



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS E RENAIIS DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO
FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris*)**

JULIANA VILA VERDE RIBEIRO

GOIÂNIA-GO

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Juliana Vila Verde Ribeiro

3. Título do trabalho

EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS E RENAIIS DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris*)

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
- novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por Carlos Henrique Xavier Custodio, Professor do Magistério Superior, em 29/05/2023, às 15:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Juliana Vila Verde Ribeiro, Usuário Externo, em 30/05/2023, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3784370 e o código CRC 4A0BA750.

JULIANA VILA VERDE RIBEIRO

**EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS E RENAIIS DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO
FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como pré-requisito para a defesa de produto final - Nível Doutorado.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio
Coorientador: Prof. Dr. Karla de Aleluia Batista

GOIÂNIA-GO

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro , Juliana Vila Verde
EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS E RENAIIS DE PEPTÍDEOS
BIOATIVOS DO FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris*) [manuscrito] /
Juliana Vila Verde Ribeiro . - 2022.
CXXXIII, 133 f.: il.

Orientador: Prof. Carlos Henrique Xavier Custódio ; co-orientador
Karla De Aleluia Batista .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Goiânia, 2022.

Bibliografia. Anexos.

Inclui abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. :Feijão endurecido,. 2. PV3, . 3. peptídeos bioativos,. 4.
hipertensão,. 5. resistência à insulina e obesidade. . I. Custódio , Carlos
Henrique Xavier , orient. II. Título.

CDU 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 101 da sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas que confere a **Juliana Vila Verde Ribeiro** o título de Doutora em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos dezoito dias do mês de agosto de 2022, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS E RENAIIS DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris*)”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Carlos Henrique Xavier Custodio (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Karla de Aleluia Batista (IFG), coorientadora; Professor Doutor Marcio Alberto Torsoni (UNICAMP) membro titular externo; Professor Doutor Anderson de Souza Sant'Ana (UNICAMP), membro titular externo; Professor Doutor Rodrigo Mello Gomes (ICB - UFG), membro titular interno; Doutor Daniel Graziani (EVZ - UFG), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Carlos Henrique Xavier Custodio, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos dezoito dias do mês de agosto de 2022.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Alberto Torsoni, Usuário Externo**, em 22/08/2022, às 09:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karla de Aleluia Batista, Usuário Externo**, em 22/08/2022, às 09:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique Xavier Custodio, Professor do Magistério Superior**, em 22/08/2022, às 10:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Graziani, Técnico de Laboratório**, em 29/08/2022, às 14:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de](#)

[2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique De Castro, Coordenador de Pós- graduação**, em 31/08/2022, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3127779** e o código CRC **15A65E16**.

Referência: Processo nº 23070.040633/2022-46

SEI nº 3127779

O sábio nunca diz tudo o que pensa, mas pensa sempre tudo o que diz.

Aristóteles.

AGRADECIMENTOS

Ao longo do doutorado recebi muito conhecimento dos meus grandes orientadores, Carlos Henrique Xavier Custódio, Karla Batista, Kátia Flavia Fernandes e Marcio Torsoni. Em primeiro lugar, agradeço a orientação do prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio, que me orientou ao longo dos 5 anos, neste período, ele teve paciência e dedicação para ensinar e orientar sobre diversos assuntos sobre a ciência, bem como técnicas, produção e vivência no meio acadêmico. Costumo dizer que o Carlos foi meu pai da ciência, agradeço muito por fazer parte do seu time. Gostaria de agradecer a minha coorientadora Karla Batista, que me ensinou muito a respeito de produção de artigos, escrita científica, de técnicas e conceitos, sou muito grata por ter a sua orientação. Agradeço a professora Kátia, que sempre foi mãezona para mim, desde o início da minha vida acadêmica, sou grata por me ensinar tanto e não só na área científica, mas sobre a vida. Quero agradecer ao prof. Dr. Marcio Torsoni por abrir as portas do seu laboratório para eu aprender técnicas novas, conhecimentos novos e que me possibilitou adquirir uma das melhores experiências da minha vida.

Quero agradecer aos colegas do laboratório de neurobiologia de sistemas, Michele, Isabela, Jhulle, Gean e Daniel, que ajudaram e apoiaram nos experimentos e desenvolvimento do doutorado. Agradeço também ao professor Dr. Paulo Ghedini, Hericles Mesquita, Lara Naves, Amanda Barbosa, Helton e prof. Dr Gustavo Pedrino por me ajudar com técnicas experimentais que enriqueceram meu trabalho. Gostaria de agradecer aos alunos e professores do laboratório de distúrbios do metabolismo (LABDIME), Priscila, Wenicios, Suleyma, Carol Lobo, Mayara, Lais, Mayra, profa. Adriana Torsoni, profa. Leticia e profa. Marciane, aos ensinamentos de técnicas e de elaboração dos dados estatísticos, e em especial ao carinho que me receberam, sem dúvida foi uma experiência maravilhosa.

Agradeço imensamente aos meus amigos Mauricio, Viviane, Rafaela, Wanessa, Bruna, Isis, Jessica, Rebeca, Isadora, Mariana, Ana Clara e Marcos por me apoiarem e por me dar forças para continuar nessa caminhada, obrigada pelo companheirismo.

E por fim quero agradecer à minha família por me ajudar financeiramente e com apoio e carinho, agradeço muito à minha mãe Sandra, meu irmão Vinicius, ao meu pai Júlio e a minha tia Joana.

DEDICATORIA

Dedico primeiramente essa tese à Deus, pois sem ele não teria forças para chegar aonde eu cheguei, sem dúvidas ele foi minha fortaleza. Quero dedicar à minha família e aos meus grandes mestres, Carlos Xavier, Kátia Flavia e Karla Batista.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
LISTA DE AMINOÁCIDOS	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELA.....	18
RESUMO.....	19
ABSTRACT	21
IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE	23
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 FEIJO COMUM.....	25
2.2 PEPTÍDEOS BIOATIVOS	26
2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS	28
2.4 DOENÇAS CRÔNICAS	30
2.5 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA	31
2.6 FATORES QUE MODULAM A PRESSÃO ARTERIAL	32
2.7 PAPEL DO RIM NA REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	34
2.8 CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL ATRAVÉS DA VIA OXIDONITRÉRGICA	36
2.9 DIABETES E RESISTÊNCIA À INSULINA	37
2.10 REGULAÇÃO DOS NÍVEIS GLICÊMICOS.....	38
3. JUSTIFICATIVA	42
4. OBJETIVOS	44
4.1 OBJETIVOS GERAIS	44
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
5. METODOLOGIA.....	45
5.1 PROCEDIMENTOS GERAIS	45
5.2 MATERIAL	45
5.3 EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEICAS	45
5.4 COMPARAÇÃO COM BANCO DE DADOS.....	46

5.5 OSMOLARIDADE DO PV3.....	46
5.6 DETERMINAÇÃO DE ÍONS EM EXTRATO DE PROTEÍNA.....	47
5.7 ENSAIOS <i>EX VIVO</i> – EFEITO DO PV3 SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS RENAIIS ..	47
5.7 .1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	47
5.7.2 PAPEL DO ENDOTÉLIO VASCULAR NOS EFEITOS RELAXANTES DO PV3	49
5.7.3 CONTRIBUIÇÃO DA VIA OXIDONITRÉRGICA PARA OS EFEITOS VASORELAXANTES DO PV3	49
5.8 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> – EFEITOS DO PV3 NA FISIOLOGIA RENAL E HEMODINÂMICA	
CARDIOVASCULAR E RENAL	50
5.8.1 DROGAS.....	50
5.8.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA ATRAVÉS DE PLETISMOGRAFIA DE CAUDA	50
5.8.3 EFEITOS DE PV3 SOBRE A FUNÇÃO RENAL.....	50
5.8.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO PV3 SOBRE A RESPOSTA HEMODINÂMICA RENAL	
E AÓRTICA: REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), RESISTÊNCIA VASCULAR RENAL	
(RVR) E RESISTÊNCIA VASCULAR AÓRTICA (RVA).....	52
5.9 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> – EFEITOS DE PV3 SOBRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS DE	
CAMUNDONGOS	53
5.9.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	53
5.9.2 DIETA HIPERLIPÍDICA.....	54
5.9.3 AVALIAÇÃO DO GANHO DE MASSA E DO CONSUMO ALIMENTAR.....	56
5.9.4 GLICEMIA EM JEJUM	56
5.9.5 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG).....	56
5.9.6 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (TTI)	57
5.9.7 TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO (TTP)	57
5.9.8 COLETA DE ÓRGÃOS E TECIDOS	58
5.9.10 ENSAIO <i>EX VIVO</i> DE ESTÍMULO DO FÍGADO COM INSULINA	58
5.9.11 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E AVALIAÇÃO DE SUA EXPRESSÃO POR WESTERN BLOTTING	58
5.9.12 REAL-TIME Q-PCR	59
5.10 ANÁLISE E ESTATÍSTICA	60
6. RESULTADOS	61
6.1 COMPARAÇÃO COM BANCO DE DADOS.....	61
6.2 OSMOLARIDADE DO PV3.....	63
6.3 QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS DE SÓDIO E POTÁSSIO EM PV3.....	64
6.4 ENSAIOS <i>EX VIVO</i> - EFEITO DO PV3 SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS RENAIIS...	64

6.4.1 REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS RENAS	64
6.4.2 EFEITO RELAXANTE DE PV3 É DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO	65
6.4.3 EFEITO RELAXANTE DO PV3 É DEPENDENTE DE VIA OXIDONITRÉRGICA	66
6.5 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> – EFEITOS DO PV3 NA FISIOLÓGIA RENAL E HEMODINÂMICA CARDIOVASCULAR E RENAL	68
6.5.1 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	68
6.5.2 ESTUDO DA FUNÇÃO RENAL	68
6.5.3. ESTUDO DO PV3 SOBRE A FUNÇÃO CARDIOVASCULAR	80
6.6 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> VOLTADOS PARA O EFEITO DO PV3 SOBRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS DE CAMUNDONGOS APÓS 10 SEMANAS DE TRATAMENTO CRÔNICO	87
6.6.1 INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE PV3 POR 10 SEMANAS NO GANHO DE MASSA	87
6.6.2 INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE PV3 POR 10 SEMANAS NO INGESTÃO ALIMENTAR	89
6.6.3 INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE PV3 POR 10 SEMANAS NO PESO DOS ÓRGÃOS E TECIDOS	90
6.6.4 INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE PV3 POR 10 SEMANAS NA GLICEMIA EM JEJUM	92
6.6.5 INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE PV3 POR 10 SEMANAS NO TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG), TOLERÂNCIA À INSULINA (TTI), TAXA DE DECAIMENTO (TTKI) E TOLERÂNCIA AO PIRUVATO (TTP)	93
6.6.6 AVALIAÇÃO DA VIA DA INSULINA POR WESTERN BLOTTING APÓS 10 SEMANAS DE INGESTÃO DE PV3	96
6.6.7 AVALIAÇÃO DA VIA DA INSULINA POR RT- QPCR APÓS 10 SEMANAS DE INGESTÃO DE PV3	99
6.6.8 AVALIAÇÃO DE VIAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO POR RT- QPCR APÓS 10 SEMANAS DE INGESTÃO DE PV3	101
7. DISCUSSÃO	103
7.1 REVISÃO SISTEMÁTICA	103
7.2 OSMOLARIDADE E TEOR DE SÓDIO [Na ⁺] E POTÁSSIO [K ⁺] DO PV3	106
7.3 EFEITO DO PV3 NA VASOATIVIDADE DE ARTÉRIA RENAL	106
7.4 EFEITO DO PV3 SOBRE A FUNÇÃO RENAL	108
7.5 EFEITO DO PV3 NA HEMODINÂMICA VASCULAR	111
7.6 EFEITO DO PV3 NO CONTROLE DE GANHO DE MASSA E SACIEDADE	113
7.7 EFEITO DO PV3 NA HOMEOSTASE DE GLICOSE	116
8. CONCLUSÃO	120
REFERÊNCIAS	121

