, 10, 30, 50 e 100  $\mu$ g/mL) foram adicionadas tanto em preparações de aorta como de artérias de resistência pré-contraídas por fenilefrina, para avaliação e comparação da curva concentração resposta (CCR) de relaxamento dos diferentes vasos. Cada preparação foi exposta a apenas um dos hidrolisados supracitados.

### 3.6 Protocolos de investigação do mecanismo de ação envolvido no efeito vasorrelaxante do HDE em anéis de aorta

Para escolha do hidrolisado para investigação do mecanismo de ação em aorta levou-se em consideração aquele de maior eficácia, de acordo com o relaxamento máximo ( $R_{\text{máx}}$ ) obtido e a concentração efetiva mediana ( $CE_{50}$ ).

Após os períodos de estabilização e verificação do endotélio os anéis foram incubados pelo tempo de 30 minutos em solução nutritiva na presença de fármacos inibidores de diversas vias intracelulares, conforme descrito nos próximos itens. Cada preparação foi utilizada para avaliação de apenas um inibidor. Após o período de incubação com os inibidores, realizou-se adição de fenilefrina (1  $\mu$ M) para obtenção

de resposta contrátil e CCR de relaxamento para HDE nas concentrações de 3, 10, 30, 50 e 100 µg/mL.

### 3.6.1 Avaliação da participação da via do NO/guanilato-ciclase

Para investigar a participação da via do NO/guanilato-ciclase no relaxamento obtido pelo hidrolisado em aorta, seguindo tempo de incubação descrito anteriormente, utilizou-se os seguintes fármacos: c-PTIO (300 µM), sequestrador do óxido nítrico; L-NAME (100 µM), inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase; ODQ (10 µM), inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel, ou Rp-PET (100 µM), inibidor seletivo da proteína cinase G.

### 3.6.2 Avaliação da participação de canais de potássio

Para investigar se a abertura de canais de potássio estaria relacionada com o relaxamento gerado pelo HDE, utilizou-se os seguintes fármacos em aorta: TEA (10 mM), bloqueador não seletivo de canais de potássio ativados por  $Ca^{2+}$ , glibenclamida (10 µM), bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP tipo Kir6.1, 4-aminopiridina (1 mM), bloqueador de canais de potássio dependente de voltagem, TRAM-34 (10 µM), bloqueador de canais de potássio ativados por  $Ca^{2+}$  de condutância intermediária, e apamina (0,1 µM), inibidor de canais de potássio ativados por  $Ca^{2+}$  de condutância baixa.

### 3.6.3 Avaliação da participação da via da fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3k/Akt) e espécies reativas de oxigênio (EROS)

Para avaliar a participação de outras vias, como a da Akt/PI3K e das espécies reativas de oxigênio no relaxamento causado por HDE, foram utilizados em aorta: wortmanina (0,5 µM), inibidor seletivo não competitivo e irreversível da PI3K, dorsomorfina (2 µM), inibidor seletivo da AMPK, tempol (0,3 mM), sequestrador de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), e apocinina (100 µM), sequestrador de espécies reativas em geral.

#### 3.6.4 Avaliação da participação dos receptores de bradicinina e acetilcolina

Para avaliar a participação da via de relaxamento tanto da bradicinina, quanto da acetilcolina, utilizou-se atropina (1  $\mu\text{M}$ ), antagonista competitivo reversível de receptores para acetilcolina e HOE-140 (1  $\mu\text{M}$ ), antagonista competitivo reversível seletivo para receptores  $B_2$  da bradicinina.

#### 3.6.5 Avaliação da participação de produtos da ciclooxigenase

Com o objetivo de avaliar se o efeito vasorrelaxante do HDE depende de substâncias vasorrelaxantes derivadas do ácido araquidônico, utilizou-se o fármaco indometacina (10  $\mu\text{M}$ ), inibidor não-seletivo das ciclooxigenases.

#### 3.6.6 Investigação do efeito inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) na atividade vasorrelaxante do HDE

Com o objetivo de avaliar se HDE possui atividade inibidora da ECA, como diversos outros peptídeos de fonte alimentar, após período de estabilização de 1 h inicial e verificação da presença do endotélio funcional, incubou-se anéis de aorta com o HDE na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  durante os últimos 30 minutos do segundo período de estabilização. Seguido da incubação com o HDE, as preparações foram expostas à angiotensina I na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . O efeito contrátil induzido pela angiotensina I também foi avaliado em preparações controle, as quais foram pré-incubadas apenas com veículo durante 30 minutos.

#### 3.6.7 Investigação da participação da regulação da entrada de $\text{Ca}^{2+}$ no meio intracelular na atividade vasorrelaxante do HDE

Nesses experimentos, após o período de estabilização e a verificação da presença do endotélio funcional, os anéis de aorta foram mantidos em solução nutritiva regular durante 30 minutos, seguida da incubação em solução nutritiva despolarizante sem cálcio (composta por, em mM: NaCl, 71,4; KCl, 59,8;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,18;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,17;  $\text{NaHCO}_3$ , 14,9; dextrose, 5,5; EDTA, 0,03) por mais 30 minutos, a fim de esgotar os estoques de cálcio intracelular. Em seguida,

concentrações crescentes e cumulativas de  $\text{CaCl}_2$  (1 nM a 30  $\mu\text{M}$ ) foram adicionadas as preparações para registro das respostas contráteis evocadas pela entrada de cálcio no meio intracelular.

A seguir, os anéis de aorta passaram por mais um período de estabilização de 1h, sendo os últimos 30 minutos novamente em presença do líquido nutritivo despolarizante sem  $\text{Ca}^{2+}$  porém com incubação do HDE na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Após esse período de incubação, realizou-se outra CCR de contração para  $\text{CaCl}_2$ .

### 3.7 Protocolos de investigação do mecanismo de ação envolvido no efeito vasorrelaxante do HDE em artérias de resistência

Para investigação do mecanismo de ação do HDE em artérias de resistência, utilizou-se um protocolo semelhante ao realizado em aorta, em que após os períodos de estabilização e verificação do endotélio os anéis foram incubados pelo tempo de 30 minutos em solução nutritiva na presença dos fármacos inibidores de algumas vias intracelulares previamente descritas. Cada anel foi utilizado para avaliação de apenas um inibidor. Após o período de incubação com os inibidores, realizou-se adição de fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ) para obtenção de resposta contrátil, seguido da adição do HDE nas concentrações de 3, 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , para registro da CCR de relaxamento.

As drogas utilizadas em artérias de resistência para investigar a participação da via do NO/guanilato ciclase foram o L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), e o ODQ (10  $\mu\text{M}$ ). A participação dos canais de potássio foi avaliada com o TEA (10 mM), a glibenclamida (10  $\mu\text{M}$ ), e a 4-aminopiridina (1 mM). Para avaliar a participação de substâncias vasorrelaxante derivadas do ácido araquidônico foi utilizado o fármaco indometacina (10  $\mu\text{M}$ ).

Para fins de comparação, também foi avaliado o efeito vasodilatador de acetilcolina (1 nM a 30  $\mu\text{M}$ ) em preparações de artérias de resistência estimuladas por fenilefrina e previamente incubadas com L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), ODQ (10  $\mu\text{M}$ ), TEA (10 mM), indometacina (10  $\mu\text{M}$ ) e 4-aminopiridina (1 mM).

### 3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O número experimental variou entre 5 e 7 preparações para cada grupo, obtidas de animais diferentes. As comparações entre grupos foram realizadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni, ou pelo teste *t* de *Student* quando apropriado. Valores de  $p > 0,05$  foram considerados significativos. Valores de EC<sub>50</sub> foram calculados através do mesmo software utilizado para os gráficos e análise estatística, GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA).

## 4 RESULTADOS

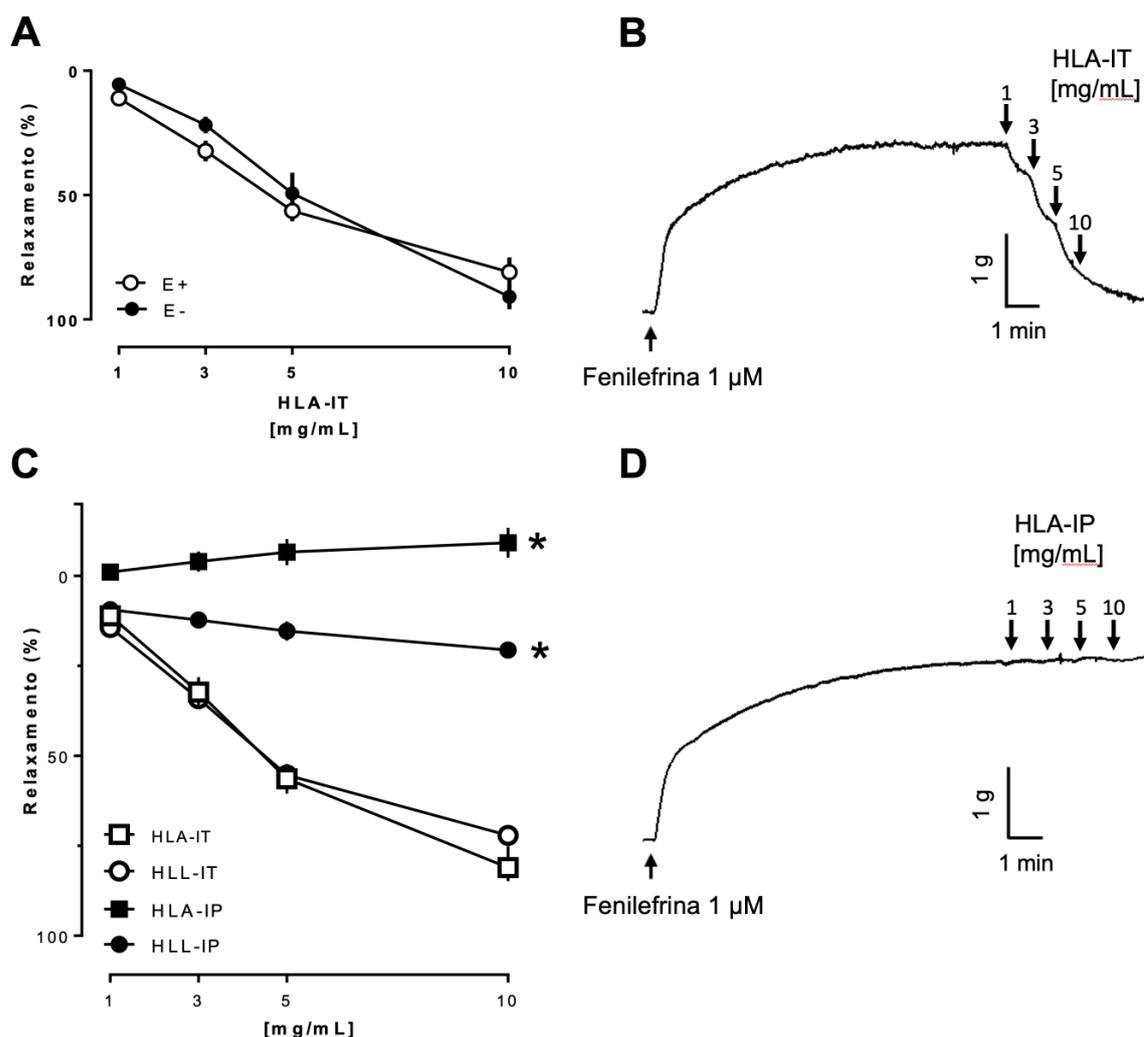
### 4.1 Atividade vasorrelaxante de hidrolisado de proteína de soro de leite em aorta

O hidrolisado de proteínas de soro de leite obtido através de hidrólise por pepsina comercial, que passou pela secagem por atomização e inativação da enzima por temperatura (HLA-IT), foi capaz de gerar relaxamento dependente de concentração em aorta de ratos, nas concentrações de 1, 3, 5 e 10 mg/mL, conforme mostrado nas **Figura 9A e B**, atingindo uma  $R_{\text{máx}}$  de  $81 \pm 14\%$ . Além disso, esse relaxamento mostrou-se independente de endotélio, uma vez que não houve alteração no efeito vasorrelaxante após a remoção mecânica da função do endotélio, mantendo-se uma  $R_{\text{máx}}$  de  $90 \pm 11\%$  (**Figura 9A**).

No entanto, o processo de produção do hidrolisado foi capaz de afetar diretamente a atividade vasorrelaxante. Enquanto os hidrolisados que passaram por processo de inativação da enzima por aumento de temperatura (80 °C), tanto o atomizado quanto o liofilizado (HLA-IT e HLL-IT), apresentaram alta eficácia quanto à capacidade de gerar relaxamento, atingindo uma  $R_{\text{máx}}$  de  $81 \pm 14$  e  $72 \pm 6 \%$ , respectivamente. As amostras que passaram por inativação através de mudança de pH (adição de NaOH) tiveram uma menor eficácia, obtendo uma  $R_{\text{máx}}$  de  $20 \pm 5 \%$ , no caso da liofilizada (HLL-IP), ou foram incapazes de causar relaxamento, como ocorreu com a preparação atomizada (HLA-IP), conforme mostrado nas **Figura 9C e D**.