ANEXO 1.....139
ANEXO 2.....140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ECA – Enzima conversora de angiotensina

MS – Espectrometria de massas

ESI MS – Análise de ionização por eletroaspersão

MALDI MS – Análise por dessorção / ionização a laser

OMS – Organização Mundial da Saúde

SRAA – Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

ERO – Espécie reativa de oxigênio

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

PA – Pressão arterial

DC- Débito cardíaco

RP- Resistência periférica

FC- Frequência cardíaca

CV- Capacitância venosa

RV- Retorno venoso

O₂- Oxigênio

K⁺ - Potássio

BK- Bradicinina

PG- Prostaglandina

ADH- Hormônio antidiurético

Na⁺- Sódio

NaHCO₃⁻² Bicarbonato de sódio

WT- Wistar

SHR -*Spontaneously hypertensive rats*

Phe- Fenilefrina

Ach- Acetilcolina

Ang II- Angiotensina II

DM- Diabetes mellitus

L-Name- Éster metílico de N(gama)-nitro-L-arginina

NOS- Oxido nítrico sintetase

RFG- Ritmo de filtração glomerular

RVR- Resistência vascular da artéria renal

RVA- Resistência vascular de artéria aorta

GLUT4- Transportador de glicose 4

ATP-Trifosfato de adenosina

IR- Receptor de insulina

PI3K- Fosfoinosítídeo 3-quinase

AKT- Proteína quinase B

pAKT- Proteína quinase B fosforilada

FOXO1- Proteína O1 da caixa forkhead

PEPCK- Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

G6PASE- Glicose 6-fosfatase

PTEN- Proteína/lipídio fosfatase

PRKaa2 - Proteína Quinase AMP ativada na subunidade alfa 2

AMPK- Proteína quinase ativada por AMP

POMC - Neuropeptídeos pró-opiomelanocortina

PCK1- Fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1

CART- Neuropeptídeo cocaína e anfetaminas

NPY- Neuropeptídeo Y

AgRP- Proteína relacionada agoutil

HFD- Dieta hiperlipídica

CCE- Curva de concentração e efeito

CT- Dieta padrão

TTG- Teste de tolerância à glicose

TTI- Teste de tolerância à insulina

KTTi-Taxa de decaimento de glicose

TTP- Teste de tolerância ao piruvato

EPI- Tecido adiposo epididimal

RET- Tecido adiposo retroperitoneal

BAT- Tecido adiposo marrom

TFG- Taxa de filtração glomerular

ARC- Região do núcleo arqueado

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Cisteína	Cys	C
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática de alguns fatores que modulam a pressão arterial.	34
Figura 2	As vias de sinalização da insulina.	40
Figura 3	Representação esquemática de uma preparação de anel de aorta de ratos em banho de órgãos isolados.	48
Figura 4	Representação esquemática da sequência experimental do estudo de função renal.	52
Figura 5	Representação esquemática do delineamento experimental ao longo das 10 semanas de tratamento.	54
Figura 6	Avaliação da osmolaridade do PV3 na faixa de concentração de 50 a 1000 µg/mL.	64
Figura 7	Efeito vasorelaxante do PV3 em anéis de artérias renais de WT e SHR com o endotélio preservado (E+).	65
Figura 8	Avaliação do envolvimento endotelial no efeito vasorelaxante do PV3 em anéis de artérias renais extraídos de WT (painel A) e SHR (painel B).	66
Figura 9	Avaliação do envolvimento da via NOS nos efeitos vasorelaxantes dependentes de endotélio evocados por PV3 em anéis de artérias renais extraídos de WT (painel A) e SHR (painel B).	67
Figura 10	Comparação do peso corporal (g) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), amostrado 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg.	68
Figura 11	Comparação da massa de ração ingerida (g) (A) e de fezes (g) excretada(B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos	69

(SHR), amostrada 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg.

- Figura 12** : Comparação do volume de água ingerido (mL) (A) e Volume de urina calculado pelo peso (mL g⁻¹) (B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), amostrada 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. 70
- Figura 13** Comparação sódio urinário (painel A) e plasmático (painel B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. 71
- Figura 14** Comparação potássio urinário (painel A) e plasmático (painel B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. 72
- Figura 15** Comparação da creatinina plasmática (painel A) e urinária (painel B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. 73
- Figura 16** Clearance de creatinina por peso (ml/min/kg) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) 74

ou PV3 nas doses de 2,5 µ/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg.

- Figura 17** Comparação da ureia plasmática (painel A) e urinária (painel B) 75 entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µ/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg.
- Figura 18** Comparação da *clearance* de ureia entre os animais 76 normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µ/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg.
- Figura 19** Comparação da ácido úrico urinário (painel A) e sérico (painel 77 B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µ/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg.
- Figura 20** Comparação dos níveis de proteínas totais plasmática (painel 78 A) e urinária (painel B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µ/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg.
- Figura 21** Efeito do PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg sobre a pressão 80 arterial de ratos normotensos (WT).
- Figura 22** Efeito do PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg sobre a pressão 81 arterial de ratos hipertensos (SHR).

Figura 23	Efeito do PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg sobre a resistência vascular aórtica de ratos normotensos (WT).	83
Figura 24	Efeito do PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg sobre a resistência vascular aórtica de ratos hipertensos (SHR).	84
Figura 25	Efeito do PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg sobre a resistência vascular renal de ratos normotensos (WT).	85
Figura 26	Efeito do PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg sobre a resistência vascular renal de ratos hipertensos (SHR).	86
Figura 27	Influência da ingestão diária de PV3 por 10 semanas no ganho de massa corporal	87
Figura 28	Influência da ingestão diária de PV3 por 10 semanas no ganho de massa corporal.	88
Figura 29	Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento no consumo alimentar.	89
Figura 30	Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento no peso de órgãos e tecidos.	90
Figura 31	Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento na redução de adiposidade em tecido adiposo epididimal.	91
Figura 32	Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento na glicemia em jejum.	92
Figura 33	Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento no teste de tolerância à glicose (TTG).	93
Figura 34	Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento no teste de tolerância à insulina (TTI).	94

- Figura 35** Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 95
semanas de tratamento no teste de tolerância ao piruvato
(TTP).
- Figura 36** Efeitos da ingestão de PV3 na sinalização de insulina. Análise 96
representativa de Western blot de proteína conteúdo de IRS,
G6PASE, PI3K e PEPCK no fígado.
- Figura 37** Efeitos de ingestão de PV3 na sinalização de insulina. Análise 98
de expressão proteica de pAKT, IRS, G6PASE e PEPCK no
fígado após estímulo de soro ou insulina regular (10 μ MM) em
meio de cultura *ex vivo*.
- Figura 38** Efeitos de ingestão de PV3 na sinalização de insulina. Análise 99
representativa de RT-qPCR de genes expressos IRS, AKT,
G6PC, PI3K, PTEN, PRKAA2 e PCK1 no fígado.
- Figura 39** Efeitos de ingestão de PV3 na sinalização de insulina. Análise 100
representativa de RT-qPCR de genes expressos G6PC, PI3K e
PCK1 no fígado após estímulo de soro ou insulina regular (10
UI) em meio de cultura *ex vivo*.
- Figura 40** Efeitos de ingestão de PV3 no metabolismo energético. 101

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Tabela Comparativa da composição nutricional da dieta hiperlipídica e da dieta padrão utilizadas durante os experimentos.	54
Tabela 2	Composição de ácidos graxos do óleo de soja e banha utilizadas para preparo da dieta hiperlipídica dos animais.	55
Tabela 3	Comparação das sequências de aminoácidos encontrados pelo nosso grupo de estudo com sequências de aminoácidos encontradas por outros autores.	61
Tabela 4	Valores basais da PAM de WT e SHR dos grupos nas doses de 2,5 e 5 mg/kg do PV3.	79
Tabela 5	Valores basais da RVA e da RVR de WT e SHR dos grupos da dosagem de 2,5 e 5 mg/kg do PV3.	82
Tabela 6	Resumo da área sob a curva (AUC) dos testes TTG, TTI e TTP, e KTTI entre os grupos analisados.	95

RESUMO

O feijão comum é susceptível ao processo de endurecimento, uma vez endurecido não é comercializado, sendo considerado um resíduo da agroindústria. Entretanto é possível utilizá-lo como fonte de proteínas e peptídeos bioativos. Os peptídeos bioativos do feijão podem apresentar atividade antihipertensiva, antihiperlipemiantes, hipoglicemiantes, antioxidante e hipocolesterolêmico. Deste modo este trabalho buscou estudar a bioatividade da fração peptídica de baixo peso molecular extraída dos grãos do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) endurecidos sobre as funções renais, cardiovasculares e metabólicas. Para avaliar o efeito do peptídeo de feijão comum foi empregado as seguintes metodologias: I) Obtenção do extrato e fração peptídica – a partir do feijão endurecido foi feita uma farinha através do moinho de facas. Esta farinha foi usada para extração dos peptídeos e proteínas, utilizando uma solução combinada de acetonitrila, água e ácido fórmico (25: 24: 1), este extrato foi submetido ao processo de fracionamento, utilizando uma membrana de filtração de 3 kDa, este extrato foi denominado como PV3. II) Comparação das sequências de aminoácidos do PV3 com outras sequências de aminoácidos relatados por outros autores. III) Avaliação da osmolaridade e íons de sódio e potássio no extrato PV3. IV) Avaliação do efeito vasorelaxante e mecanismos fisiológicos envolvidos no vasorelaxamento em anéis de artéria renal de animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR). V) Avaliação dos parâmetros renais em animais WT e SHR. VI) Avaliação dos parâmetros hemodinâmicos em WT e SHR. VII) Avaliação dos ganhos de massa corporal e consumo alimentar em camundongos C57BL/6J submetidos a dieta hiperlipídica e administração por pseudogavagem de PV3. VIII) Avaliação dos níveis glicêmicos, teste de tolerância ao piruvato, a insulina e ao piruvato. IX) Avaliação dos mecanismos envolvidos do PV3 na via da insulina por Western Blotting e qPCR. X) avaliação do metabolismo energético do PV3 por qPCR. Os principais resultados deste estudo são: I) homologia de sequências aminoacídicas do PV3 com diversas sequências de aminoácidos descritos na literatura que apresentam atividade anti-hipertensiva, II) PV3 provoca efeito relaxante dependente do endotélio e de vias oxidonitrérgicas; III) PV3 causou efeito natriurético e diminuiu o ritmo de filtração glomerular; IV) PV3 causou efeito hipotensor concomitante à redução na resistência vascular nos leitos vasculares aórtico e renal; V) Preveniu os danos provocados pela dieta hiperlipídica, tais como redução da adiposidade e níveis glicêmicos.; VI) PV3

atua na via IRS/ PI3K e AMPK para reduzir os níveis glicêmicos; VII) PV3 atua na regulação do balanço energético. Tais achados são relevantes para o estudo molecular e fisiológico de peptídeos bioativos de origem alimentar; e estes resultados contribuem para o aproveitamento de feijões endurecidos na formulação de alimentos nutracêuticos para tratar a hipertensão, diabetes tipo 2 e obesidade.

Palavras chaves: Feijão comum, feijão endurecido, peptídeos bioativos, PV3, hipertensão, resistência à insulina e obesidade.

ABSTRACT

The common bean is susceptible to the hardening process and once hardened, it is not commercialized, being considered an agroindustry residue. However, it is possible to use it as a source of proteins and bioactive peptides. The bean bioactive peptides may have antihypertensive, antihyperglycemic, hypoglycemic, antioxidant and hypocholesterolemic activity. Thus, this work sought to study the bioactivity of the low molecular weight peptide fraction extracted from hardened common bean (*Phaseolus vulgaris*) grains on renal, cardiovascular and metabolic functions. To evaluate the effect of the common bean peptide, the following methodologies were used: I) Obtaining the extract and peptide fraction – from the hardened beans, flour was made using a knife mill. This flour was used to extract the peptides and proteins, using a combined solution of acetonitrile, water and formic acid (25: 24: 1), this extract was subjected to the fractionation process, using a 3 kDa filtration membrane, this extract was named as PV3. II) Comparison of PV3 amino acid sequences with other amino acid sequences reported by other authors. III) Evaluation of osmolarity and sodium and potassium ions in the PV3 extract. IV) Evaluation of the vasorelaxant effect and physiological mechanisms involved in vasorelaxation in renal artery rings from normotensive (Wistar) and hypertensive (SHR) animals. V) Evaluation of renal parameters in WT and SHR animals. VI) Evaluation of hemodynamic parameters in WT and SHR. VII) Evaluation of body mass gains and food consumption in C57BL6/6J mice submitted to a high-fat diet and administration of PV3 by pseudogavem. VIII) Assessment of glycemic levels, pyruvate, insulin and pyruvate tolerance test. IX) Evaluation of the mechanisms involved in PV3 in the insulin pathway by Western Blotting and qPCR. X) evaluation of the energy metabolism of PV3 by q PCR. The main results of this study are: I) homology of amino acid sequences of PV3 with several amino acid sequences described in the literature that show antihypertensive activity, II) PV3 causes a relaxing effect dependent on the endothelium and oxidonitric pathways; III) PV3 caused a natriuretic effect and decreased the glomerular filtration rate; IV) PV3 caused a hypotensive effect that was concomitant to a reduction in vascular resistance in the aortic and renal vascular beds; V) PV3 prevented the damage caused by the hyperlipidic diet, such as reduction of adiposity and glycemic levels.; VI) PV3 acts on the IRS/PI3K and AMPK pathway to reduce glycemic levels;

VII) PV3 acts in the regulation of energy balance. Such findings are relevant for the molecular and physiological study of bioactive peptides of food origin; and these results contribute to the use of hardened beans in the formulation of nutraceutical foods to treat hypertension, type 2 diabetes and obesity.

Keywords: Common beans, hardened beans, bioactive peptides, PV3, hypertension, insulin resistance and obesity.

IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE

Essa pesquisa de doutorado buscou estudar peptídeos bioativos, que são fragmentos proteicos com atividade biológica extraídos do feijão endurecido. O feijão endurecido é um feijão descartado pela agroindústria, ou seja, um alimento rejeitado pelo mercado consumidor. A utilização de um resíduo agroindustrial para o aproveitamento de moléculas bioativas contribui para a diminuição de desperdício de alimentos, que é um dos problemas socioeconômicos mais relevantes e discutidos ultimamente.

O potencial dos peptídeos é alto, visto que é possível utilizá-los para o tratamento de várias doenças, como hipertensão, diabetes, obesidade, ansiedade, doenças relacionadas ao estresse oxidativo e entre outras. Deste modo, este estudo avaliou o potencial dos peptídeos de feijão endurecido com ação anti-hipertensiva, hipoglicemiante e hipocolesterolêmico, o que pode ser usado na formulação de alimentos nutracêuticos para o tratamento e/ou prevenção de doenças cardiometabólicas.

1. INTRODUÇÃO

Grande parte da população mundial consome feijão (*Phaseolus vulgaris*), devido ao seu teor nutricional (1,2). O feijão é uma boa fonte de proteínas, fibra dietética, carboidratos, vitaminas e minerais (3). Entretanto, o armazenamento inadequado nas etapas pós-colheita pode ocasionar o desenvolvimento de um processo conhecido como endurecimento ou efeito “*hard-to-cook*”, ou seja, os grãos de feijão começam a sofrer alterações físicas e químicas que resultam em grãos com mais resistência ao cozimento (4). Alterações na coloração da casca dos feijões também são observados durante o armazenamento, e tais alterações de cor também interferem com a aceitação do grão pelo consumidor (3,5).

Apesar das alterações de cotilédones e casca contribuírem para a rejeição dos grãos endurecidos, sua composição em termos de nutrientes essenciais, como proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais, permanece inalterada. No entanto, a biodisponibilidade e digestibilidade destes nutrientes diminuem (6).

Nos últimos anos a indústria de alimentos voltou sua atenção aos alimentos que apresentem características nutricionais e benéficas à saúde, os chamados alimentos nutracêuticos (3,7) As pesquisas nesta área se concentram em produtos naturais ricos em compostos bioativos. Dentre estes alimentos, o feijão se enquadra nesse requisito, uma vez que apresenta polifenóis, amido resistente, oligossacarídeos e peptídeos capazes de modular respostas fisiológicas (8). Dentre estes compostos bioativos presentes no feijão, os peptídeos se destacam por atuar como ligantes, inibidores ou biomarcadores, podendo ser utilizados com fins terapêuticos e medicinais (9–11)

Os peptídeos bioativos são fragmentos proteicos que atuam sobre a função fisiológica dos organismos (12). Esses peptídeos são diferenciados pela sua composição de aminoácidos e estrutura química e tais características determinam o tipo de atividade biológica que o peptídeo potencialmente desenvolverá (12–14). Vários peptídeos bioativos são de ocorrência natural, ou seja, são encontrados em diversas fontes alimentares como o feijão comum (12). Relatos da literatura demonstram que estes peptídeos bioativos podem exercer diversas atividades, dentre elas a atividade antioxidante, quelante, anti-hipertensiva, hipoglicemiante e anticancerígena (12,15–17).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FEIJAO COMUM

O feijão é uma leguminosa mundialmente consumida, principalmente no Brasil, por apresentar nutrientes indispensáveis na alimentação, como por exemplo proteínas, minerais, carboidratos, vitaminas e lipídios (4,18,19).

O seu consumo é relatado há milhares de anos. Pesquisadores relatam que existem 3 bases concretas sobre a origem do feijão: a primeira teoria sugere que o feijão tenha se originado na região da Mesoamérica, que compreende o sudeste dos Estados Unidos até o Panamá, e zonas do México e Guatemala. Nessa região, teriam surgido grãos pequenos de feijão, os mesmos que são cultivados no Brasil. A segunda origem seria no sul dos Andes, que compreende o norte do Peru até as províncias do noroeste da Argentina, sendo observado a predominância de feijões com sementes grandes, como o feijão-jalo. A terceira origem seria no norte dos Andes, que corresponde a áreas da Colômbia, Venezuela até o norte do Peru. Nessa região teriam surgido cultivares de tamanho intermediário entre os dois tipos de feijões citados anteriormente (7). Deste modo, o consenso que se tem é que a origem do feijão tenha sido no continente americano (3). No Brasil, evidências encontradas em cavernas indicam que o cultivo do feijoeiro tenha se iniciado há mais de 2.000 anos atrás (1,7).

Atualmente, os países que mais cultivam o feijão são Índia, Brasil, Mianmar, México, Estados Unidos e China, sendo que o Brasil se enquadra em terceiro lugar, atrás apenas de Mianmar e Índia (1,2,7). Por mais que o Brasil seja um dos maiores produtores de feijão do mundo, o seu consumo interno vem caindo de 2010 até os dias atuais, sendo que naquele ano, o consumo aparente dessa leguminosa era de 3450 mil toneladas e atualmente o consumo aparente é de 3050 mil toneladas. Essa redução do consumo de feijão é resultado da menor oferta, uma vez que as áreas cultivadas de feijão têm sido reduzidas por consequência das dificuldades climáticas e do baixo valor agregado. Consequentemente, o valor final do feijão para o consumidor é mais alto, o que atinge as vendas no varejo e reduz a procura por parte dos consumidores (20). No intuito de diminuir as oscilações de valores do feijão decorrentes das condições climáticas e limitações com relação às condições de armazenamento prolongado, o feijão é cultivado em três safras ao longo do ano

(3,7,20). O armazenamento do feijão deve ser feito com cautela, pois altas temperaturas e umidade contribuem para endurecimento dos grãos (5,6). Demito e colaboradores (2019) relatam que os grãos devem ser armazenados em temperatura de 12°C para não endurecer, e assim prolongar o tempo de armazenamento. Entretanto, o feijão armazenado em galpões sob temperaturas elevadas acaba por sofrer alteração, tornando-o mais resistente ao cozimento, efeito conhecido como *Hard-to-cook*, ou difícil de cozinhar (5,6,17). Portanto, é necessário que se desenvolvam métodos mais eficientes de armazenamento, a fim de ampliar a estocagem na entressafra, garantindo um estoque regulador de preços, bem como de aproveitamento do potencial nutricional de feijões endurecidos (5,6,22,23).