#### 4.1.1 Influência da digestão *in vitro* sobre a atividade vasorrelaxante do HLA-IT em aorta

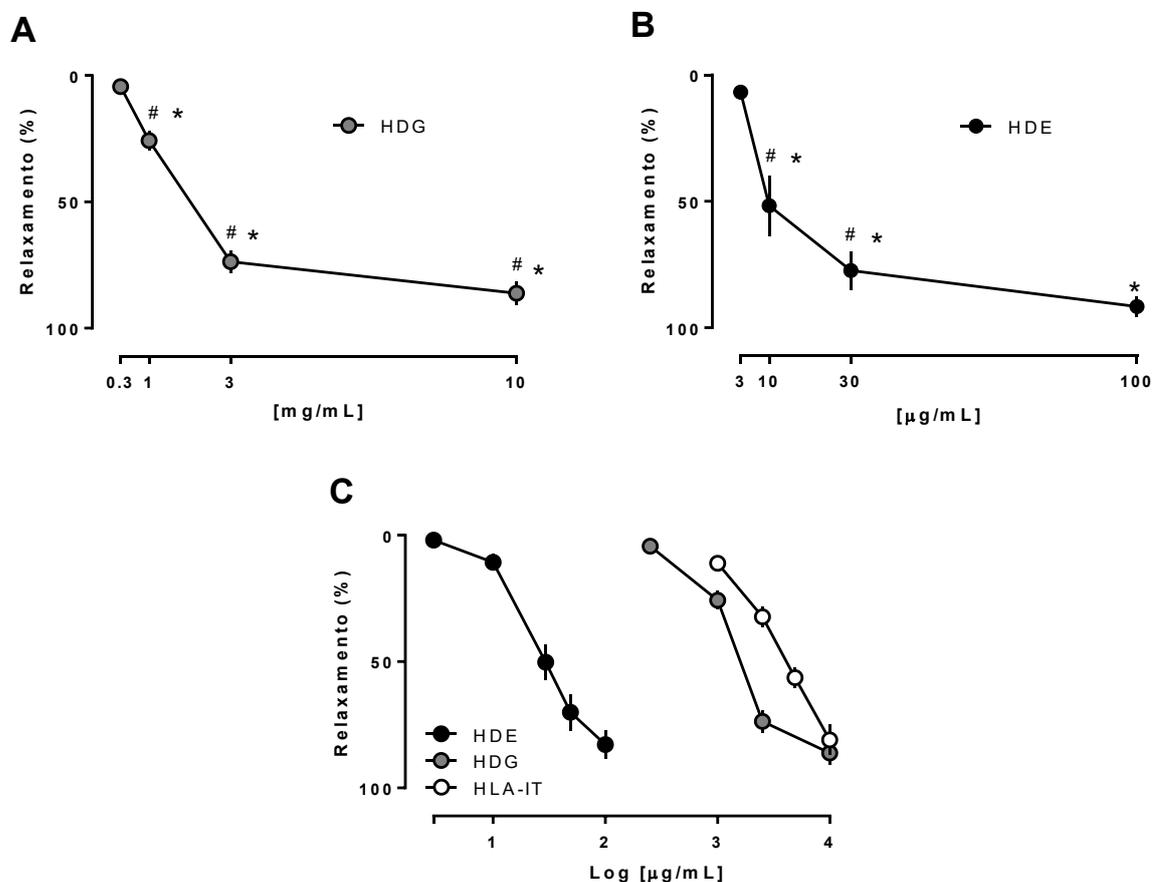
A incubação do HDG, produto da hidrólise do HLA-IT pela pepsina, utilizada para simular a etapa gástrica de digestão, apresentou efeito vasodilatador dependente da dose em concentrações muito semelhantes ao HLA-IT (**Figuras 10A e 10C**). Por outro lado, a adição do HDE (produto da digestão entérica do HLA-IT) em preparações de aorta previamente contraídas por fenilefrina resultou em efeito vasodilatador significativo mesmo quando concentrações muito menores (na faixa de 3 a 100  $\mu\text{g}$ ) foram utilizadas (**Figura 10B**). O aumento na potência do HDE em relação ao HLA-IT pode ser melhor observado através da análise do deslocamento para a esquerda na curva concentração-resposta de relaxamento obtida (**Figura 10C**).



**Figura 9 - Influência do método de inativação da pepsina sobre o relaxamento induzido pelos hidrolisados de soro de leite em anéis de aorta de rato.** (A) CCR de relaxamento induzida por HLA-IT em preparações de anéis de aorta com (E+) e sem (E-) endotélio funcional. (B) Registro típico da atividade vasorrelaxante de HLA-IT em anel de aorta com endotélio funcional. (C) CCR de relaxamento induzida por hidrolisado de soro de leite atomizado (HLA) ou liofilizado (HLL) inativados por temperatura ou pH em preparações com endotélio funcional. (D) Registro de um experimento mostrando ausência de efeito vasodilatador após incubação do HLA-IP em anéis de aorta com endotélio funcional. Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo). \* $p < 0,05$  comparado ao grupo HLA-IT ou HLL-IT.

Ao comparar-se o HLA-IT com os hidrolisados que passaram pela digestão *in vitro*, pode-se observar que HDE apresentou maior potência obtendo um valor de  $EC_{50}$  de 4,36 (0,47-11,98 µg/mL), seguido de HDE, que obteve um valor de  $EC_{50}$  de 1,78 (1,15-2,81 mg/mL). Comparando-se o  $pD_2$ , atingiu-se valores de  $LogEC_{50}$  de 1,5 para HDE, seguido de  $LogEC_{50}$  de 3,0 para o HDG e  $LogEC_{50}$  de 3,7 para o HLA-IT,

conforme demonstrado na **Figura 10C**. Sendo assim, utilizou-se o HDE para continuação dos estudos de mecanismo de ação.



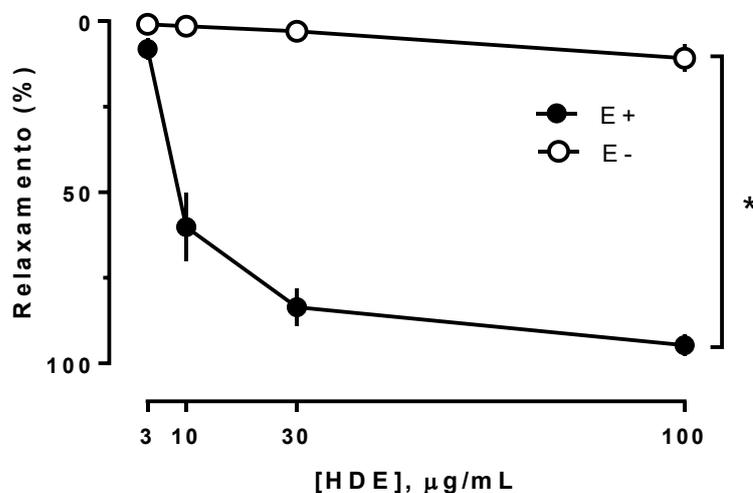
**Figura 10 - Digestão in vitro do HLA-IT levou ao aumento de potência vasorrelaxante.** CCR de relaxamento induzida pelo HDG (A) ou pelo HDE (B), e comparação da atividade vasorrelaxante do HDE, HDG e HLA-IT em preparações de anel de aorta de rato com endotélio funcional (C). Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo). \* indica  $p < 0,05$  em relação ao tônus basal (antes da adição do hidrolisado). # indica  $p < 0,05$  em relação ao relaxamento induzido pela concentração anterior.

## 4.2 Mecanismo de ação da atividade vasorrelaxante do HDE em aorta

### 4.2.1 Envolvimento de fatores endoteliais no relaxamento exercido pelo HDE em aorta

Após a remoção mecânica do endotélio vascular para avaliar a participação de fatores endoteliais no relaxamento causado pelo HDE, na **Figura 11** pode-se observar que houve perda quase total de atividade vasorrelaxante do hidrolisado, comparado

ao efeito gerado em anéis mantidos com endotélio funcional ( $R_{\text{máx}}$  de  $10 \pm 9\%$  e  $94 \pm 7\%$  em preparações sem e com endotélio funcional, respectivamente).

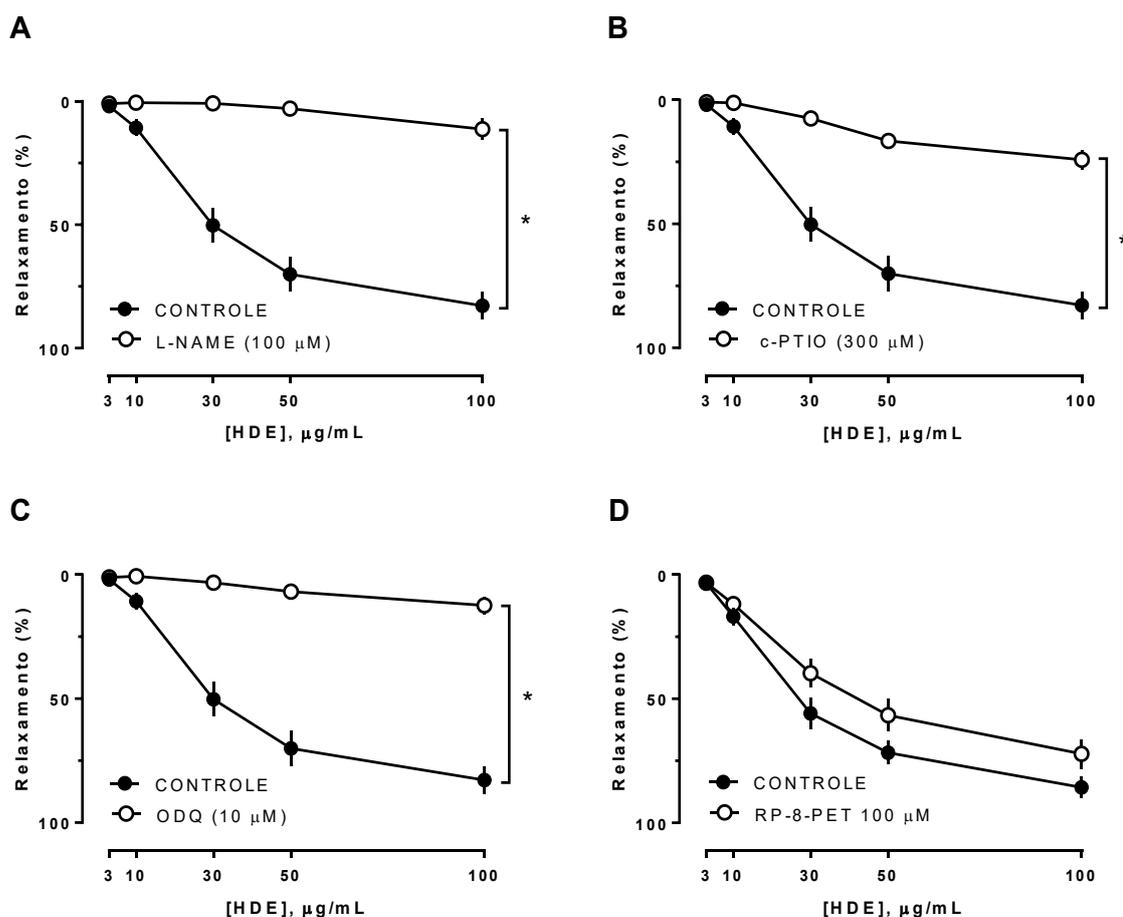


**Figura 11 - Remoção mecânica do endotélio funcional diminui significativamente a atividade vasorrelaxante do HDE.** CCR de relaxamento induzida pelo HDE em preparação de anéis de aorta, previamente contraídas com fenilefrina. Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo). \* indica valor de  $p < 0,05$  comparado ao grupo E+.

#### 4.2.2 Contribuição da via do NO/guanilato-ciclase no relaxamento exercido pelo HDE em aorta

Ao incubar-se a preparação de anel de aorta com um inibidor não seletivo da enzima oxido nítrico sintase, L-NAME, a atividade vasorrelaxante do HDE foi quase totalmente abolida ( $R_{\text{máx}}$  de  $11 \pm 4\%$ ), conforme mostrado na **Figura 12A**. O mesmo ocorreu ao utilizar-se um sequestrador de NO, o c-PTIO, condição em que também se observou perda de efeito vasorrelaxante induzido pelo HDE ( $R_{\text{máx}}$  de  $24 \pm 3\%$ ), como demonstrado na **Figura 12B**.

Seguindo na via de relaxamento do NO, o inibidor da guanilato ciclase solúvel OQD, também aboliu quase totalmente o relaxamento induzido pelo HDE ( $R_{\text{máx}}$  de  $12 \pm 3\%$ ; **Figura 12C**). Entretanto, o inibidor da PKG RP-8-PET não foi capaz de interferir na atividade vasorrelaxante do HDE (**Figura 12D**).



**Figura 12 - Via do NO/guanilato ciclase participa do relaxamento produzido pelo HDE em aorta.**

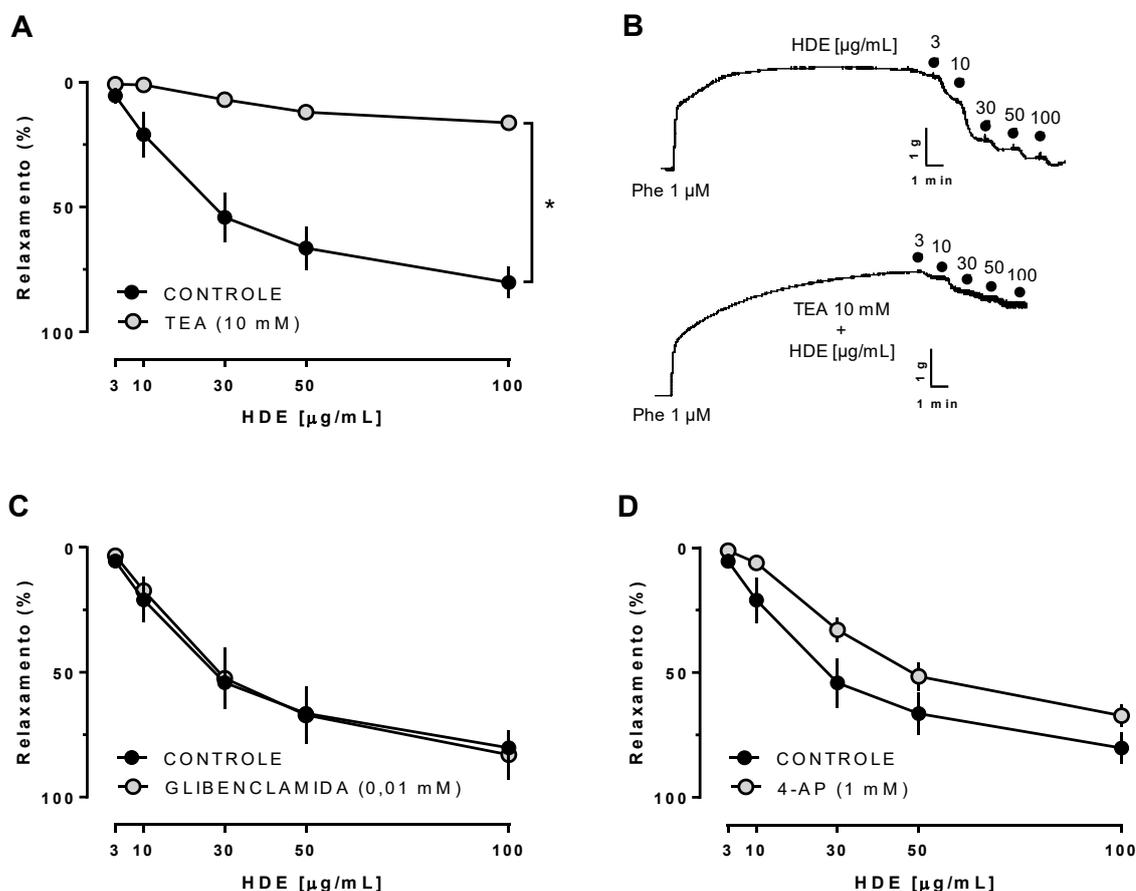
Relaxamento induzido pelo HDE na ausência (Controle, círculos fechados em todos os gráficos) ou após incubação de L-NAME (A), c-PTIO (B), ODQ (C) ou RP-8-PET (D), respectivamente. Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo). \* indica  $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle.