Apesar da rejeição por parte do consumidor, mesmo depois de endurecido o feijão continua apresentando a mesma quantidade de nutrientes, alterando-se apenas sua biodisponibilidade, que fica reduzida (3,4). Deste modo, é possível melhorar o valor nutricional mediante aplicações biotecnológicas como autoclavagem, extrusão e tratamentos térmicos (3,22–24). Além disso, é possível utilizar os grãos de feijão endurecido como fonte de compostos bioativos, em particular peptídeos bioativos, visto que durante o processo de endurecimento muitas proteínas são hidrolisadas por proteases resultando em fragmentos menores, que podem apresentar atividade biológica (3,10,25).

2.2 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Os peptídeos bioativos são moléculas que atuam nas funções ou condições de um organismo, influenciando na saúde por atuarem como ligantes (por exemplo a angiotensina e insulina), inibidores (por exemplo peptídeos cíclicos e inibidores da enzima conversora de angiotensina - ECA), toxinas (por exemplo peptídeos de veneno de cobra), biomarcadores e moléculas de importância terapêutica (13,26,27). Por terem uma vasta gama de potenciais atividades biológicas, os peptídeos bioativos são alvos de muitos estudos na área da saúde e biotecnologia (11,26).

Os peptídeos são moléculas constituídas por sequências de 2 a 20 aminoácidos (11). Essas moléculas bioativas podem ser encontradas na forma livre ou encriptadas dentro de uma sequência proteica. Entretanto, quando estão encriptadas, elas não conseguem exercer uma atividade biológica, a menos que

sejam liberados peptídeos por processos de hidrólise química ácida ou alcalina, ação proteolítica de microrganismo ou hidrólise enzimática (11,21).

O estudo de peptídeos bioativos envolve etapas que antecedem a avaliação *in vivo* (26). Inicialmente, deve ser levado em consideração o método de extração que poderá resultar em peptídeos com atividade biológica de interesse (28). Posteriormente, é necessário avaliar as diferentes estratégias de purificação e identificação dos peptídeos (27,29,30). Resumidamente, o estudo de peptídeos bioativos envolve inicialmente a seleção da fonte proteica, processos de filtração através de membranas com tamanhos diferentes de poros, hidrólise por ação enzimática, hidrólise química ou processos fermentativos, seguido de um *screening in vitro* da atividade biológica de interesse; em seguida, se faz uma purificação do pool peptídico e sequenciamento da solução peptídica de interesse, e por fim, a avaliação do potencial bioativo em análises *in vivo* (26,28,29).

A etapa inicial do estudo de peptídeos bioativos é a fase mais importante, pois é necessário o conhecimento das propriedades e características físico-químicas do material, para então saber o método de extração ideal (3,31). Os métodos de extração são baseados nas propriedades que afetam a solubilidade da proteína (31), e podem incluir variações na força iônica (ex: solução salina), pH (ex: solução alcalina ou ácida), temperatura (ex: aquecimento ou congelamento) e constante dielétrica do solvente (ex: solução alcoólica) (32). Em processos de hidrólises para extração de peptídeos são utilizadas comumente enzimas como *Flavourzyme*®, pepsina, alcalase, quimiotripsina, neutrase, papaína, tripsina, entre outras (10,33).

A identificação de peptídeos por espectrometria de massas (MS) fornece uma medida altamente precisa de massa molecular de peptídeos, e é capaz de revelar rapidamente sequências de múltiplos pequenos segmentos de oligopeptídeos (de 2 a 30 resíduos de aminoácidos) em uma amostra de proteínas (31). A técnica MS baseia-se na determinação da relação entre massa e carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa. O equipamento possui uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados, onde podem ser empregadas 2 fontes de ionização: a análise de ionização por eletroaspersão (ESI MS) e a análise por dessorção/ionização a *laser* assistida por matriz (MALDI MS); ambas as análises têm

a função de ionizar de maneira suave, preservando a estrutura polipeptídica e transferir as espécies a serem analisadas para a fase gasosa (12,34).

Portanto, análises cromatográficas e espectrométricas são métodos eficientes e validados, capazes de avaliar em detalhes as sequências e estruturas de peptídeos, inclusive aqueles encontrados em feijão endurecido, como descrito previamente por nosso grupo (35). Neste mesmo trabalho, demonstramos que uma fração peptídica de baixo peso molecular extraída de feijão endurecido, que contém uma grande variedade de tamanhos e de sequências, é capaz de exercer atividades biológicas.

2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Existem inúmeros alimentos que apresentam propriedades biológicas que são considerados alimentos promotores de saúde, e em grande parte essas propriedades funcionais estão relacionadas a proteínas e peptídeos biologicamente ativos (36). Sendo assim, uma substância bioativa compreende componentes alimentares que afetam processos biológicos ou substratos, e conseqüentemente impactam a função ou condição corporal, sendo benéficos à saúde (13).

Alimentos tais como atum, sardinha, carne, ovos, trigo, milho, leite, arroz, cogumelos, soja e feijões são ricos em peptídeos bioativos com atividade antioxidante, anti-hipertensiva, hipocolesterolêmico, quelante, anti-glicemiante, e opioide (10,13,36–38,38). O consumo desses alimentos ricos em peptídeos bioativos com múltiplas funções tem um grande impacto na saúde e bem-estar, prevenindo infecções e doenças crônicas. A utilização de alimentos funcionais com intuito de prevenção acarreta na diminuição de custos na área da saúde que são esperados no futuro com o envelhecimento da população (38).

As atividades biológicas de cada peptídeo são ditadas pela composição de aminoácidos, sequência peptídica, tamanho, estrutura, tipo de aminoácido que se encontra na região C e N terminal, propriedade hidrofóbica e a carga do aminoácido (11,26,37). Dada a sua rica composição de aminoácidos, os peptídeos com potencial anti-hipertensivo estão entre as moléculas mais bem estudadas dentro da área de alimentos funcionais (26,39). A Organização Mundial da Saúde (OMS) destaca a importância do consumo de alimentos ricos em moléculas bioativas para o controle de

doenças cardiovasculares (40). Além do mais, nos últimos anos de 2015 a 2019 a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos aprovou 15 medicamentos peptídicos que corresponde a 7% do total de medicamentos aprovados neste intervalo de tempo, e no ano de 2021 foi aprovado 2 drogas a base de peptídeos bioativos (41,42). Os avanços em peptídeos com abordagens de triagem e biologia computacional (análises *in silico*) têm auxiliado no desenvolvimento de novas drogas peptídicas, como por exemplo, o desenvolvimento de drogas peptídicas para o tratamento de diabetes chamada de Exedina-4, um peptídeo agonista do receptor GLP-1 (37,43,44).

Grande parte dos peptídeos anti-hipertensivos relatados na literatura alcançam seus efeitos por inibirem a ECA e renina, reduzindo assim os efeitos do eixo pressor do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA). Tal sistema constitui um dos mecanismos fisiológicos que controlam a pressão arterial, e este processo se inicia com a ação da enzima Renina que faz a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I. Posteriormente, a ECA converte o peptídeo inerte angiotensina I no peptídeo pressor angiotensina II. O peptídeo angiotensina II age como um potente vasoconstritor em vasos sanguíneos (45). Deste modo, a inibição da renina e da ECA por outros peptídeos resulta na diminuição da pressão arterial (15,28,30,36). Algumas características são comuns a muitos peptídeos inibidores de ECA: a presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos ou aromáticos na região C-terminal, como por exemplo a tirosina, fenilalanina, triptofano e prolina. Por sua vez, a grande maioria dos peptídeos identificados como capazes de inibir a renina eram ricos em resíduo de prolina ao longo de sua sequência (30).

Além dos testes para potencial atividade anti-hipertensiva, há estudos focados em avaliar a atividade antioxidante de fontes alimentares (36) como o feijão, que podem neutralizar a ação dos radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ERO) (10,35). Os radicais livres são gerados no corpo em condições normais durante reações metabólicas, como a respiração. Entretanto, quando os radicais livres estão em níveis elevados podem gerar danos celulares, e conseqüentemente doenças como aterosclerose, diabetes e câncer (15). Além das condições normais fisiológicas, as ERO podem ser formadas a partir do consumo de alimentos gordurosos, substâncias tóxicas e álcool e fumaça de tabaco (45–48).

O feijão é indicado como um bom candidato de fonte de peptídeos bioativos, pois é uma planta que sob condições de estresse abiótico, como o estresse climático e as condições inadequadas de armazenamento, ou sob estresse biótico em condições ou infestação de pragas, está leguminosa sintetiza proteínas de defesa (10). Entre as proteínas associadas à defesa de plantas destacam-se as proteínas ricas em prolina, as ricas em glicina e inibidores de protease, que podem gerar após hidrólise peptídeos ricos em aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr e Phe) e aminoácidos com carga positiva (His e Arg) (10,36). Os grupos fenol, indol e imidazol desses aminoácidos atuam como doadores de prótons para espécies reativas, de modo a manter a estabilidade molecular e o equilíbrio redox intracelular (14,38).

Por fim, os peptídeos bioativos também podem apresentar efeito antidiabético. Os índices de morbidade e mortalidade por diabetes têm aumentado significativamente, e por essa razão, houve um aumento proporcional no número de estudos voltados para moléculas bioativas com potencial anti-hiperglicemiante e/ou hipoglicemiante (17,49,50). Estudos feitos por Valencia-Mejia e colaboradores (2019) demonstraram que peptídeos de feijão comum endurecido foram capazes de diminuir os níveis de glicose em amplitude similar à glibenclamida. Nesse mesmo estudo, 6 horas após o tratamento, os níveis de glicose estavam próximos ao nível normal, uma vez que os peptídeos diminuíram a resistência à insulina. Relatos da literatura afirmam que essa atividade pode estar associada com a inibição de enzimas importantes no metabolismo de carboidratos, tais como a α -glucosidase, amilase e o DPP-IV (44). Tal efeito inibitório está relacionado com a composição aminoacídica na região N-terminal e C-terminal, estudos *in silico* feitos por Nongonierma e colaboradores (51,52) relataram que aminoácidos hidrofóbicos como, Ala, Gly, Ile, Leu, Pro, Met, Glu e Val na posição N-terminal contribuíram para o aumento da inibição de DPP-IV por interagir com a bolsa hidrofóbica do sítio ativo da enzima. Por essa razão, os peptídeos têm recebido atenção por apresentar propriedades benéficas ao organismo comparado com drogas tradicionais que estão no mercado farmacêutico, com grande potencial para auxiliar no tratamento de doenças crônicas de maior incidência e prevalência.

2.4 DOENÇAS CRÔNICAS

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são atualmente as responsáveis pela maioria das doenças e mortes em muitos países, seja ele

desenvolvido ou subdesenvolvido (40). As DCNT incluem as doenças cardiovasculares, respiratórias crônicas, renais, diabetes e câncer. Segundo dados mais recentes da OMS as DCNT constituem sete das dez principais causas de morte no mundo, sendo que as doenças cardiovasculares lideram o ranking de mortes, seguido por diabetes e demência (53,54). Dados feitos no intervalo de tempo de 2000 a 2019, o número de mortes por doenças cardíacas aumentou de 2 milhões para 9 milhões no último ano de análise, correspondendo a 16% do total de mortes por todas as causas (54). Enquanto as mortes por diabetes aumentaram 70% mundialmente no período de 2000 a 2019, e com um aumento de 80% nas mortes entre os homens. Tais dados nos mostram a importância em desenvolver medidas que contribuam para o tratamento e prevenção das DCNT (55).

2.5 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma das doenças crônicas com maior morbidade no mundo, além de ser responsável por um aumento significativo de desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares, como aterosclerose, insuficiência e arritmia cardíaca (56). Estudos recentes, feitos com 1 milhão de indivíduos, indicaram que 31,1% da população adulta é hipertensa, sendo que 28,5% e 31,5% destes indivíduos estão nos países de maior e menor condição socioeconômica, respectivamente. Este estudo avaliou que o controle da hipertensão depende também das condições socioeconômicas, chegando a 28,4% nos países mais desenvolvidos e apenas 7,7% em menor grau socioeconômico. No Brasil, essa porcentagem de controle da hipertensão varia de 10,4% e 35,2% (54). Segundo estimativas da Sociedade Brasileira de Cardiologia, até 2030 9,2 milhões de mortes são causadas por doenças cardíacas isquêmicas e 8,5 milhões por acidente vascular encefálico (57).

A HAS é uma doença crônica caracterizada pelo aumento da pressão arterial sistólica e diastólica acima de 140/90 mmHg, podendo ser classificada como HAS primária ou secundária (57,58). Em 90% dos casos clínicos não existe uma causa secundária pré-definida (57), portanto, são considerados como HAS primária ou essencial, por desenvolverem aumento da resistência periférica total, resultando em vasoconstrição ou um aumento do débito cardíaco ou ambos (59). Em casos onde as

causas da HAS vão além das condições cardiovasculares, a hipertensão é classificada como secundária, podendo ser desencadeada por alterações neuroendócrinas como a síndrome de Cushing (cortisol) ou hiperaldoosteronismo e durante estenose de artéria renal (54,57,58).

Pela sua característica inicialmente assintomática, metade das pessoas desconhecem que tem um quadro hipertensivo, e por essa razão a HAS é caracterizada como uma doença silenciosa (59). Dentre os pacientes diagnosticados, apenas um quarto adere ao tratamento a ponto de terem seus níveis pressóricos adequadamente controlados (60).

A origem da HAS é multifatorial, associada aos fatores de risco modificáveis e não modificáveis, que podem modular o quadro clínico do paciente. São considerados fatores de risco modificáveis: a alimentação inadequada, sedentarismo, uso de tabaco, consumo exagerado de álcool, estresse, glicemia alta, colesterol e/ou triglicérides elevados, sobrepeso e obesidade. Os fatores de riscos não modificáveis incluem gênero, idade, etnia e histórico familiar (hereditariedade) (58). Apesar do conhecimento acerca de muitos dos componentes fisiopatológicos do quadro hipertensivo, tal doença ainda afeta a população mesmo com múltiplas alternativas terapêuticas. Portanto, ainda é necessário o estudo de alternativas terapêuticas que somem ao arsenal atualmente disponível (36).

2.6 FATORES QUE MODULAM A PRESSÃO ARTERIAL

Em condições normais a pressão arterial (PA) mais elevada na circulação encontra-se no ventrículo esquerdo com valor aproximado de 120 mmHg, resultante da abertura da válvula aórtica e início da fase de ejeção sistólica. Após o fechamento da válvula aórtica, a pressão diminuiu progressivamente até os valores diastólicos próximos a 80 mmHg (45,47,48,61).

Em linhas gerais a PA é uma variável física (expressa em força/unidade de área) dependente do volume sanguíneo presente no leito arterial (sendo uma relação conteúdo/continente). É marcada por fatores funcionais que definem, momento a momento, a entrada de sangue no compartimento arterial (débito cardíaco, DC), bem como a resistência à sua saída desse compartimento (resistência periférica, RP). O DC depende da frequência cardíaca (FC) e do volume sistólico (VS), que é

determinado pela contratilidade combinada com pré-carga e RP (45). Em seguida, a pré-carga ou retorno venoso (RV) depende do volume sanguíneo (volemia) e de vários mecanismos que mantêm o retorno do sangue ao coração, entre os quais se destaca a capacitância venosa (CV). Deste modo, estão presentes os mecanismos que regulam a PA e fazem as alterações instantâneas por meio da CV e RV, do DC ($FC \times VS$) e da RP, ou de alterações a longo prazo. Estes fatores, alterando a quantidade de sangue presente no leito arterial em um dado instante, marcam o nível momentâneo da PA (45,48).

Existe uma série de fatores que modulam a PA, e estes fatores são reunidos em duas grandes classes: 1) os de ação imediata, que envolvem mecanismos ativos que atuam em segundos e/ou minutos, apresentando regulações de curto e médio prazo; 2) os de ação mais prologada e duradoura, tendo regulações a longo prazo (45,48,61).

A regulação a curto e médio prazo envolve fatores locais que são os fatores miogênicos, metabólicos (O_2 , pH, K^+ , osmolaridade), parácrinos/ autócrinos (Brdicininina (Bk), Prostaglandina (PG), Histaminas, 5-HT e entre outros), fatores endoteliais e temperatura. Os fatores neuronais que estão envolvidos nessa regulação envolvem os mecanorreceptores arteriais, quimiorreceptores arteriais, receptores cardiopulmonares, receptores aferentes renais, termoreceptores e receptores musculares esqueléticos. Por fim, outro fator que está relacionado com a regulação a curto e médio prazo é o fator hormonal, que inclui as catecolaminas (epinefrina e norepinefrina), sistema renina-angiotensina-aldosterona, vasopressina, ocitocina e peptídeo atrial natriurético. Por outro lado, a regulação a longo prazo envolve mecanismos de feedback, incluindo aqueles que controlam a relação entre os rins e os fluidos corporais (balanço ingestão/excreção de água e sais) (45–47,61). A figura 1 representa a combinação de fatores que influenciam a PA.

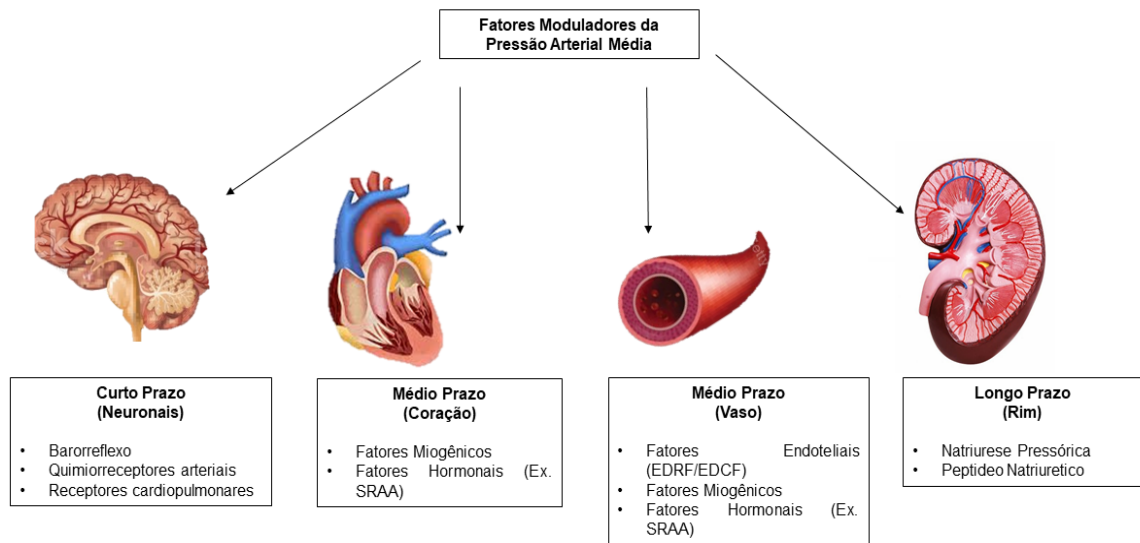


Figura 1. Representação esquemática de alguns fatores que modulam a pressão arterial. Fonte: Autor.

2.7 PAPEL DO RIM NA REGULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

O controle da PA é bastante preciso. Entretanto, quando os mecanismos de controles de curto e médio prazo não conseguem promover o equilíbrio, entram em ação os controles da PA a longo prazo, que são responsáveis por uma atividade regulatória ao longo de semanas e meses (46). O controle a longo prazo da pressão arterial está intimamente ligado à homeostasia do volume de líquido corporal, determinado pelo balanço entre a ingestão e a eliminação de fluidos, conhecido como *feedback* rim/fluidos corporais (62–65).

O pesquisador Guyton desenvolveu em 1961, à partir de seus experimentos, um modelo experimental que posicionou o rim como o ponto chave no controle da pressão arterial a longo prazo através do equilíbrio hidroeletrolítico, resultante da excreção de sódio e água, afirmando assim, que o rim é um dos grandes responsáveis pelo controle circulatório (66). Deste modo, a regulação da PA pelos rins se dá através da regulação do volume circulatório controlado pelo equilíbrio de sódio e água, denominado como natriurese/ diurese pressórica (45). A pressão de natriurese atua quando o volume sanguíneo aumenta e a capacitância vascular não é alterada, resultando em uma pressão arterial alta. Essa elevação faz com que os néfrons reduzam a reabsorção de sódio e água, aumentando a excreção de sódio e água, normalizando assim a pressão e reduzindo o débito cardíaco (62,65,67).

O mecanismo de *feedback* rins - fluidos corporais não se adapta às alterações do nível da PA. Ou seja, mesmo que haja alterações do nível da PA, o mecanismo de *feedback* continuará ativado para restaurar a PA a seu nível basal e/ou ponto de equilíbrio (46,61). Essa capacidade do rim de não se adaptar às alterações da PA é muito importante pois confere um ganho infinito ao balanço ingestão/excreção de água e sais, e conseqüentemente consegue atuar de forma lenta e contínua até restabelecer a PA ao equilíbrio, o que pode durar dias e meses (46,64,65,68).