#### 4.2.3 Participação de canais de potássio no relaxamento produzido pelo HDE em aorta

A presença do inibidor de canais de potássio do tipo sensíveis ao ATP, glibenclamida, não foi capaz de alterar a atividade vasorrelaxante do HDE, semelhante ao que ocorreu em preparações que expostas ao inibidor de canais de potássio dependentes de voltagem, a 4-AP (**Figuras 13C e D**, respectivamente).

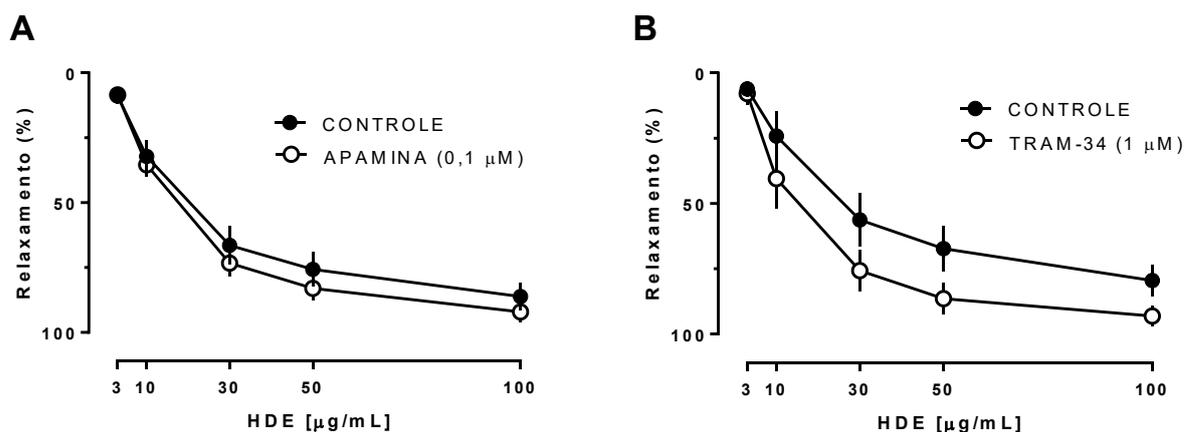
Por outro lado, o inibidor não seletivo de canais de potássio sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , TEA, diminuiu significativamente a atividade vasorrelaxante do HDE reduzindo a  $R_{\text{máx}}$

de  $80 \pm 6\%$  (grupo controle) para  $16 \pm 1\%$ , conforme demonstrado nas **Figuras 13A** e **B**.



**Figura 13 - Bloqueio não seletivo de canais de potássio sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  inibe relaxamento exercido pelo HDE.** Relaxamento induzido pelo HDE na ausência (Controle, círculos fechados em A, C e D) ou após incubação de TEA (**A**), glibenclamida (**C**) ou 4-AP (**D**) em preparações de anel de aorta com endotélio funcional. Registros típicos do relaxamento vascular induzido pelo HDE em anéis de aorta com endotélio funcional, na ausência (acima) e após incubação de TEA (abaixo) são mostrados no painel **B**. Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo). \* indica  $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle.

No que tange a participação de canais de potássio sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , do tipo de condutância intermediária e baixa, utilizou-se os inibidores TRAM-34 e apamina, respectivamente. Conforme demonstrado nas **Figuras 14A** e **B**, nenhuma das duas drogas foi capaz de interferir na ação vasodilatadora do HDE.



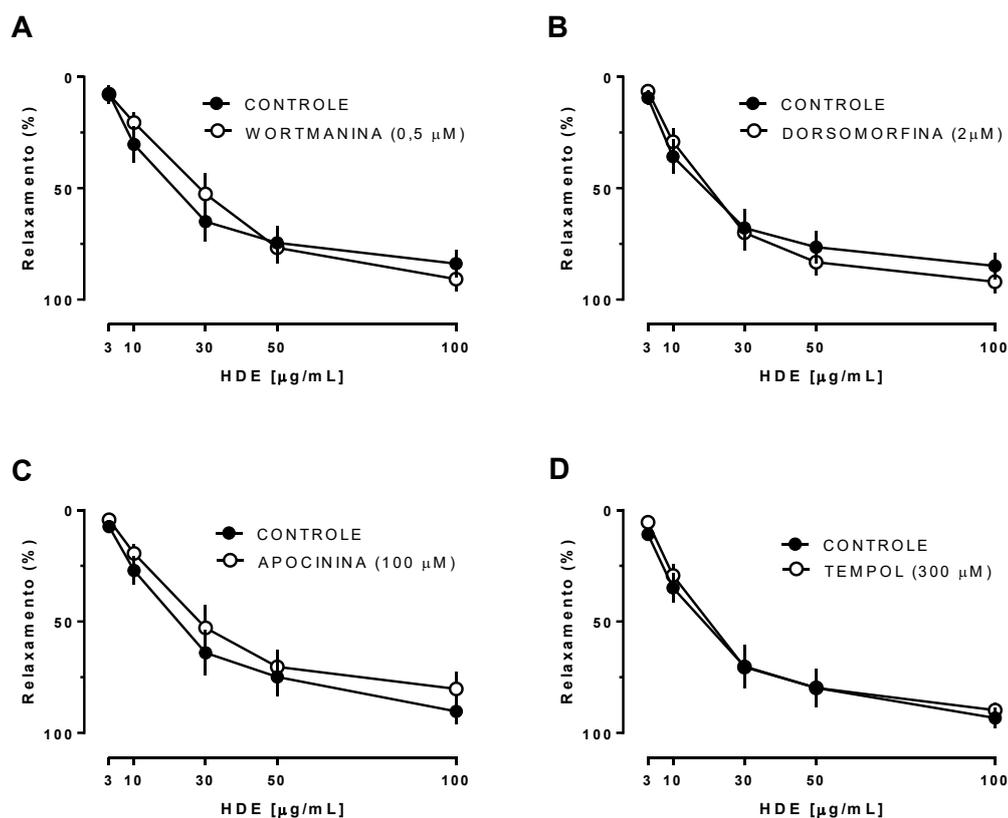
**Figura 14 - Canais de potássio sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  de condutância intermediária e baixa não influenciam o relaxamento produzido pelo HDE.** CCR de relaxamento para o HDE em anéis de aorta com endotélio funcional, na presença e ausência dos inibidores de canais de potássio sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , TRAM-34 (**A**) e apamina (**B**). Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo).

#### 4.2.4 As vias Akt/PI3K e das espécies reativas de oxigênio não participam do relaxamento induzido pelo HDE em aorta

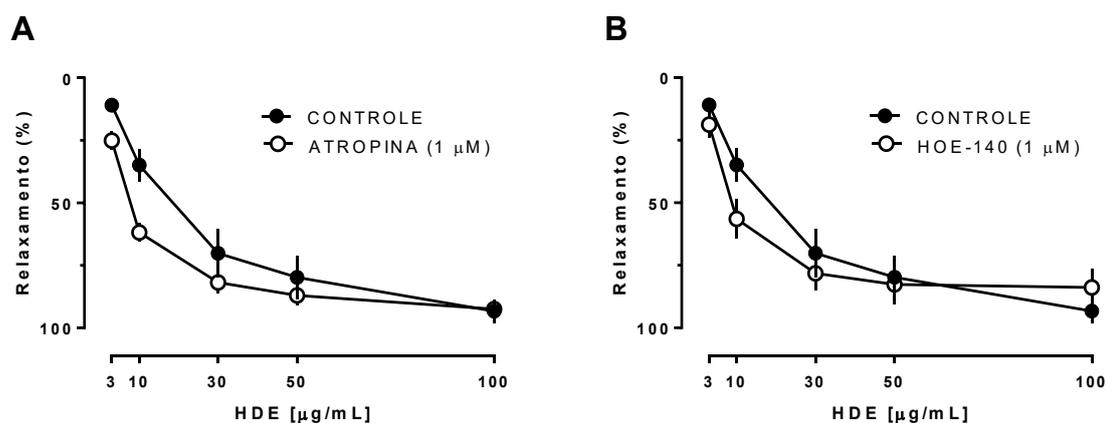
A incubação com as drogas wortmanina, inibidor da fosfatidilinositol-3-cinase, e dorsomorfina, inibidor da proteína cinase ativada por AMP (AMPK), não resultou em diferenças no efeito vasodilatador do HDE. Da mesma maneira, a apocinina, inibidor da NADPH oxidase e o tempol, sequestrador de espécies reativas de oxigênio também não foram capazes de interferir na resposta vasorrelaxante do hidrolisado (**Figuras 15A a D**).

#### 4.2.5 Os antagonistas dos receptores de acetilcolina e bradicinina não foram capazes de reverter o relaxamento induzido pelo HDE em aorta

Conforme demonstrado nas **Figuras 16A e B**, a ação vasodilatadora do HDE não foi alterada pela incubação com atropina, antagonista de receptores muscarínicos, ou HOE-140, antagonista do receptor  $\text{B}_2$  da bradicinina.



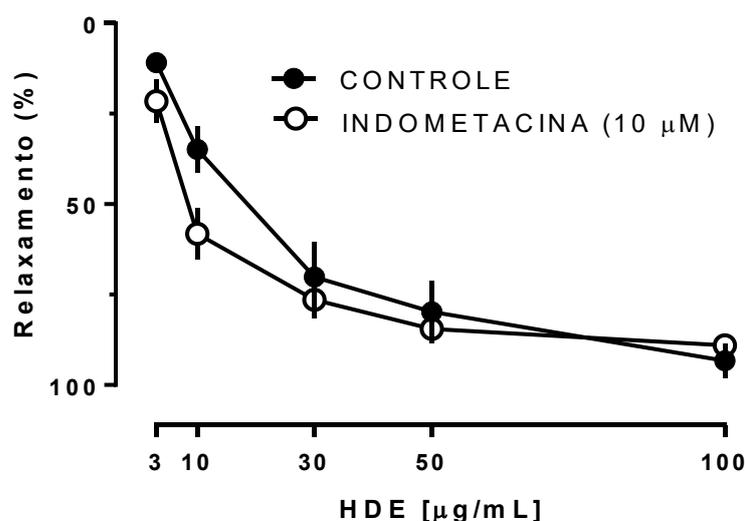
**Figura 15 - Inibição das vias da Akt/PI3K e EROs não interfere no relaxamento causado pelo HDE.** CCR de relaxamento para o HDE em anéis de aorta com endotélio funcional, na presença e ausência dos inibidores wortmanina (A), dorsomorfina (B), apocinina (C) e tempol (D), respectivamente. Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo).



**Figura 16 - Antagonismo de receptores para acetilcolina e bradicinina não interfere no relaxamento causado pelo HDE.** CCR de relaxamento para o HDE em anéis de aorta com endotélio funcional, na presença e ausência dos antagonistas atropina (A) e HOE-140 (B), respectivamente. Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo).

#### 4.2.6 Os produtos da cicloxigenase não tem participação no relaxamento causado pelo HDE em aorta

A indometacina, inibidor não seletivo de ciclooxigenases, responsável pela formação de prostanóides não foi capaz de interferir no efeito do HDE em anéis de aorta, conforme demonstrado na **Figura 17**.



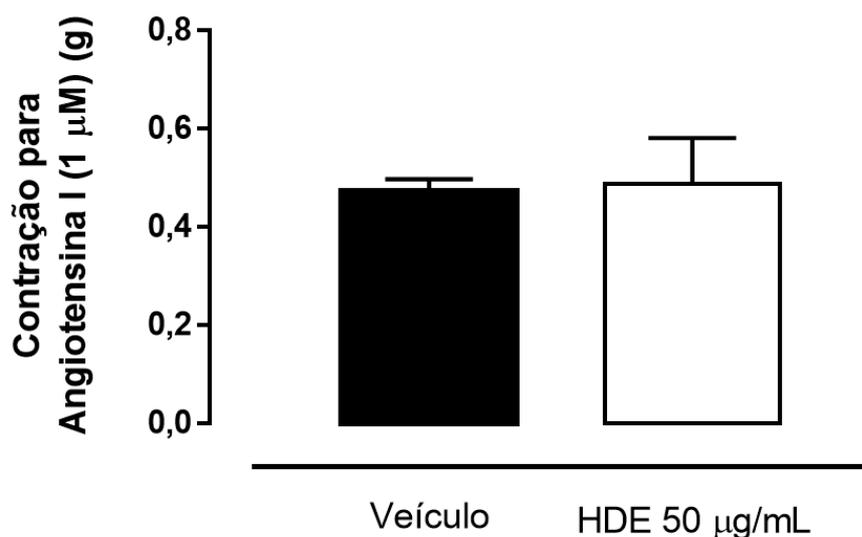
**Figura 17 - Bloqueio da COX não interfere no relaxamento causado pelo HDE.** CCR de relaxamento para o HDE em preparações de anéis de aorta com presença de endotélio funcional, na presença e ausência de indometacina. Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM (n = 6 preparações de diferentes animais por grupo).