Anormalidades no mecanismo da pressão de natriurese podem acontecer, resultando em distúrbios no ponto de equilíbrio da PA, por exemplo o surgimento da hipertensão (67). As anormalidades surgem por alteração do *feedback* rins-fluidos corporais. Por exemplo, a alteração do *feedback* rins-fluidos corporais pode ser observado quando há um aumento excessivo na produção de Angiotensina II (Ang II), ou hiperatividade do sistema simpático ou alteração da capacidade excretora intrínseca (doença renal). Nesse caso, pode haver uma diminuição na capacidade de excreção dos rins, com conseqüente retenção de sódio e água, caso a ingestão destes permaneça constante. O acúmulo de fluido continuaria até que a PA aumentasse o suficiente, a ponto de restaurar a excreção renal, induzindo um novo ponto de equilíbrio entre ingestão e excreção renal de sódio e água (45). Sendo assim, a hipertensão arterial pode resultar em uma redução da capacidade de eliminar sódio em resposta ao aumento da ingestão ou da falta de habilidade dos rins em promover pressão de natriurese (69).

Os rins também são capazes de controlar a PA através da produção de moléculas bioativas, como as prostaglandinas, o óxido nítrico, moléculas do SRAA, peptídeos natriuréticos, BK e hormônio antidiurético (ADH). A via clássica mais estudada de controle da pressão arterial é o SRAA. O primeiro componente liberado dessa via é a renina, uma enzima proteolítica sintetizada e estocada nas células justaglomerulares renais, e secretada para a circulação sistêmica em resposta a um estímulo (45,61). O SRAA é um dos mais potentes sistemas vasoativos e tem papel crítico na regulação da pressão arterial e na homeostase do sódio, compreendendo desde a ação vasoativa da Ang II até a estimulação da zona fasciculada da glândula adrenal para a síntese e liberação do mineralocorticóide aldosterona (70).

A Ang II é um dos mais potentes hormônios responsáveis pela retenção de sódio no corpo. As ações intrarrenais diretas da Ang II que contribuem para aumentar a reabsorção tubular são complexas, incluindo constrição das arteríolas glomerulares, o que altera a dinâmica capilar peritubular e o fluxo sanguíneo medular renal, e ações diretas no transporte realizado por células epiteliais tubulares (70). No túbulo proximal, local onde ocorre cerca de 70% da reabsorção de sódio, a Ang II estimula a reabsorção de fluido por aumentar o transporte transcelular de sódio e bicarbonato via ativação do trocador Na^+/H^+ na membrana apical e do cotransporte $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ e da $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ na membrana basolateral e via inserção H^+-ATPase na membrana apical (45,64).

Já a aldosterona atua principalmente nas células principais dos ductos coletores, onde estimula o aumento da densidade de canais para Na^+ e K^+ na membrana luminal e a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ basolateral. Dessa maneira, a aldosterona promove a retenção de cloreto de sódio e secreção de potássio nas células principais dos ductos coletores corticais (71).

2.8 CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL ATRAVÉS DA VIA OXIDONITRÉRGICA

A pressão arterial pode ser modulada por fatores vasoativos que atuam no endotélio vascular com o intuito de controlar a resistência vascular e o fluxo sanguíneo, conseqüentemente o débito cardíaco (72). Deste modo, os fatores vasoativos atuam no tônus vascular promovendo efeito constritor (endotelina, prostaglandinas, angiotensina II e espécies reativas de oxigênio) ou relaxante (Óxido nítrico, prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)) (45).

Um dos principais fatores de relaxamento do endotélio de ação fisiológica é o óxido nítrico (NO), ele participa da homeostase dos vasos sanguíneos, promovendo a vasodilatação do tônus vascular influenciando no controle do fluxo sanguíneo e manutenção da PA (73). Ele é liberado quando há um aumento da tensão de cisalhamento exercida pelo sangue na parede das células endoteliais, em situações de aumento do fluxo sanguíneo para um determinado território. As células endoteliais têm em suas paredes canais de cálcio sensíveis à tensão de cisalhamento exercida pelo sangue que flui no interior do lúmen vascular. Uma vez detectado o aumento da tensão, há a abertura destes canais de cálcio, seguido do influxo de cálcio para as

células endoteliais (45). O aumento da concentração intracelular de cálcio ativa a enzima sintase de óxido nítrico (Nos), que cliva o aminoácido L-arginina em L-citrulina (metabólito inativo) e NO (46).

A literatura descreve que existe três isoformas da NOS, a primeira é estimulada pelo sistema imunológico e/ou por diversas patologias, esta é chamada de NOS induzida (iNOS ou isoforma II), as outras isoformas são constitutivas, chamadas de endotelial (eNOS ou isoforma III) e a neuronal (nNOS ou isoforma I) (45). A atividade enzimática da eNOS e nNOS podem ou não depender do aumento de Cálcio intracelular, porém a iNOS é ativada independente de cálcio (35,73).

Em se tratando do eNOS e do resultado de sua atividade, sabe-se que o NO endotelial se difunde pelas células musculares lisas vasculares vizinhas, justapostas à camada endotelial, levando a uma série de eventos que resultam na diminuição do cálcio intracelular miocítico, através da redução do influxo e/ou inibição da liberação de cálcio no retículo sarcoplasmático, isso faz com que a célula fique hiperpolarizada, promovendo inibição do tônus vasomotor e assim, o relaxamento do vaso (35,72).

Em quadros de hipertensão ocorre a disfunção endotelial (74), que é caracterizada pelo prejuízo no relaxamento vascular dependente do endotélio, comprometendo a vasodilatação de vários leitos vasculares, como por exemplo artérias de resistências, coronárias e aorta (75). Neste caso, há uma diminuição na síntese e/ou liberação dos fatores de relaxamento do endotélio, diminuição da sensibilidade ao NO na parede das células musculares ou pode ocorrer o aumento da produção de endotelina e ânion superóxido (O_2^-) (45,73), resultando no aumento da vasoconstrição, contribuindo no aumento do fluxo sanguíneo e conseqüentemente aumento da PA (46).

2.9 DIABETES E RESISTÊNCIA À INSULINA

Assim como doenças cardiovasculares e renais, doenças metabólicas como Diabetes Mellitus (DM) tem alta incidência e prevalência. A DM tem como característica o aumento crônico da glicemia, e é uma das comorbidades que mais afetam indivíduos no mundo (76). Dados epidemiológicos do Ministério da saúde do Brasil relatam que em 2020 cerca de 9,3% dos adultos, entre a faixa etária de 20 a 79 anos vivem com diabetes, e 1,1 milhão de crianças e adolescentes com menos de 20 anos tem diabetes tipo 1 (55). Estimativas feitas pela Federação Internacional de Diabetes, mostram que o aumento do número de casos de diabetes pode chegar a

628,6 milhões de pessoas em 2045 (77). Estes dados nos deixam um alerta para que sejam tomadas medidas de prevenção pelas entidades de saúde e estudos voltados para prevenção e tratamento de doenças relacionadas aos distúrbios metabólicos.

O DM é classificado em tipo I e tipo II, indivíduos com DM tipo I apresentam deficiência de insulina devido à insuficiência das células β -pancreáticas; sendo que a administração de doses de insulina é umas das terapias primárias para diminuir a hiperglicemia e reduzir os riscos de disfunção cardiovascular (70). Diferente do DM tipo I que é uma doença autoimune, o DM tipo II é desencadeado por maus hábitos alimentares como o excesso de açúcares e gorduras, sedentarismo, tabaco e estresse. O diabetes tipo 2 ocorre pela deficiência da sinalização da insulina para regular a glicose, aumentando os níveis glicêmicos. Nestes casos inicialmente os altos níveis de glicemia levam a diminuição da sensibilidade à insulina, desencadeando a resistência à insulina e deficiência na sua produção e secreção pelas células β pancreáticas, levando ao diabetes tipo 2 (70–73).

A resistência à insulina é conhecida como uma resposta biológica atenuada a uma determinada concentração de insulina, causando alterações intracelulares e levando a prejuízos na translocação de vesículas que contém transportador de glicose 4 (GLUT4), diminuindo a captação de glicose em tecidos responsivos à ação da insulina, aumentando a glicemia (72,74). Existem diversas doenças que estão associadas a resistência à insulina, como a intolerância à glicose, dislipidemias (aumento dos níveis de triglicérides e colesterol), disfunção endotelial, mudanças hemodinâmicas, aumento de marcadores inflamatórios e alterações no sono (73). No estado pré-diabético, as células β pancreáticas tentam manter a homeostase glicêmica através do aumento da produção e secreção de insulina, podendo haver hiperinsulinemia associada à resistência (75).

2.10 REGULAÇÃO DOS NÍVEIS GLICÊMICOS

A glicose é um monossacarídeo importante para o corpo para que se obtenha energia em forma de Trifosfato de adenosina (ATP). O controle dos níveis de glicose na corrente sanguínea e nos tecidos envolvem uma série de reações químicas, para que o organismo entre em homeostase (12,45). Deste modo, existem mecanismos que envolvem: 1) A conversão de glicose em glicogênio, denominado como

glicogênese, sendo este estimulado pela insulina; 2) A conversão de glicogênio em glicose, denominado de glicogenólise, estimulado pelo glucagon; 3) A conversão de glicose em ácido pirúvico, denominado de glicólise e 4) A conversão de triglicerídeos e aminoácidos em glicose, denominado de gliconeogênese, sendo este estimulado pelo glucagon e cortisol (45,61).

O aumento da glicemia faz com que seja secretado a insulina pelas células β pancreáticas, uma vez na corrente sanguínea, inicia a sinalização da insulina através da ligação dessa proteína com o seu receptor (IR), localizado na membrana plasmática de todas as células responsivas à insulina, dentre elas os hepatócitos, adipócitos e células musculares (78,79). Inicialmente a insulina se liga à subunidade alfa, o que permite que a subunidade beta adquira atividade quinase, levando à alteração conformacional e à autofosforilação do receptor nas subunidades beta em alguns resíduos de tirosina (1158, 1162, 1163), o que aumenta ainda mais sua atividade quinase. Em seguida, ocorre a fosforilação em tirosina das proteínas IRS, onde cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src2 (SH2). A fosforilação das proteínas IRSs cria sítios de ligação para outras proteínas como a fosfatidilinositol 3 quinase (PI3k), promovendo sua ativação. Esta proteína é um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A fosforilação dos sítios de tirosina das proteínas IRS liga-se ao domínio proteico com homologia Src 2 (SH2) da subunidade p85 da PI3k, estimulando, assim, o sítio catalítico (p110). Logo após, a enzima PI3k catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol 3,4 difosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3). O PIP3 regula a (proteína quinase dependente de 3-fosfoinositídeos) (PDK1). A enzima PDK1 é uma proteína serina/treonina quinase que fosforila e ativa outra serina/treonina quinase conhecida como Akt ou proteína quinase B. A Akt é parcialmente ativada por fosforilação de treonina 308 pela PDK1. A ativação completa requer fosforilação do resíduo serina 473, o qual pode ser catalisado por múltiplas proteínas, incluindo a PDK2. As proteínas Akt exerce efeitos fisiológicos finais da ação da insulina, destacando fosforilação do substrato da Akt de peso molecular 160 kDa (Akt Substrate - AS160). A proteína AS160 é uma proteína ativadora de GTPase (GAP). No estado basal encontra-se ligada as vesículas GLUT4 e se dissocia dessa após estímulo com insulina. A dissociação da proteína AS160 das vesículas que contêm os transportadores GLUT4 permite a translocação e exocitose destas

vesículas na membrana, aumento da expressão de GLUT4 e conseqüentemente, o aumento da captação de glicose. O esquema da sinalização da insulina pode ser visto na figura abaixo.