#### 4.2.7 HDE não exerceu efeito sobre a atividade contrátil da angiotensina I

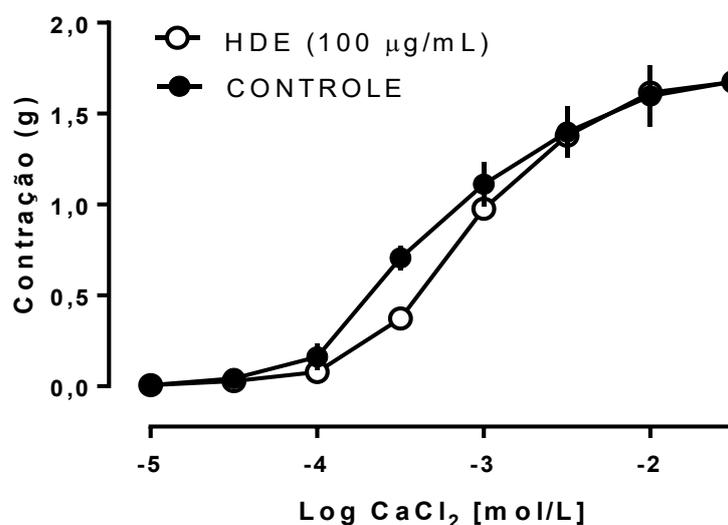
Conforme ilustrado na **Figura 18**, não houve diferença na contração induzida por angiotensina I entre anéis que foram incubados com o HDE ou apenas com o veículo.

#### 4.2.8 Ausência de efeito do HDE sobre contrações induzidas por $\text{CaCl}_2$ .

Na **Figura 19** pode-se observar que a incubação de anéis de aorta mantidas em solução nutritiva despolarizante com o HDE (100  $\mu\text{M}$ ) não foi capaz de alterar a CCR de contração induzida pelo  $\text{CaCl}_2$ .



**Figura 18 - HDE não foi capaz de interferir na resposta contrátil exercida pela angiotensina I.** Contração exercida pela incubação com angiotensina I em anéis de aorta de rato, na presença do veículo (barra preta) ou HDE 50 μg/mL (barra branca). Barras do gráfico correspondem à média ± EPM (n = 6 preparações de diferentes animais por grupo).

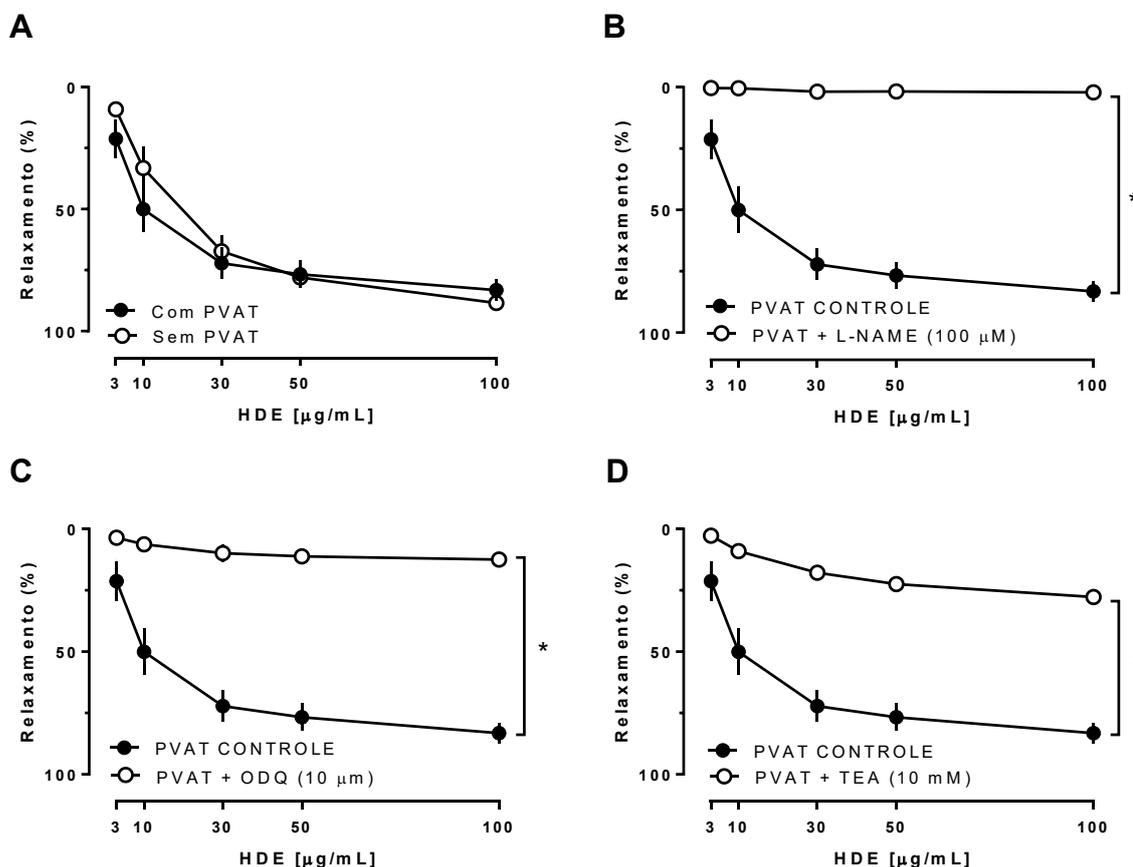


**Figura 19 - HDE não interfere na mobilização de Ca<sup>2+</sup> extracelular.** CCR de contração para CaCl<sub>2</sub> em anéis de aorta com endotélio funcional e previamente despolarizados, na ausência e na presença de HDE 100 μM. Os resultados correspondem à média ± EPM (n = 6 preparações de diferentes animais por grupo).

#### 4.2.9 Presença do tecido perivascular não altera o relaxamento exercido pelo HDE em aorta

Conforme demonstrado na **Figura 20A**, a presença do tecido perivascular intacto na preparação de aorta não causou aumento nem diminuição significativa na atividade

vasorrelaxante de HDE ( $R_{\text{máx}}$  de  $83 \pm 4\%$ ). De maneira semelhante, não houve mudança na habilidade do L-NAME (**Figura 20B**), ODQ (**Figura 20C**), ou TEA (**Figura 20D**) em inibir o efeito vasodilatador do HDE nestas preparações.

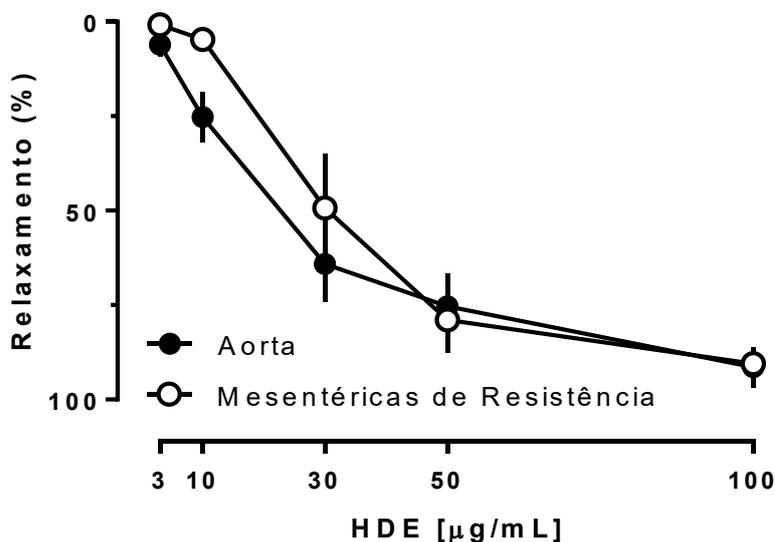


**Figura 20 - Relaxamento exercido pelo HDE não foi alterado pela presença do tecido perivascular (PVAT) em anéis de aorta.** CCR de relaxamento para o HDE em preparações de aorta com endotélio funcional, com e sem a presença do PVAT (**A**). CCR de relaxamento para o HDE em preparações de aorta com endotélio funcional e sem a remoção do PVAT, na presença ou ausência dos inibidores L-NAME (**B**), ODQ (**C**) E TEA (**D**). Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo). \* indica  $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle.

#### 4.3 Atividade vasorrelaxante de HDE em artérias mesentéricas de resistência

Ao avaliar-se a atividade biológica do HDE em artérias mesentéricas de resistência de primeira e segunda ordem, observou-se que a adição de concentrações crescentes do hidrolisado também é capaz de gerar relaxamento dependente de

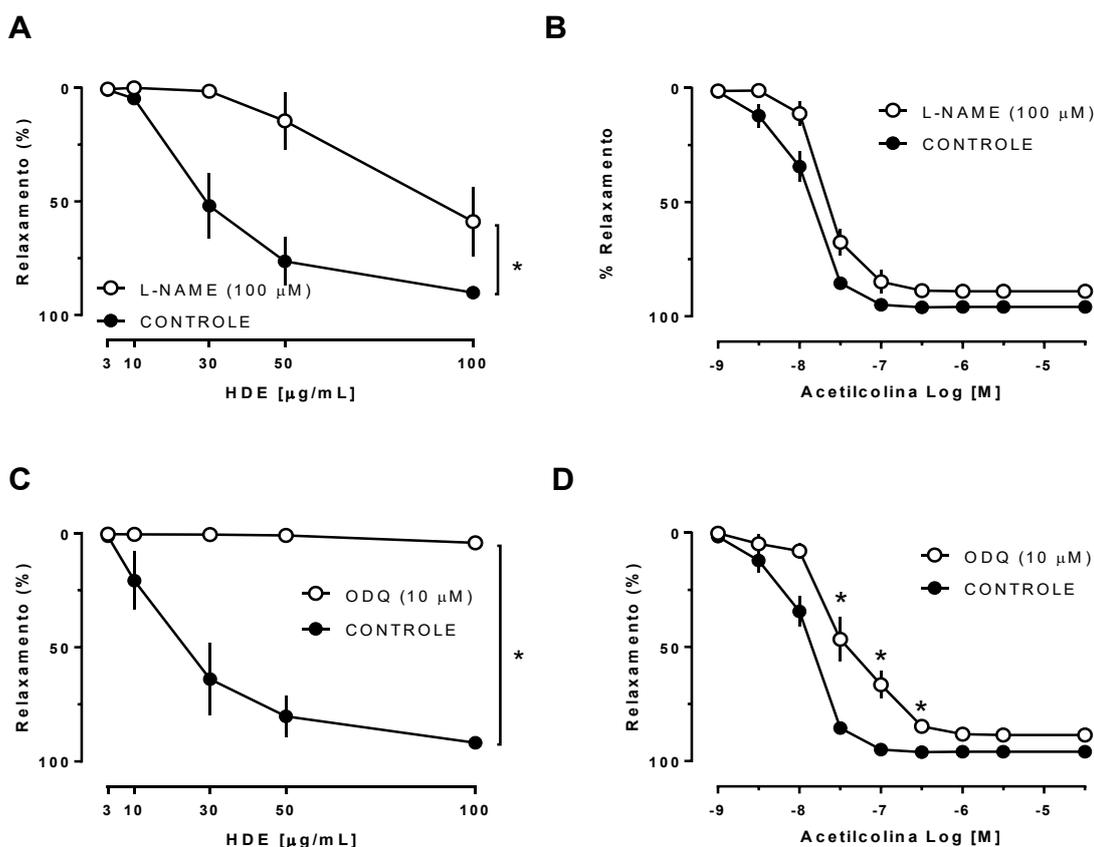
concentração ( $R_{\text{máx}}$  de  $90 \pm 3\%$ ), semelhante ao encontrado na aorta de ratos, como apresentado na **Figura 21**.



**Figura 21** - HDE é capaz de gerar relaxamento dependente de concentração em artérias de resistência. CCR de relaxamento para o HDE em preparações de anéis de aorta e de artérias mesentéricas de resistência, com presença de endotélio funcional. Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo).

#### 4.3.1 Contribuição da via do NO/guanilato-ciclase no relaxamento exercido pelo HDE em artérias de resistência

Em anéis de artérias de resistência, quando incubados com inibidores da via do NO, como o L-NAME, o HDE perdeu grande parte do seu efeito vasorrelaxante e também sua potência, reduzindo a  $R_{\text{máx}}$  de 90 para 58%. Para fins de comparação, a acetilcolina não teve seu relaxamento alterado pela presença do L-NAME, conforme demonstrado nas **Figura 22A e B**. Resultado semelhante foi encontrado quando os anéis foram incubados com o inibidor de guanilato ciclase solúvel ODQ, o qual foi capaz de abolir o relaxamento induzido pelo HDE (**Figura 22C**), mas causou apenas um deslocamento da CCR de relaxamento induzido pela acetilcolina (**Figura 22D**).



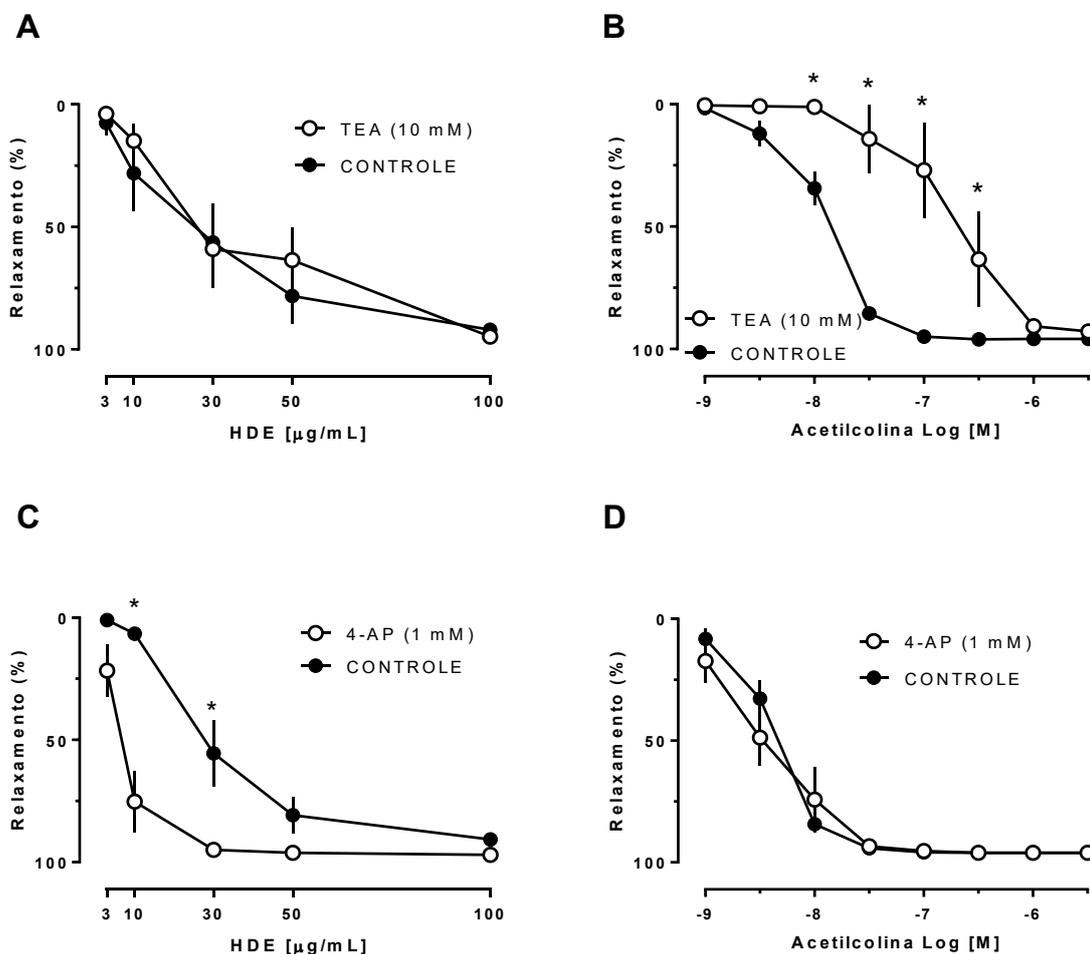
**Figura 22 - NO participa de relaxamento induzido pelo HDE, mas não pela acetilcolina, em artérias mesentéricas de resistência.** CCR de relaxamento para o HDE em preparações de anéis de artérias mesentéricas de resistência com endotélio funcional, na presença ou na ausência dos inibidores L-NAME (A) e ODQ (C), respectivamente. CCR de relaxamento para acetilcolina em preparações de anéis de artérias mesentéricas de resistência com endotélio funcional, na presença ou na ausência dos inibidores L-NAME (B) e ODQ (D). Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo). \* indica  $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle.

#### 4.3.2 Canais de potássio não participam do relaxamento induzido pelo HDE em artérias de resistência

Diferente do que ocorreu em anéis de aorta, a presença do TEA não alterou o efeito vasorrelaxante do HDE em artérias de resistência. Em contraste a esse resultado, quando incubou-se o anel com TEA e realizou-se uma CCR para acetilcolina, pode-se observar um deslocamento à direita da curva no gráfico, havendo perda de potência da droga, conforme demonstrado na **Figuras 23A e B**.

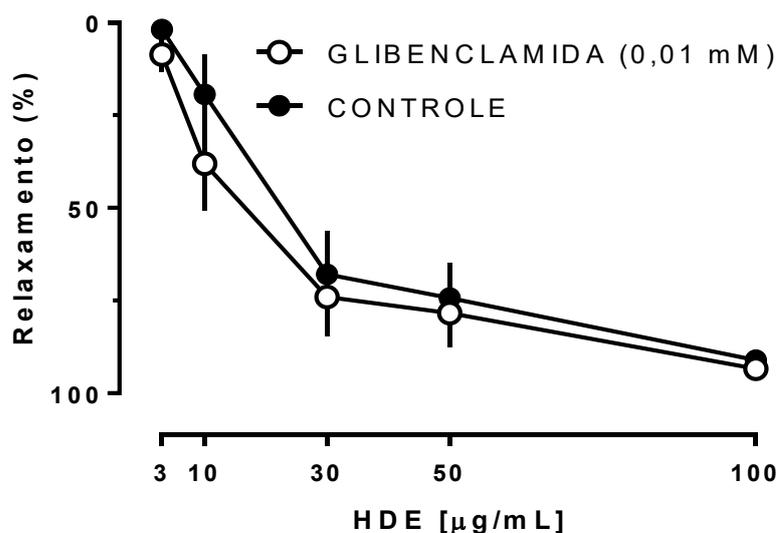
Por outro lado, quando os anéis foram incubados com o inibidor seletivo de canais de  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem 4-AP, a CCR de relaxamento induzido pelo

HDE foi deslocada significativamente para a esquerda, revelando uma potencialização desse efeito. Por sua vez, a incubação de 4-AP não alterou o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina nessas preparações (Figuras 23C e D).



**Figura 23** - Canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  e canais de  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem não participam do relaxamento causado pelo HDE. CCR de relaxamento para o HDE em preparações de anéis de artérias mesentéricas de resistência com endotélio funcional, na presença ou na ausência dos inibidores TEA (A) e 4-AP (C), respectivamente. CCR de relaxamento para acetilcolina em preparações de anéis de artérias mesentéricas de resistência com endotélio funcional, na presença ou na ausência dos inibidores TEA (B) e 4-AP (D). Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo). \* indica  $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle.

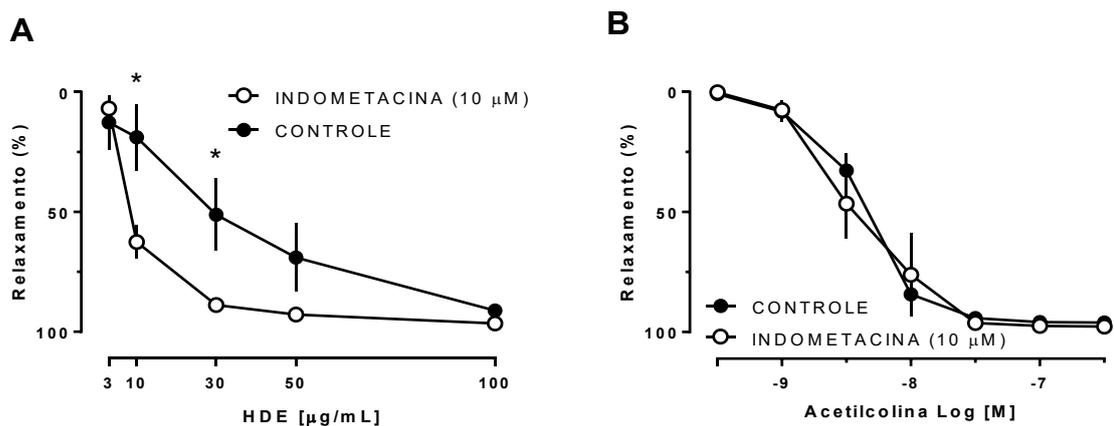
Em se tratando dos canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP, também não houve mudança na resposta vasodilatadora para o HDE em artérias de resistência quando os anéis foram incubados com glibenclamida, conforme Figura 24, abaixo.



**Figura 24 - Canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP não participam do efeito vasodilatador exercido pelo HDE em artérias de resistência.** CCR de relaxamento para o HDE em anéis de artérias mesentéricas de resistência com endotélio funcional, na presença ou na ausência de glibenclamida. Os resultados correspondem à média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  preparações de diferentes animais por grupo).

#### 4.3.3 Produtos da cicloxigenase não reduzem o relaxamento causado pelo HDE em artérias de resistência

O relaxamento vascular induzido pelo HDE foi potencializado em preparações de artérias mesentéricas de resistência previamente incubadas com indometacina, como pode ser observado pelo deslocamento da CCR (**Figura 25A**). Por sua vez, a CCR de relaxamento para acetilcolina em preparações incubadas com indometacina não foi diferente daquela obtida em preparações controle, incubadas apenas com veículo (**Figura 25B**).



**Figura 25 - Produtos da ciclooxigenase não reduzem o relaxamento causado pelo HDE em artérias de resistência.** CCR de relaxamento para o HDE em preparações de anéis de artérias mesentéricas de resistência com endotélio funcional, na presença ou na ausência de indometacina (**A**). CCR de relaxamento para acetilcolina em preparações de anéis de artérias mesentéricas de resistência com endotélio funcional, na presença ou na ausência de indometacina (**B**). (n = 6 preparações de diferentes animais por grupo). \* indica  $p < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle.

## 5 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou a atividade vasorrelaxante de um hidrolisado de proteína de soro de leite, obtido através da hidrólise por pepsina comercial, antes e após digestão *in vitro*. Em termos de atividade biológica, a hidrólise e consequentemente a digestão são importantes para que haja liberação e formação de peptídeos, que podem ter maior potencial para exercer tais atividades quando comparados à proteína de soro de leite intacta. Um estudo de Mullally *et al.* (1997b), demonstrou que a hidrólise por pepsina e proteases pancreáticas foi necessária para obtenção de efeito inibidor da ECA *in vitro*, uma vez que essa atividade foi exercida por peptídeos formados após a quebra da  $\beta$ -lactoglobulina (uma proteína derivada do leite), enquanto que a proteína não hidrolisada apresentou baixa atividade. O mesmo grupo também demonstrou que a digestão do soro de leite em si, por proteinase pancreática *in vitro*, foi responsável por gerar peptídeos com atividade biológica significativa, quando comparados ao soro de leite não digerido (Mullally *et al.*, 1997a).

De maneira semelhante ao apresentado na literatura, no que diz respeito a hidrólise de proteínas do leite gerar peptídeos com atividade biológica, este trabalho demonstrou que peptídeos de soro de leite hidrolisados através de pepsina comercial apresentam atividade vasorrelaxante em aorta e artérias mesentéricas de ratos. Além disso, após esse mesmo hidrolisado (HLA-IT) passar por um processo de digestão *in vitro*, houve um importante aumento na sua atividade vasorrelaxante, principalmente após a fase entérica da digestão (que gerou o hidrolisado denominado HDE). Como revelado neste estudo, a primeira concentração do HDE capaz de exercer efeito vasodilatador foi a de 3  $\mu\text{g/mL}$ , o que representa um aumento de cerca de 300 vezes em sua potência, quando comparado ao HLA-IT, cuja concentração inicial capaz de exercer vasorrelaxamento foi de 1  $\text{mg/mL}$ .

No que diz respeito ao método de obtenção do hidrolisado e ao processo de secagem para sua utilização como ferramenta experimental, comparou-se a atividade vasorrelaxante de hidrolisados gerados através da liofilização e da atomização. Apesar do custo reduzido, existe certa relutância em utilizar-se a atomização, uma vez que o processo não raramente submete o produto a temperaturas acima de 100 °C, podendo levar à desnaturação de proteínas ou inativar compostos bioativos não resistentes a altas temperaturas (Ameri & Maa, 2007). Entretanto, obteve-se um perfil cromatográfico semelhante de peptídeos na composição dos hidrolisados submetidos

aos dois processos, conforme trabalho previamente realizado por este grupo (Ozorio, et al., 2019). Da mesma maneira, não houve diferença de resposta vasodilatadora em aorta de ratos, na qual tanto os hidrolisados liofilizados quanto os atomizados, exerceram uma vasodilatação significativa. Desta forma, os resultados aqui apresentados permitem concluir que o método de secagem do hidrolisado não interferiu em sua atividade vasorrelaxante em banho de órgão isolado.

Já no que tange ao método de inativação da enzima utilizada para hidrolisar o soro de leite, pode-se constatar que a inativação por temperatura (80 °C) gerou peptídeos com maior potência vasodilatadora do que a inativação por mudança de pH utilizando o NaOH, que fez com que o hidrolisado perdesse sua atividade vasorrelaxante em aorta de ratos. Desta maneira, utilizou-se para as etapas subsequentes da avaliação farmacológica o hidrolisado atomizado, no qual a pepsina foi inativada por temperatura (HLA-IT), que foi capaz de gerar um relaxamento robusto e independente do endotélio, conforme demonstrado na **Figura 9**.

Para compreender a relevância dos resultados da atividade do hidrolisado encontrados em banho de órgão isolado, cumpre-nos ressaltar que a maior parte das evidências existentes na literatura acerca da atividade biológica de peptídeos de soro de leite apontam para a capacidade destes em inibir a ECA. Após a descoberta dos peptídeos provenientes da *Bothrops jararaca* com atividade inibitória da ECA (Ferreira et al., 1970), buscou-se outras fontes de peptídeos que também pudessem gerar esse efeito. A compreensão da atividade dos peptídeos de soro de leite sobre o sistema vascular se iniciou aproximadamente em 1996, a partir de um estudo de Mullally et al. (1996), que demonstrou que peptídeos sintéticos correspondentes à  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina eram capazes de inibir a ECA. Desde então, despertou-se o interesse e a busca por peptídeos derivados de soro de leite com atividade inibitória da ECA, e diversos estudos encontraram resultados similares, que mostravam a inibição da ECA através de metodologias *in vitro* (Alvarado et al., 2018; O’Keeffe et al., 2017; Pinto et al., 2012).

A partir das evidências de que peptídeos de soro de leite exerciam atividade inibitória sobre a ECA, buscou-se avaliar a atividade anti-hipertensiva desses peptídeos. Em meados de 1998 surgiram evidências nessa linha, como o estudo de Abubakar et al. (1998), o qual demonstrou que peptídeos derivados da hidrólise do soro de leite foram capazes de exercer atividade anti-hipertensiva em animais SHR após uma única administração intragástrica. Logo em seguida, um estudo de

Nurminen et al. (2000) também demonstrou através da medida de pressão arterial por telemetria, a diminuição da pressão arterial após injeção de um peptídeo derivado da  $\alpha$ -lactoalbumina, tanto em ratos SHR quanto normotensos. Além desses, diversos estudos demonstraram resultados semelhantes no que tange à atividade anti-hipertensiva de peptídeos derivados de soro de leite, aferida através de metodologias *in vivo* realizadas em ratos SHR (por exemplo, Martin *et al.*, 2015, Tavares *et al.*, 2012 e Wang *et al.*, 2012).

Apesar da evidência a respeito da atividade sobre a ECA, e da atividade anti-hipertensiva de peptídeos de proteína do soro do leite, pouco se sabe a respeito de sua ação direta em vasos isolados, e informações a respeito de outros mecanismos de ação envolvidos na atuação desses peptídeos são escassas.

Considerando-se a insuficiência de informações a respeito da atividade vascular de hidrolisados de soro de leite, o presente estudo buscou explorar essa atividade, bem como identificar os possíveis mecanismos de ação responsáveis pelo relaxamento apresentado. Dessa maneira, como houve aumento significativo na potência do HLA-IT após a digestão *in vitro*, deu-se seguimento aos estudos de mecanismo de ação utilizando-se o HDE. O primeiro ponto a ser observado, é que o HDE, diferente do HLA-IT, apresentou uma atividade dependente de endotélio, sendo necessária a presença deste para que ocorresse o vasorrelaxamento.