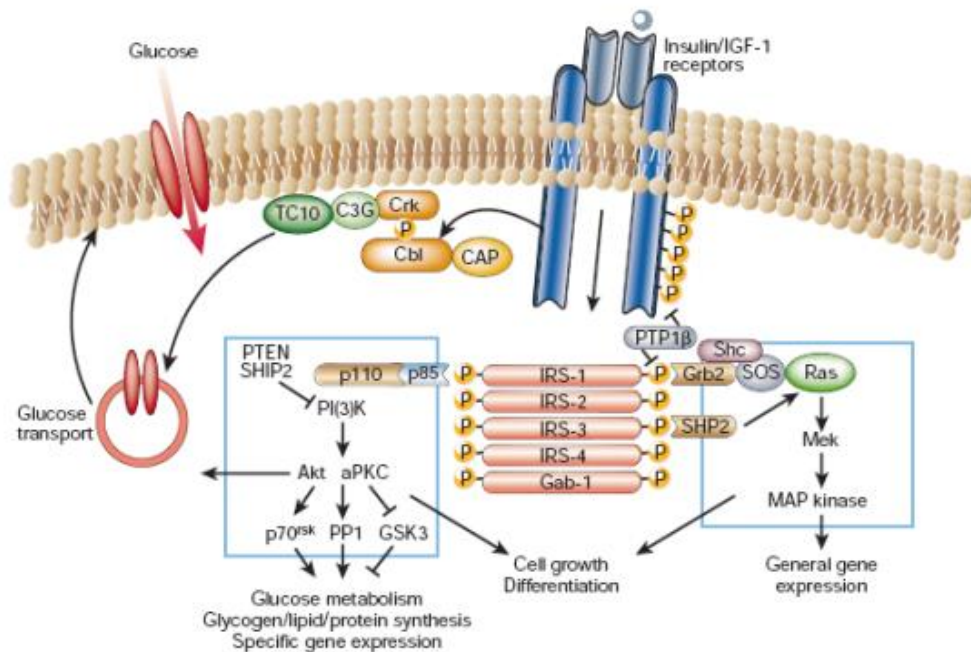


Figura 2: As vias de sinalização da insulina. O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-K, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário. Fonte. (80).

Em uma condição em que há resistência à insulina, podem surgir diferentes respostas no hepatócito, adipócitos e células musculares. No fígado, por exemplo, há a diminuição da glicogênese e o aumento da glicogenólise, lipólise e gliconeogênese, em virtude da ação prejudicada da insulina em exercer efeitos sobre proteína O1 da caixa forkhead (FOXO1), contribuindo para a maior transcrição de genes envolvidos na via gliconeogênica, como o fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (81).

Quando se tem a resistência à insulina associada com a obesidade, várias alterações ocorrem na sinalização da insulina, como a diminuição da concentração e atividade quinase do IR, da fosforilação de tirosina dos substratos de insulina IRS-1 e

IRS-2 e redução da atividade de PI3K (82). Em alguns casos, onde há o aumento de processos inflamatórios, a cascata de inflamação pode inibir a IRS pela fosforilação do receptor em serina e assim comprometendo a atividade de PI3K e a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (81–83). Deste modo, a resistência à insulina em conjunto com a obesidade desencadeada pelo alto consumo de gorduras e açúcares, acarretam aumento da adiposidade e processos inflamatórios, alterando as vias moleculares. A fisiopatologia de doenças metabólicas culmina em consequências cardiovasculares e renais, como por exemplo, a nefropatia diabética. Portanto, o estudo de vias envolvidas e de moléculas que atuem sobre tais vias pode revelar novos caminhos para o tratamento de doenças cardiometabólicas e dos desdobramentos renais em médio e longo prazo.

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente os hábitos alimentares da população estão mais pobres em decorrência do ritmo acelerado da vida atual, onde as pessoas acabam optando por se alimentar com comidas rápidas - *fast food* (55,57). Outro agravante para a mudanças dos hábitos alimentares, principalmente no Brasil, está relacionado com o alto preço dos alimentos após a pandemia do coronavírus (COVID-19), principalmente na região norte e nordeste do país, onde prevalece pessoas de baixa renda, que estão optando por consumir alimentos industrializados, com alto índices de gorduras e açúcares (84). Deste modo, a falta de consumo de alimentos saudáveis, a ingestão excessiva de calorias e a inatividade física vem contribuindo para o aumento na incidência e prevalência de doenças como obesidade e distúrbios metabólicos, que contribuem de maneira importante para o surgimento de comorbidades como diabetes e as doenças cardiovasculares (60,71).

Muito embora haja tratamentos disponíveis, doenças cardiovasculares, metabólicas e renais ainda tem alta incidência e prevalência, com conseqüente redução na qualidade de vida da população e com altos custos de tratamento. Esse cenário é uma justificativa robusta para a constante busca por compostos bioativos capazes de contribuir para a redução de tais doenças e suas comorbidades, e com potencial de agir sobre diferentes pontos da fisiopatologia destas doenças. Dentre os diversos compostos bioativos, se destacam os peptídeos bioativos de baixo peso molecular, com alta biodisponibilidade e com o comportamento molecular flexível (16). Os peptídeos bioativos permitem a interação com diferentes proteínas/ receptores *in vitro* e *in vivo*, resultando em atividade anti-hipertensiva, antioxidante, quelante, hipoglicemiante, antimicrobiana, antitrombótica e redução da adiposidade (13,14,26,37,38,43,85,86).

Os estudos voltados aos peptídeos bioativos demonstram sua atividade *in vitro* e *ex vivo*. Entretanto, pouco se sabe sobre os seus mecanismos fisiológicos, moleculares e os alvos específicos *in vivo* (16). Deste modo, surge a necessidade de desvendar os efeitos adicionais e os mecanismos fisiológicos e moleculares dos peptídeos de origem alimentar que resultam em atividade anti-hipertensiva, hipoglicemiante e a influenciam o balanço energético. Dentre as diversas fontes

alimentares, este estudo se dedicou aos peptídeos oriundos de feijão, por este grão apresentar 30 a 40% de teor proteico, sendo fonte de peptídeos bioativos (5,6).

Frente à constante necessidade de aproveitamento de alimentos, deve ser considerada a possibilidade de uso do feijão endurecido (25). Sabe-se que 2 a 3 mil toneladas de feijão não são utilizadas na alimentação humana em função do endurecimento ou da separação de cotilédones durante o processamento (3,4,23). Deste modo, a ideia deste estudo é utilizar feijões endurecidos, que são considerados resíduos da agroindústria, para extrair peptídeos bioativos e assim reaproveitar o feijão que seria descartado, com algum benefício para a saúde humana. Portanto, este estudo objetivou avaliar os efeitos da fração peptídica de baixo peso molecular (fração menor que 3 kDa) de *Phaseolus vulgaris* endurecido (PV3) sobre a função renal e cardiovascular durante a hipertensão, e mecanismos moleculares que estão relacionados com resistência à insulina e homeostase energética durante tratamento crônico com dieta HFD e PV3.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar a bioatividade da fração peptídica de baixo peso molecular extraída dos grãos do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) endurecidos sobre as funções renais, cardiovasculares e metabólicas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e identificar os peptídeos do extrato proteico (PV3) advindo de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*);
- Avaliar a osmolaridade do extrato PV3;
- Avaliar as respostas cardiovasculares evocadas pela injeção aguda do PV3 em ratos Wistar (normotensos) e espontaneamente hipertensos (SHR);
- Investigar o efeito da administração aguda do PV3 sobre a reatividade vascular em artéria renal de ratos Wistar e SHR;
- Avaliar os mecanismos envolvidos no efeito relaxante do PV3 em artéria renal de ratos;
- Estudar o efeito da administração aguda e crônica do PV3 sobre comportamentos ingestivos e sobre a função renal de ratos Wistar e SHR;
- Avaliar a influência do PV3 no ganho de massa corporal em camundongos submetidos ao tratamento crônico de 10 semanas com ingestão de dieta hiperlipídica (HFD);
- Avaliar a influência do PV3 no consumo alimentar de camundongos submetidos ao tratamento crônico de 10 semanas com ingestão de HFD;
- Verificar a influência do PV3 na glicemia de camundongos submetidos ao tratamento crônico com ingestão de HFD;
- Verificar as vias envolvidas que o PV3 atua para a modulação da glicemia de camundongos submetidos ao tratamento crônico com ingestão de HFD, através de testes de tolerância à glicose, a insulina e ao piruvato;
- Identificar a via de sinalização da insulina hepática que o PV3 possa estar atuando para o controle da glicemia de camundongos submetidos ao tratamento crônico com ingestão de HFD;
- Identificar a modulação do PV3 em vias moleculares do balanço energético e consumo alimentar no hipotálamo de camundongos submetidos ao tratamento crônico com ingestão de HFD;

5. METODOLOGIA

5.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

Para avaliar os efeitos do PV3 na hemodinâmica cardiovascular e renal foram usados ratos Wistar uma linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, que apresenta uma condição normotensa e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) machos e com idade aproximada de 8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UFG. Os protocolos experimentais foram aceitos pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (Protocolo 084/18 – Anexo 1).

Para avaliar os efeitos do PV3 na resistência à insulina e na obesidade foram utilizados camundongos C57BL/6J machos adquiridos da colônia do centro multidisciplinar para investigação biológica na área da Ciência em Animais do Laboratório - Unicamp (CEMIB), com aproximadamente 8 semanas de idade. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, registrada com o nº 5857-1/2021 (Anexo 2).

5.2 MATERIAL

O material utilizado no presente estudo foi fornecido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Arroz e Feijão (Santo Antônio de Goiás, Goiás). Os feijões fornecidos pertencem à espécie *Phaseolus vulgaris*, cultivar BRS Pontal, do grupo comercial carioca. Para o endurecimento dos feijões foi utilizada a metodologia descrita por Ribeiro e colaboradores (2017). Para tanto, os grãos foram armazenados em estufa, por 120 dias à temperatura média de 40 °C (\pm) e 75% (\pm) de umidade relativa.

As farinhas foram produzidas com feijões descascados manualmente, passados em moinho de facas e posteriormente tamizados (500 μ m). As farinhas foram armazenadas em sacos plásticos com vedação e acondicionadas em geladeira, a 4 °C.