Uma vez que a remoção mecânica da funcionalidade do endotélio foi capaz de inibir totalmente a atividade vasorrelaxante do HDE, e que o NO é um dos principais mediadores vasodilatadores provenientes do endotélio (Moncada *et al.*, 1988), utilizamos o inibidor não seletivo das sintases de óxido nítrico, L-NAME, que é capaz de impedir o vasorrelaxamento por substâncias cujo efeito é dependente de NO (Rees *et al.*, 1990). A incubação com o L-NAME resultou na inibição do relaxamento causado pelo HDE, sugerindo que o NO é um dos fatores responsáveis pelo relaxamento observado. Para confirmar essa hipótese, lançou-se mão de um sequestrador químico do NO, o c-PTIO, que foi capaz de inibir totalmente a resposta vasorrelaxante da acetilcolina em diversos vasos de coelho (Yoshida *et al.*, 1998). O sequestro do NO, como era de se esperar, também reduziu significativamente o relaxamento causado pelo HDE.

Para que ocorra relaxamento, o NO precisa difundir-se através da membrana celular, vindo do endotélio, entrando na célula do músculo liso vascular. Uma vez disponível no citoplasma, ele é capaz de ativar a guanilato ciclase solúvel e

desencadear a formação de GMPc (Arnold *et al.*, 1977). Para fins de elucidar a ativação da via do NO pelo HDE, utilizou-se um inibidor direto da guanilato ciclase solúvel, o ODQ (Zhao *et al.*, 2000). Como a presença do ODQ na preparação diminuiu o efeito vasorrelaxante na mesma magnitude que o L-NAME, confirmou-se a hipótese que o HDE é capaz de ativar a via do óxido nítrico em aorta de ratos, assim levando à ativação da GCs. Apesar disso, provavelmente o HDE não ative diretamente a GCs em aorta, uma vez que o L-NAME por si só foi capaz de abolir o efeito do hidrolisado.

Como o aumento de GMPc após ativação da GCs pelo NO leva à estimulação da PKG para gerar efeito vasodilatador (Francis *et al.*, 2010), era de se esperar que a inibição da PKG através do Rp-8-Br-PET-cGMPS (Butt *et al.*, 1990) diminuísse a vasodilatação exercida pelo hidrolisado. Porém, apesar de todas as evidências apontarem para ativação da via do óxido nítrico por HDE, Rp-8-Br-PET-cGMPS não foi capaz de interferir no relaxamento. Não se pode excluir uma falha na inibição da PKG, uma vez que as condições experimentais não permitem a realização de um controle positivo para verificar a atividade do inibidor. Além disso, um estudo de Valtcheva *et al.* (2009) demonstrou ausência de antagonismo e uma possível atividade agonista de Rp-8-Br-PET-cGMPS sobre a PKG. Ainda neste estudo, a atividade da PKG foi monitorada através do estímulo de crescimento de células de músculo liso vascular, não ocorrendo antagonismo quando adicionado o agonista 8-Br-GMPc. Além disso, Rp-PET favoreceu o crescimento celular de maneira dependente de PKG. Sendo assim, esse antagonista não deveria ser usado como evidência única do papel da PKG no processo de vasorrelaxamento exercido pelo HDE.

Estudos na literatura corroboram nossos achados de que o NO pode estar envolvido na atividade vasorrelaxante de peptídeos de origem alimentar. Um estudo de Hirota *et al.* (2011b) demonstrou que tripeptídeos derivados de outra proteína do leite, a caseína, são capazes de induzir a produção de NO em cultura de células endoteliais, bem como causar relaxamento dependente de endotélio em aorta de ratos. Além disso, outro estudo também demonstrou peptídeos isolados derivados de leite (Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro) que foram capazes de reverter a disfunção arterial causada por tratamento com L-NAME. Mesmo em animais que passaram por 4 semanas de tratamento com L-NAME, o relaxamento mediado por acetilcolina foi preservado quando tratados com val-pro-pro e ile-pro-pro. O contrário ocorreu com o grupo que recebeu somente L-NAME, em que perdeu-se parte da capacidade de relaxamento após estímulo por acetilcolina, sendo este evento relacionado pelos

autores com o aumento de produção de NO (Nonaka *et al.*, 2014). Também relacionado à produção de NO, o estudo de Yamaguchi *et al.* (2009) demonstrou através da análise de microarraste de DNA, que peptídeos isolados do leite podem levar a um *upregulation* da expressão de RNAm para eNOS na aorta de ratos SHR. Os estudos apresentados acima demonstram a evidência existente na literatura de que peptídeos derivados de leite podem atuar no sistema cardiovascular através da via do óxido nítrico. Porém os resultados obtidos no presente estudo são os únicos em nosso conhecimento a demonstrarem atividade direta de derivados do hidrolisado de soro de leite sobre a via do NO.

Além do NO, outra importante via de relaxamento dependente do endotélio é através da abertura de canais de  $K^+$ . Esses canais participam diretamente do relaxamento do músculo liso vascular por estarem relacionados com o EDHF, seja através do  $K^+$  atuando diretamente como fator hiperpolarizante e vasodilatador (Weston *et al.*, 1998) ou através da liberação desse íon por outra substância, culminando na hiperpolarização (Chen *et al.*, 1988). Além disso, o próprio NO pode levar ao aumento de  $K^+$  no meio intracelular por ativar diretamente canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$ , como demonstrado por Bolotina *et al.* (1994) e por Archer *et al.* (1994). Em suma, sabe-se que o relaxamento dependente de endotélio também envolve a participação de canais de  $K^+$ , de diversas maneiras (Gluais *et al.*, 2005).

Tendo em vista estas informações a respeito da participação dos canais de  $K^+$  no relaxamento dependente de endotélio, buscamos identificar a participação dos mesmos na atividade do HDE. Para tal, utilizamos o bloqueador não seletivo de canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$ , TEA, o qual já foi demonstrado inibir o relaxamento causado por acetilcolina em aorta de coelhos (Demirel *et al.*, 1994). Após incubação com o TEA em aorta, observou-se uma diminuição robusta no relaxamento causado pelo HDE, semelhante àquela observada com L-NAME, o que demonstra que de alguma maneira, os canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  têm participação importante nesse efeito vasorrelaxante.

Além dos canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$ , também buscamos identificar a participação de outros canais de  $K^+$ , como aqueles sensíveis ao ATP. A glibenclamida, um hipoglicemiante oral, é capaz de bloquear as correntes de  $K^+$  através dos canais de  $K^+$  sensíveis ATP (Sturgess *et al.*, 1985), do tipo Kir6. Sendo assim, a ausência de alteração no efeito vasorrelaxante do HDE após a incubação da glibenclamida indica que esses canais de potássio não participam neste evento. Da mesma maneira,

canais de  $K^+$  dependentes de voltagem não parecem contribuir para o relaxamento exercido pelo HDE, visto que a droga 4-aminopiridina, conhecida por ser capaz de bloquear canais de  $K^+$  dependentes de voltagem e diminuir a condutância do ion  $K^+$  na membrana celular (Robertson *et al.*, 1994), também não levou à nenhuma alteração na resposta vasodilatadora gerada pelo HDE, demonstrando que também os canais dependentes de voltagem não tem participação no efeito vasorrelaxante do HDE nestas condições experimentais.

Uma vez que somente o inibidor não seletivo de canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$ , TEA foi capaz de reduzir a atividade vasorrelaxante do HDE, utilizou-se bloqueadores seletivos para canais dessa família, com intuito de identificar qual subtipo de canal estaria participando desta atividade. Existem evidências de que tanto os canais de  $K^+$  de condutância intermediária, (IKCa) quanto baixa (SKCa), têm papel importante no relaxamento causado por acetilcolina em vasos (Hilgers *et al.*, 2006). Sendo assim, como ao utilizar-se a droga TRAM-34, um bloqueador seletivo de canais IKCa (Grissmer *et al.*, 2000), não observou-se redução na resposta vasodilatadora, concluiu-se que estes canais não participam do vasorrelaxamento exercido por HDE. Ao utilizarmos a apamina, que já foi demonstrado ser capaz de reduzir a hiperpolarização causada por acetilcolina ao bloquear canais SKCa (Gluais *et al.*, 2005), também não foi possível observar alteração na resposta ao HDE, sugerindo que canais SKCa não participam na sua atividade vasorrelaxante.

Uma vez que, até este ponto dos experimentos a participação do NO havia sido revelada como crucial para o relaxamento vascular descrito neste estudo, estudou-se outras vias que pudessem estar relacionadas à ativação da eNOS, como a via da Akt/PI3K. O estímulo desta via por mecanismos como o estresse de cisalhamento leva à uma ativação sustentada da eNOS, através da fosforilação do resíduo de serina 1177, aumentando a biodisponibilidade de NO (Dimmeler *et al.*, 1999). Porém, tanto a utilização do inibidor seletivo da PI3K, wortmanina (Powis *et al.*, 1994), quanto da dorsomorfina, usada como inibidor da AMPK (Liu *et al.*, 2014), não alterou a resposta vasodilatadora induzida pelo HDE, sugerindo que esta via não participa desta resposta.

Outro mecanismo que poderia estar envolvido no relaxamento exercido pelo HDE seria a regulação de EROS. Estas são conhecidas por diversas ações sobre a biologia vascular, algumas vezes gerando efeitos que podem ser considerados controversos. Está bem estabelecido que uma das maneiras que as EROS regulam o

tônus vascular é através da inativação do NO pelo ânion superóxido (Rubanyi & Vanhoutte, 1986 e Taniyama & Griendling, 2003). Além disso, as EROS também podem ter efeito vasodilatador direto. Um exemplo é o  $H_2O_2$ , capaz de causar vasorrelaxamento em artéria pulmonar (Burke & Wolin, 1987) e vasos de resistência (Matoba *et al.*, 2000), dentre outros. Desta maneira, neste estudo, procurou-se entender a participação das EROS no relaxamento exercido pelo HDE. Os experimentos realizados mostraram que a incubação com a apocinina, que tem sido utilizada como inibidor da enzima NADPH oxidase (Dodd-o & Pearse, 2000), principal catalizadora da formação de  $O_2^-$  (para revisão, ver Salazar, 2018), ou também como sequestradora de espécies reativas (Heumüller *et al.*, 2008), não interferiu no relaxamento exercido pelo hidrolisado. Da mesma forma, a utilização do tempol, sequestrador de EROS que permeia a membrana celular (Square *et al.*, 2000), também não influenciou a atividade vasorrelaxante do HDE. Assim, os resultados obtidos a partir da utilização dessas ferramentas farmacológicas não gerou indícios que apontem para a participação de EROS no relaxamento vascular induzido pelo HDE.

A estimulação de determinados receptores da membrana da célula endotelial leva à ativação da eNOS e liberação de NO (para revisão, ver Fleming & Kai, 2010). Duas dessas importantes substâncias que se ligam a seus receptores e culminam na liberação de NO são a acetilcolina (Furchgott & Zawadzki, 1980) e a bradicinina (Mann *et al.*, 1991). Desta maneira, testou-se a hipótese de que o HDE estaria causando a liberação de NO através da ativação de receptores desses agonistas endógenos. Porém, ao incubar-se a preparação de anel de aorta tanto com atropina, um antagonista de receptores muscarínicos, quanto com HOE-140, antagonista de receptores  $B_2$  para a bradicinina, não se observou qualquer alteração no relaxamento induzido pelo HDE, demonstrando que esses receptores não são ativados pelo HDE.

Como comentado anteriormente, a maior parte dos estudos existentes na literatura a respeito dos efeitos de hidrolisados de proteína de soro de leite no sistema vascular são relacionados com a inibição da ECA (Mullally *et al.*, 1997a; O’Keeffe *et al.*, 2017 e Tavares *et al.*, 2012). Devido a isso, apesar dos presentes resultados indicarem uma participação da via do NO no relaxamento causado pelo HDE, buscamos evidenciar a hipótese de que o HDE também estaria inibindo a ECA. Desta maneira, ao realizar-se a incubação com angiotensina I em anéis de aorta de rato, ocorre a conversão desta para angiotensina II através da ECA tecidual, e observa-se

uma resposta contrátil. No presente estudo, observou-se que ao incubar-se o anel de aorta com o HDE na concentração de 50 µg, (concentração capaz de exercer efeito vasodilatador quando administrado em preparações contraídas por fenilefrina) não se observou mudança na contração induzida pela angiotensina I, em comparação com repostas obtidas em anéis aórticos que não foram incubados com HDE. Tendo em vista que o efeito contrátil gerado após a adição de angiotensina I é dependente de sua conversão à angiotensina II pela ECA tecidual, pode-se concluir que o relaxamento vascular gerado pelo HDE em nossos experimentos não é dependente da inibição da ECA, sendo que não houve mudança na contração para angiotensina II após incubação com HDE.

Considerando-se a aplicabilidade de substâncias vasodilatadoras em meios biológicos, mais especificamente tratando-se da atividade do HDE, avaliou-se seu efeito vasodilatador em preparações nas quais o tecido perivascular (PVAT) foi preservado. Essa análise é potencialmente importante, tendo em vista que em condições fisiológicas, no organismo de um indivíduo, o PVAT estaria presente. Foi somente em 1991 que surgiu a primeira hipótese de que o PVAT seria importante, ou teria algum papel na regulação vascular (Soltis & Cassis, 1991). Mais tarde se descobriu que ele tinha papel vasodilatador, ou mais precisamente, liberava uma ou mais substâncias com atividade anti-contrátil (Lohn *et al.*, 2002). Por isso, visamos avaliar se a presença do PVAT no anel de aorta influenciaria a atividade vasorrelaxante do HDE. Porém, a análise dos resultados apresentados na **Figura 20** revela que não houve alteração na resposta ao HDE naqueles anéis que continham PVAT. Da mesma forma, o mecanismo de ação pelo qual o HDE exerceu relaxamento em anéis aórticos contendo o PVAT se manteve o mesmo, uma vez que a vasodilatação induzida após a incubação com L-NAME, ODQ e TEA foi reduzida de forma semelhante ao observado em preparações sem PVAT. A ausência de influência do PVAT na atividade do HDE, pode se dever ao fato de que, como mostrado em estudos existentes, o fator vasorrelaxante derivado do PVAT gera efeitos de forma independente do endotélio, e principalmente, independente da liberação de óxido nítrico (Lohn *et al.*, 2002). Assim, considerando-se que o HDE exerce seu mecanismo de ação principalmente através da liberação de óxido nítrico, é possível compreender o porquê da ausência de influência do PVAT em seu efeito.

Considerando-se o contraste de mecanismos envolvidos na vasodilatação de artérias de condutância e resistência, buscou-se investigar se há diferenças na

resposta vasodilatadora do HDE em artérias de resistência, uma vez que o leito mesentérico tem papel importante no controle da pressão arterial. O HDE foi capaz de gerar relaxamento em artérias de resistência da mesma magnitude e com a mesma potência encontrada em aorta. Apesar disso, pode-se notar diferenças na resposta à inibição das sintases de óxido nítrico em artérias de resistência. Enquanto em aorta o L-NAME foi capaz de bloquear quase totalmente o efeito do HDE, em pequenos vasos mesentéricos, pode-se observar que a maior concentração de HDE exerce um relaxamento de aproximadamente 50% na presença do inibidor da sintase de óxido nítrico. Apesar disso, quando se inibiu a guanilato ciclase solúvel com o OQD, a resposta vasodilatadora foi quase totalmente abolida nessas artérias de resistência semelhante ao encontrado em aorta. Além do NO, existe evidência de que outro gás é capaz de ativar a GCs, o monóxido de carbono (CO) (Brüne & Ullrich, 1987; Furchgott & Jothianandan, 1991). Sendo assim, apesar de a eNOS estar inibida na presença do L-NAME, a enzima heme-oxigenase pode estar sendo estimulada pelo HDE e levando à liberação de CO, que estaria ativando a GCs e levando à formação de GMPc, o que explicaria porque a resposta vasorrelaxante ao HDE foi parcialmente preservada mesmo na presença do L-NAME, porém foi praticamente abolida na presença do ODQ. Entretanto, o CO seria apenas um exemplo a ser considerado, não se podendo excluir outras substâncias capazes de contribuir para este efeito, como por exemplo, os nitrosotióis, os quais já foi demonstrado serem potentes ativadores da guanilato ciclase (Ignarro *et al*, 1979). Outra hipótese seria de que alguns dos peptídeos contidos no hidrolisado poderiam estar também ativando diretamente a GCs, o que explicaria porque parte do efeito foi mantido com a presença do L-NAME. Sendo assim, nossos resultados apenas nos permitem afirmar que as sintases de óxido nítrico participam nesse relaxamento, porém podendo o efeito não ser somente através dessas. São necessários outros experimentos para elucidar a participação de outras substâncias nesse relaxamento.

A acetilcolina, que também exerce vasodilatação através da liberação de NO em aorta de ratos, quando testada em vasos de resistência não é inibida pela presença do L-NAME, indicando que nesses vasos o NO não é o principal mediador da sua atividade (Garland & McPherson, 1992) assim como demonstrado nas **Figuras 22B e C**. Esse achado difere da substância vasodilatadora utilizada no presente estudo, em que mesmo em artérias de resistência, o NO continua contribuindo significativamente para a atividade HDE. Por outro lado, canais de K<sup>+</sup> são tidos como os principais

mediadores do vasorrelaxamento em artérias de resistência (Hiroaki *et al.*, 1996). Isso é confirmado na **Figura 23B**, em que a curva de relaxamento para acetilcolina é deslocada para a direita na presença do inibidor não seletivo de canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$ , TEA, indicando perda de potência da droga. Apesar disso, quando se trata do relaxamento exercido pelo HDE, não podemos observar essa resposta, demonstrando que os canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$  não participam de forma tão pronunciada da vasodilatação induzida pelo HDE em artérias de resistência, como ocorre para a acetilcolina. Esse resultado difere também do encontrado em aorta, em que o TEA foi capaz de diminuir o efeito do HDE.

Apesar de os canais de  $K^+$  terem maior participação no relaxamento causado por acetilcolina em artérias de resistência, um estudo demonstrou não ser o NO que medeia diretamente a abertura desses canais nessas artérias, levantando à hipótese de que outro fator participa dessa hiperpolarização exercida pela acetilcolina (Garland, C.J. & McPherson, 1992). No efeito do HDE, apesar de encontrarmos participação do NO no relaxamento em artérias de resistência, provavelmente esse NO não exerce abertura de canais de potássio tão significativa nesses vasos, como ocorre em aorta (Bolotina *et al.*, 1994). Dessa maneira, a redução do efeito vasodilatador do HDE em aorta na presença do TEA pode ser relacionada à abertura direta desses canais pelo NO liberado pelo HDE.

Além dos canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$ , os canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP também já foram destacados como mecanismo através do qual o NO causa hiperpolarização em artérias de resistência, sendo que essa hiperpolarização seria bloqueada pela presença da glibenclamida, como demonstrado por Murphy & Brayden (1995). Sendo assim, como também realizado em aorta, utilizou-se a glibenclamida, inibidor seletivo para canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP em artérias mesentéricas. A glibenclamida não foi capaz de alterar a resposta exercida pelo HDE, o que em primeira instância, indica que esses canais não participam do seu relaxamento nessas condições experimentais.

De maneira semelhante, os canais de  $K^+$  dependentes de voltagem também participam do controle do tônus vascular em artérias de resistência, até mesmo por estabelecer o potencial de membrana em repouso da célula do músculo liso vascular (Xu *et al.*, 2019). Ao incubar-se anéis de artérias mesentéricas de resistência com o inibidor seletivo para esses canais, a 4-AP, obteve-se um aumento no relaxamento causado pelo HDE, exatamente o oposto do que seria esperado. Esse achado não foi

explorado em nossos experimentos, mas é possível afirmar que o mesmo indica que a abertura de canais de  $K^+$  dependentes de voltagem não é um mecanismo envolvido na atividade vasorrelaxante do HDE.

Prostanóides como a prostaciclina também figuram entre os principais mediadores de relaxamento dependente de endotélio em diversas artérias, incluindo as de resistência do leito mesentérico. Desta maneira, buscamos investigar a participação de derivados da ciclooxigenase no relaxamento exercido pelo HDE também em vasos de resistência. Para tal, os anéis de pequenas artérias mesentéricas foram incubados com o inibidor não seletivo da COX, indometacina. Pode-se observar que não houve redução na resposta vasodilatadora para o HDE na presença da indometacina, e, ao contrário, houve um aumento nessa resposta. Uma possível explicação para esse ocorrido se baseia no fato de que o endotélio também é capaz de liberar prostanóides com atividade vasoconstritora em algumas condições, sendo alguns deles o tromboxano  $A_2$ ,  $PGH_2$ ,  $PGI_2$ ,  $PGE_2$  e a  $PGF_{2\alpha}$  (para revisão, ver Félétou et al., 2010). Com a presença da indometacina, essas substâncias derivadas do ácido araquidônico também estariam bloqueadas. Dessa maneira, sua atividade contrátil deixaria de se opor ao relaxamento exercido pelo HDE, aumentando a amplitude de sua resposta.

De acordo com os estudos de mecanismo de ação em banho de órgão isolado e distinto do encontrado na literatura até o presente momento, a utilização de um hidrolisado que passou por um processo de digestão *in vitro* que simula o que ocorre no trato gastrointestinal, causa um relaxamento de forma dependente da concentração em aorta e artérias mesentéricas de rato, e esse relaxamento está relacionado principalmente à liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais. O óxido nítrico é um dos principais fatores vasorrelaxantes em diversos leitos vasculares e tem grande importância no controle do tônus vascular, sendo que em condições em que sua produção está defasada, como em animais nocaute para a sintase de óxido nítrico endotelial, ocorrem distúrbios como a hipertensão (Huang *et al.*, 1995). Por isso, a busca por novas substâncias capazes de aumentar a liberação de NO pode ser considerado um ponto importante para o desenvolvimento de novas estratégias que auxiliem no controle de doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial. Aliado a isto, a busca por produtos de origem alimentar, ou de origem natural, para tratamento de diferentes doenças, inclusive as que afetam o sistema cardiovascular, deve ser ressaltada aqui. No caso de doenças como a hipertensão há um número

elevado de pacientes que não aderem à terapia medicamentosa tradicional, levando à uma alta taxa de hipertensão refratária (Matos *et al.*, 2008). Desta maneira, o estudo dos efeitos de hidrolisados do soro de leite nessa condição tem sua importância como ferramenta para buscar novas alternativas de tratamento, principalmente levando-se em consideração seu potencial de atuação através da via do NO.

## 6 CONCLUSÃO

Com este trabalho, identificamos que os hidrolisados provenientes de proteínas de soro de leite possuem atividade vasorrelaxante sobre aorta e artérias mesentéricas de resistência de ratos, havendo aumento de potência do hidrolisado após digestão *in vitro*. Além disso, os dados obtidos nesse estudo sugerem que:

1. a simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* leva ao aumento da potência da atividade vasodilatadora dos hidrolisados de proteína de soro de leite, colaborando para um possível uso do hidrolisado na terapêutica;
2. o endotélio vascular participa do efeito induzido pelo HDE, principalmente através da via do óxido nítrico sintase/guanilato ciclase solúvel;
3. canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  também tem participação no efeito vasorrelaxante induzido pelo HDE em aorta;
4. a via da fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt) e espécies reativas de oxigênio (EROS), bem como os receptores de bradicinina e acetilcolina e os produtos da ciclooxigenase, não participam do efeito vasorrelaxante induzido pelo hidrolisado;
5. apesar da evidência na literatura a respeito da atividade de peptídeos de origem alimentar com ação inibitória da ECA, este estudo demonstrou não ser esse o principal mecanismo de ação do HDE, uma vez que seu relaxamento não se deu através desta via, e sim através da produção ou aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABUBAKAR, A.; SAITO, T.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; ITOH, T. Structural Analysis of New Antihypertensive Peptides Derived from Cheese Whey Protein by Proteinase K Digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, p. 3131–3138, 1998.
- ALVARADO, Y.; CLAUDIA, P.; URISTA, M.; et al. Antihypertensive and Antioxidant Properties from Whey Protein Hydrolysates Produced by Encapsulated *Bacillus subtilis* Cells. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 25, n. 2, p. 681–689, 2018.
- AMERI, M.; MAA, Y. Spray Drying of Biopharmaceuticals : Stability and Process Considerations. **Drying Technology**, v. 3937, p. 763-768, 2007.
- ARCHER, S. L.; HUANG, J. M. C.; HAMPL, V.; et al. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. August, p. 7583–7587, 1994.
- ARNOLD, W. P.; MITTAL, C. K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5' -cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Biochemistry**, v. 74, n. 8, p. 3203–3207, 1977.
- BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850–853, 1994.
- BRIEN, S. F. O.; MCKENDRICK, J. D.; RADOMSKI, M. W.; DAVIDGE, S. T.; RUSSELL, J. C. Vascular wall reactivity in conductance and resistance arteries : differential effects of insulin resistance. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 76, p. 72–76, 1998.
- BURKE, M.; WOLIN, S. Hydrogen peroxide elicits pulmonary and guanylate cyclase activation arterial relaxation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 252, p. 721-732, 2019.
- BUTT, E.; BEMMELEN, M. VAN; FISCHER, L.; et al. Inhibition of cGMP-dependent protein kinase by (Rp) -guanosine. **FEBS Letters**, v. 263, n. 1, p. 47–50, 1990.
- CALVER A., COLLIER J., MONCADA, S., VALLANCE, P. Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. **Journal of Hypertension**, vol. 10, p. 1025-1031, 1992.
- CAMERON, A. C.; LANG, N. N.; TOUYZ, R. M. Drug Treatment of Hypertension: Focus on Vascular Health. **Drugs**, v. 76, n. 16, p. 1529–1550, 2016.

CASSIS, L. A. INFLUENCE OF PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE ON RAT. **Clinical And Experimental Hypertension. Part A: theory and practice**, v. 13, n. 2, p. 277–296, 1991.

CHEN, G.; SUZUKI, H.; WESTON, A. H. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. **British Journal of Pharmacology**, p. 1165–1174, 1988.

COLLEGE, W. F. Control of Peripheral Resistance in Major Systemic Vascular Beds. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 39, p. 617-686, 1959.

DEMIREL, E.; BREEMEN, C. VAN. TEA inhibits ACh-induced EDRF release : endothelial K<sup>+</sup> channels contribute to vascular tone. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 267, p. 1135-41, 2019.

DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSALTHALER, B.; et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, n. June, p. 601–605, 1999.

DODD-O, J. M.; PEARSE, D. B. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion lung injury. **American Journal of Physiology, Heart and Circulation Physiology**, 279: H303–H312, 2000.

7<sup>a</sup> Diretriz Brasileira De Hipertensão Arterial, v. 107, n. 3, 2016. Disponível em: <[www.arquivosonline.com.br](http://www.arquivosonline.com.br)>.

DUBROVSKA, G.; LAUTERBACH, B.; LUFT, F. C.; GOLLASCH, M.; SHARMA, A. M. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **American Journal of Physiology, Heart and Circulation Physiology**, p. 1057–1063, 2019.

FERREIRA, S. H., BARTLET D., GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from Bothrops jararaca venom. **Biochemistry**, vol. 13, p. 2583-2593, 1970.

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Vasoconstrictor prostanoids. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, p. 941–950, 2010.

FLEMING, I.; KAI, T. S. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, p. 793–806, 2010.

FORTE, P.; COPLAND, M.; SMITH, L. M.; et al. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. **The Lancet**, v. 349, n. table 1, p. 837–842, 1997.

FRANCIS, S. H.; BUSCH, J. L.; CORBIN, J. D. cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. **Pharmacol Reviews**, v. 62, n. 3, p. 525–563, 2010.

FRELIN, C. Mechanisms of vasoconstriction. **American Heart Journal**, p. 958–960.

FURCHGOTT, R., F. AND JOTHIANANDAN D. Endothelium-Dependent and -Independent Vasodilation Involving Cyclic GMP: Relaxation Induced by Nitric Oxide, Carbon Monoxide and Light. **Blood Vessels**, v. 28, p. 52-61, 1991.

GARLAND, C. J., MCPHERSON, G. A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarisation and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, n. 105, p. 429–435, 1992.

GLUAIS, P.; EDWARDS, G.; WESTON, A. H.; FALCK, J. R.; VANHOUTTE, P. M. Role of SK Ca and IK Ca in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery. **British Journal of Pharmacology**, p. 477–485, 2005.

GOUDA, K. G. M.; GOWDA, L. R.; RAO, A. G. A.; PRAKASH, V. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived From Glycinin, the 11S Globulin of Soybean (*Glycine max*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4568–4573, 2006.

GRIENGLING, K. K.; MINIERI, C. A.; OLLERENSHAW, J. D.; ALEXANDER, R. W. Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. **Circulation Research**, vol. 74, p. 1141–1149.

GRISMER, S.; CAHALAN, M. D.; CHANDY, K. G.; et al. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa1: A potential immunosuppressant. **PNAS**, v. 97, n. 14, p. 8151–8156, 2000.

GUYTON, A. C.; COLEMAN, T. G.; FOURCADE, J. C.; NAVAR, L. G. Physiologic control of arterial pressure. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 45, n. 9, 1969.

GUYTON, A. C.; GUYTON, A. C. Blood Pressure Control Special Role of the Kidneys and Body Fluids. **American Association for the Advancement of Science**, v. 252, n. 5014, p. 1813–1816, 2016.

HARVEY, A.; MONTEZANO, A. C.; LOPES, R. A.; RIOS, F.; TOUYZ, R. M. Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 32, n. 5, p. 659–668, 2016.

HELENA, M.; CARVALHO, C.; NIGRO, D.; et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76–88, 2001.

HEUMÜLLER, S.; WIND, S.; BARBOSA-SICARD, E.; et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 211–217, 2008.

HILGERS, R. H. P.; TODD, J.; WEBB, R. C. Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K<sup>+</sup> channels. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 1, p. H216–H222, 2006.

HIROTA, T.; NONAKA, A.; MATSUSHITA, A.; et al. Milk casein-derived tripeptides, VPP and IPP induced NO production in cultured endothelial cells and endothelium-dependent relaxation of isolated aortic rings. **Heart and Vessels**, v. 26, n. 5, p. 549–556, 2011a.

HIROTA, T.; NONAKA, A.; MATSUSHITA, A.; et al. Milk casein-derived tripeptides, VPP and IPP induced NO production in cultured endothelial cells and endothelium-dependent relaxation of isolated aortic rings. **Heart and Vessels**, v. 26, n. 5, p. 549–556, 2011b.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **PNAS**, v. 84, n. Dec., p. 9265–9269, 1987.

IGNARRO, L. J., EDWARDS, J. C., GRUETTER, D., BARRY, B. e GRUETTER, C. Possible involvement of s-nitrosothiols in the activation of guanylate cyclase by nitroso compounds. **FEBS LETTERS**, vol. 110, 1979.

KAAN, R.; ZEE, F. P. VAN DER; OZTURK, I.; LIER, J. B. VAN. Treatment of cheese whey by a cross-flow anaerobic membrane bioreactor : Biological and filtration performance. **Environmental Research**, v. 168, n. May 2018, p. 109–117, 2019.

KANSO, H.; YASSINE, M.; RABESONA, H.; et al. Vasorelaxant effects of camel and bovine casein hydrolysates in rat thoracic aorta and mesenteric artery. **International Dairy Journal**, v. 39, n. 1, p. 113–120, 2014.

KELLOGG, D. L.; ZHAO, J. L.; COEY, U.; GREEN, J. V. Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin. **Journal of Applied Physiology**, v. 2, p. 629–632, 2019.

KONISHI, M.; SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. **Hypertension**, v. 5, n. 6, p. 881–886, 1983.

KUMRUNGSEE, T.; WANG, Z. Q.; MATSUMURA, S.; et al. Identification of peptides from soybean protein, glycinin, possessing suppression of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in vascular smooth muscle cells. **Food Chemistry**, v. 152, p. 218–224, 2014.

KWAK, J. H.; KIM, M.; LEE, E.; et al. Effects of black soy peptide supplementation on blood pressure and oxidative stress: a randomized controlled trial. **Hypertension Research : Official Journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 36, n. 12, p. 1060–1066, 2013.

LIU, X.; CHHIPA, R. R.; NAKANO, I.; et al. The AMPK inhibitor Compound C is a potent AMPK-independent anti-glioma agent. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, p. 596-605.

MADUREIRA, A. R.; TAVARES, T.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. **Journal of Dairy Sciences**, p. 437–455, 2010.

MAK, I. T.; BOEHME, P.; WEGLICKI, W. B. Antioxidant effects of calcium channel blockers against free radical injury in endothelial cells. Correlation of protection with preservation of glutathione levels. **Circulation Research**, v. 70, n. 6, p. 1099–1103, 2012.

MANN, G. E., PERSON J. D., MONCADA, S., COADE S., BLOGLE, R. J. Bradykinin and ATP stimulate L-arginine uptake and nitric oxide release in vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 180, n. 2, p. 926–932, 1991.

MANNING, R. D.; NORMAN, R. A. Arterial Pressure Regulation Overriding Dominance of the Kidneys in Long-Term Regulation and in Hypertens. **The American Journal of Medicine**, vol. 52, 1972.

MARTIN, M.; KOPALIANI, I.; JANNASCH, A.; et al. Antihypertensive and cardioprotective effects of the dipeptide isoleucine-tryptophan and whey protein hydrolysate. **Acta Physiologica**, v. 215, n. 4, p. 167–176, 2015.

MATOBA, T.; KANAIDE, H.; TAKESHITA, A.; et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice Find the latest version : Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 12, p. 1521–1530, 2000.

MATOS, L. DE; MARTINS, B.; UBAID-GIRIOLI, S. Tratamento medicamentoso do paciente com hipertensão de difícil controle. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 15, n. 1, p. 28–33, 2008.

MELLINGER-SILVA, C.; ROSA, L. O. L.; STEPHAN, M. P.; et al. Dual function peptides from pepsin hydrolysates of whey protein isolate. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 73–79, 2015.

MONCADA S., HIGGS, E. A., VANE J. R. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. **The Lancet**, vol. 309, p. 18-21, 1977.

MONCADA S., PALMER, R. M. J., ASHTON, D. S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, p. 664-6, 1988.

MOZAFFARIAN, D.; BENJAMIN, E. J.; GO, A. S.; et al. AHA Statistical Update Heart Disease and Stroke Statistics — 2015 . **Report From the American Heart Association WRITING GROUP MEMBERS**. 2015.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Synthetic Peptides Corresponding to a-Lactalbumin and  $\beta$ -Lactoglobulin Sequences with Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Activity. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 377, n. April, p. 259–260, 1996.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides corresponding to a tryptic fragment of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. **FEBS Letters**, v. 402, n. 2–3, p. 99–101, 1997a.

MULLALLY, M. M.; MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory

activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 5, p. 299–303, 1997b.

MURPHY, M. E.; BRAYDEN, J. E. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. **Journal of Physiology**, p. 47–58, 1995.

NAKAHARA, T.; SUGIMOTO, K.; SANO, A.; et al. Antihypertensive Mechanism of a Peptide-Enriched Soy Sauce-Like Seasoning: The Active Constituents and Its Suppressive Effect on Renin-Angiotensin-Aldosterone System. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, 2011.

NAKAYAMA, K.; OSOLB, G.; HALPERNB, W. Differential Contractile Responses of Pressurized Porcine Coronary Resistance-Sized and Conductance Coronary Arteries to Acetylcholine, Histamine and Prostaglandin F<sub>2</sub>. **Blood Vessels**, p. 235–245, 1989.

NONAKA, A.; NAKAMURA, T.; HIROTA, T.; et al. The milk-derived peptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro attenuate arterial dysfunction in L-NAME-treated rats. **Hypertension Research**, v. 37, n. 8, p. 703–707, 2014.

NURMINEN, M.; SIPOLA, M.; KAARTO, H.; PIHLANTO-LEPPALA, A. A-lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 66, n. 16, p. 1535–1543, 2000.

O'KEEFFE, M. B.; CONESA, C.; FITZGERALD, R. J. Identification of angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides in a whey protein concentrate hydrolysate produced at semi-pilot scale. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 1751–1759, 2017.

OZORIO, L., PEREIRA, N. R., SILVA-SANTOS, J. E., BRIGIDA I. S., MELLINGER-SILVA, C., CABRAL, L. M. Enzyme inactivation and drying technologies influencing the vasorelaxant activity of a whey protein hydrolysate in semi-pilot scale. **International Dairy Journal**, vol. 93, p. 11-14, 2019.

PANZA, J. A.; CASINO, P. R.; KILCOYNE, C. M.; QUYYUMI, A. A. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. **Circulation**, v. 87, n. 5, p. 1468–1474, 1993.

PINTO, M.; SILVESTRE, C.; SILVA, M. R.; et al. Analysis of whey protein hydrolysates : peptide profile and ACE inhibitory activity. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, 2012.

POMPELLA, A.; MAGAGNA, A.; VIRDIS, A.; et al. Restoration of Nitric Oxide Availability After Calcium Antagonist Treatment in Essential Hypertension. **Hypertension**, v. 37, n. 3, p. 943–948, 2012.

POWIS, G.; BERGGREN, M. M.; GALLEGOS, A.; et al. Wortmannin, a Potent and Selective Inhibitor of Phosphatidylinositol-3-kinase. **Cancer Research**, p. 2419–2424, 1994.

PRIETO, J. C.; CASTILLO, R.; MIRANDA, H. F.; et al. Effect of Carvedilol and Nebivolol on Oxidative

Stress-related Parameters and Endothelial Function in Patients with Essential Hypertension. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 111, n. 5, p. 309–316, 2014.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist-Induced Endothelium-Dependent Relaxation in Rat Thoracic Aorta May Be Mediated through cGMP. **Circulation Research**, p. 352–357, 1983.

REES, D. D.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **British Journal of Pharmacology**, p. 746–752, 1990.

REGINA, M.; SCHOTT, C.; CORRIU, C.; SASSARD, J. Heterogeneity of endothelium-dependent vasorelaxation in conductance and resistance arteries from Lyon normotensive and hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, p. 1505–1512, 2003.

RENDIG, S. V.; SYMONS, J. D.; LONGHURST, J. C.; AMSTERDAM, E. A. Effects of Red Wine , Alcohol , and Quercetin on Coronary Resistance and Conductance Arteries. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, p. 219–227, 2001.

ROBERTSON, B. E.; NELSON, M. T.; NELSON, M. T. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. **Journal of the American Physiology Society**, p. 589–597, 2019.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate relaxing factor. **Journal of the American Physiology Society**, n. 18, p. 822–827, 2019.

SALAZAR, G. NADPH Oxidases and Mitochondria in Vascular Senescence. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 1–21, 2018.

SESSA, W. C.; FO, U. Nitric oxide synthases : regulation and function. **European Heart Journal**, p. 829–837, 2012.

SHIMOKAWA, H.; YASUTAKE, H.; FUJII, K.; et al. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 28, n. 5, p. 703–11, 1996.

SQUARE, C.; KINGDOM, U.; KINGDOM, U. Tempol , a membrane-permeable radical scavenger , reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. **Kidney International**, v. 58, p. 658–673, 2000.

STUEHR, D.; POU, S.; ROSEN, G. M. Oxygen Reduction by Nitric-oxide Synthases. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 49, 2001.

STURGESS, N. C.; COOK, D. L.; ASHFORD, M. L. J.; HALES, C. N. the Sulphonylurea Receptor May Be an Atp-Sensitive Potassium Channel. **The Lancet**, v. 326, n. 8453, p. 474–475, 1985.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. **Hypertension**, 2003.

TAVARES, T. G.; AMORIM, M.; GOMES, D.; et al. Manufacture of bioactive peptide-rich concentrates from Whey: Characterization of pilot process. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 110, p. 547–552, 2012.

TAVARES, T.; SEVILLA, M.-Á.; MONTERO, M.-J.; CARRÓN, R.; MALCATA, F. X. Acute effect of whey peptides upon blood pressure of hypertensive rats, and relationship with their angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, n. 2, p. 316–324, 2012.

THIEL, B. S. VAN; PLUIJM, I. VAN DER. The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 15, p. 3-14, 2015.

TOMIOKA, H.; HATTORI, Y.; FUKAO, M.; et al. Relaxation in Different-Sized Rat Blood Vessels Mediated by Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: Importance of Processes Mediating Precontractions. **Journal of Vascular Research**, v. 36, n. 4, p. 311–320, 1999.

TORRUCO-UCO, J. G. Antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: A review. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, n. 6, p. 156-168, 2008.

VALTCHEVA, N.; NESTOROV, P.; BECK, A.; et al. The Commonly Used cGMP-dependent Protein Kinase Type I (cGKI) Inhibitor Rp-8-Br-PET-cGMPs Can Activate cGKI in Vitro and in Intact Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 1, p. 556–562, 2009.

VANE, J. e SMITH, C. The discovery of captopril. **The FASEB Journal**, vol. 17, p. 788-789, 2003.

WAGHMARE, L. S.; SRIVASTAVA, T. K. Conceptualizing physiology of arterial blood pressure regulation through the logic model. **Advances in Physiology Education**, v.40, n. M, p. 477–479, 2019.

WALDRON, G. J.; DING, H.; LOVREN, F.; KUBES, P.; TRIGGLE, C. R. Acetylcholine-induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **British Journal of Pharmacology**, p. 653–658, 1999.

WANG, X.; WANG, L.; CHENG, X.; et al. Hypertension-attenuating effect of whey protein hydrolysate on spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 122–126, 2012.

WANSTALL, J. C.; JE, T. K.; GAMBINO, A.; LOVREN, F.; TRIGGLE, C. R. Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. **British Journal of Pharmacology**, n. 7, p. 463–472, 2001.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n. 1–4, p. 201–6, 2003.

WESTON, A. H. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Letter to Nature**,

p. 269–272, 1998.

WIER, W. G.; MORGAN, K. G.  $\alpha_1$ -Adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. **Reviews in Physiology Biochemistry and Pharmacology**, p. 91–139, 2003.

XU, C.; LU, Y.; TANG, G.; et al. Expression of voltage-dependent K<sup>2</sup> channel genes in mesenteric artery smooth muscle cells. **Journal of The American Physiological Society**, p. 1055–1063, 2019.

YAMAGUCHI, N.; KAWAGUCHI, K.; YAMAMOTO, N. Study of the mechanism of antihypertensive peptides VPP and IPP in spontaneously hypertensive rats by DNA microarray analysis. **European Journal of Pharmacology**, v. 620, n. 1–3, p. 71–77, 2009.

YIM, H. E.; YOO, K. H. Renin-Angiotensin System - Considerations for Hypertension and Kidney. **Electrolyte & Blood Pressure**, p. 42–50, 2008.

ZHAO, Y.; BRANDISH, P. E.; DIVALENTIN, M.; et al. Inhibition of Soluble Guanylate Cyclase by ODQ. **Biochemistry**, p. 10848–10854, 2000.