5.3 EXTRAÇÃO DAS FRAÇÕES PROTEICAS

Para fazer a extração das frações proteicas utilizou-se a metodologia descrita por Mahatmanto e colaboradores (2014), com modificações. Nesta extração, a cada 10 g de farinha foram adicionados 50 mL de uma solução contendo acetoneitrila, água e o ácido fórmico na proporção 25: 24: 1. A amostra foi submetida à agitação, por 1

hora, à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi centrifugada (Q222T - Quimis®) com velocidade de 3400 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente (26 °C) a 10.000 rpm. O sobrenadante recolhido foi concentrado até o volume de 1,5 mL em concentrador Concentrator Vacufuge® plus (Eppendorf). O material obtido foi denominado extrato 1 (E1). O material obtido (E1) da extração proteica de *Phaseolus vulgaris* foi ultrafiltrado utilizando sistema de membranas para moléculas com tamanho menor que 3 kDa (Amicon Bioseparations), que a partir de então será identificado pelo acrônimo PV3 (*Phaseolus vulgaris* < 3kDa). Após obtenção do PV3, amostras foram congeladas à -80 °C e colocadas no liofilizador (L101-Liotop) por 72 horas. As amostras liofilizadas foram armazenadas em um pote de vidro, alocado em um dessecador, para ficar livre de umidade. No momento da realização dos experimentos *in vivo* e *ex vivo* as amostras foram solubilizadas em solvente adequado para cada teste.

5.4 COMPARAÇÃO COM BANCO DE DADOS

Os componentes presentes na fração PV3 foram recentemente analisados por espectrometria de massas e os dados foram publicados por nosso grupo [Graziani e colaboradores (2019)]. As sequências presentes em PV3 foram submetidas a uma análise comparativa com os dados/sequências encontrados na literatura, bem como em uma busca de dados nos principais sites de depósito de sequências e periódicos (Pubmed e Science Direct), por artigos que continham identificação ou purificação de peptídeos com atividade anti-hipertensiva de origem alimentar. As palavras chaves utilizadas foram: “bioactive peptides”; “antihypertensive peptides”; “food peptides”; “peptides sequencing”. As sequências peptídicas encontradas na seção de resultados dos artigos obtidos na busca, foram comparadas com aquelas sequenciadas em PV3 e descritas recentemente (36). Tais coincidências nas estruturas primárias foram buscadas utilizando a ferramenta “Localizar” do Excel (Microsoft office™ 365 - 2020).

5.5 OSMOLARIDADE DO PV3

Com o intuito de conhecer as propriedades bioquímicas do extrato PV3 foi avaliada a osmolaridade do extrato, uma vez que é essencial o conhecimento das propriedades osmóticas de uma substância para evitar qualquer tipo de complicação no organismo. Para avaliar a osmolaridade do PV3 foi usado o equipamento micro-

osmette (Precision Systems) que determina a osmolaridade da solução após o congelamento da mesma. Para realizar o ensaio foram utilizadas 50 µg do PV3 liofilizado para 150 µl de água deionizada, em seguida foram feitas as alíquotas de diluições na faixa de concentração de 50 a 1000 µL/mL. Cada alíquota foi colocada no equipamento para fazer a leitura.

5.6 DETERMINAÇÃO DE ÍONS EM EXTRATO DE PROTEÍNA

Para determinar a quantidade de íons sódio e potássio do PV3 (313 µg mL⁻¹), foram utilizados conjuntos de análise enzimática (Bioclin) e a reação foi realizada em um equipamento automatizado de análise bioquímica (Wiener Lab Group-CM200).

5.7 ENSAIOS *EX VIVO* – EFEITO DO PV3 SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS RENAIAS

5.7 .1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados em ratos Wistar (WT) e SHR, pesando entre 250-350 g e com a faixa etária de 12^a a 15^a semana. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás, ficaram alojados em gaiolas individuais (47cm x 31cm x 16cm) com livre acesso à água e ração e com ciclo claro/escuro de 14/10 horas.

Os ratos foram eutanasiados por decapitação, as artérias renais foram cuidadosamente removidas e imersas imediatamente em solução nutriente Krebs-Henseleit modificada à 4°C (pH 7,4; composição em mM: NaCl – 130; NaHCO₃ – 14,9; KCl – 4,7; KH₂PO₄ – 1,18; MgSO₄ 7H₂O – 1,17; CaCl₂ 2H₂O – 1,6; glicose – 5,5). Em seguida foi removido todo tecido conectivo e foram seccionadas em anéis transversais de 4 mm de comprimento. Os anéis vasculares foram suspensos por um par de hastes de aço inoxidável, em cubas de vidro (10 mL) contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit modificada, sob temperatura constante de 37°C e aerada com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂). Uma das extremidades do gancho foi conectada a um transdutor de força que acoplado a um sistema computadorizado permitindo o registro das contrações (Transdutor de força TIM-200, MOB IOB, Amplificador AECAD 04,

AVS Projetos, Brasil). A representação esquemática da preparação de anel da artéria renal de ratos em banho de órgãos isolados pode ser observada na Figura 3.

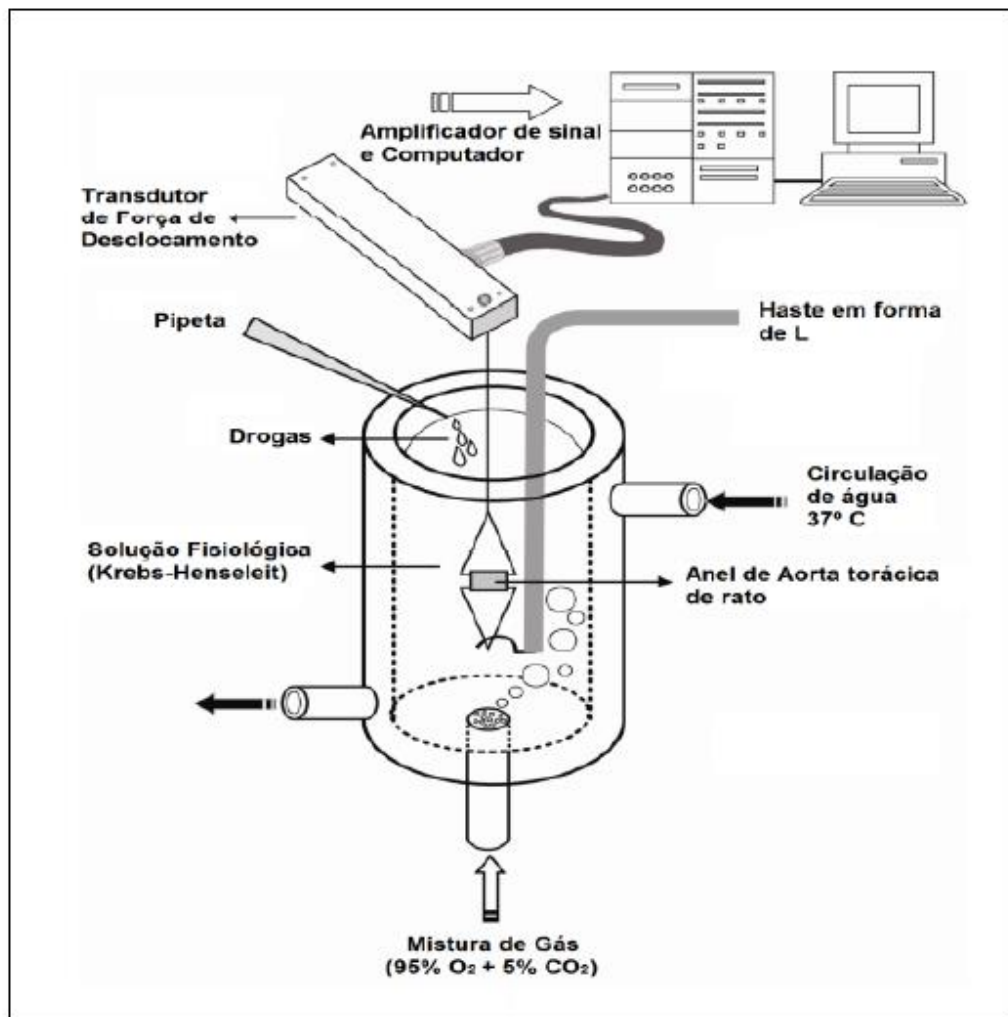


Figura 3: Representação esquemática de uma preparação de anel de aorta de ratos em banho de órgãos isolados. Os anéis são mantidos em solução de Krebs-Henseleit carbogenada (95% O₂, 5% CO₂) e aquecida a ± 37 °C, com uma tensão de 1,5g. Fonte: Yildiz, 2013 adaptado por Alves, 2016 (88).

As preparações permaneceram sob tensão de 1,5 g durante 60 minutos, período para estabilização, com trocas de solução nutritiva e ajuste de tensão a cada 15 minutos. Após estabilização, foi adicionada fenilefrina (Phe - 1 μ M) para verificação da responsividade vascular ao estímulo contrátil e, na sequência, acetilcolina (ACh - 10 μ M) para a confirmação da presença ou ausência de endotélio funcional nas preparações estudadas. Para execução dos protocolos experimentais em aortas desprovidas de endotélio vascular, a camada íntima foi removida mecanicamente por meio da fricção de uma cânula metálica.

Para avaliar o efeito da reatividade vascular do PV3 sobre as artérias renais, foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo relaxamento mínimo produzido pela ACh correspondeu a 90%. Após a realização do teste da integridade do endotélio, as preparações foram lavadas com solução nutritiva de Krebs-Henseleit modificada, e posteriormente reestabilizadas por mais 30 minutos. Em seguida foram construídas curvas de concentração efeito (CCE) cumulativas para o PV3 nas concentrações 0,0001; 0,0003; 0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 e 10 mg/mL.

5.7.2 PAPEL DO ENDOTÉLIO VASCULAR NOS EFEITOS RELAXANTES DO PV3

A fim de avaliar o papel do endotélio no efeito relaxante do PV3, foi investigada a capacidade do extrato em causar relaxamento vascular em anéis com e sem endotélio vascular. Inicialmente verificou-se a integridade do endotélio, considerando anéis com endotélio funcional aqueles com relaxamento mínimo produzido pela ACh correspondeu a 90% e, para anéis sem endotélio, aqueles cujo relaxamento máximo produzido correspondeu a 10%.

Ambas as preparações foram previamente contraídas com Phe (1 μ M) e em seguida a curva CCE para o PV3 foi construída. Ao final deste procedimento, nas preparações sem endotélio, foi adicionado nitroprussiato de sódio (NPS - 1 μ M), um doador de óxido nítrico, para que fosse produzido relaxamento independente do endotélio, a fim de avaliar a viabilidade da preparação.

5.7.3 CONTRIBUIÇÃO DA VIA OXIDONITRÉRGICA PARA OS EFEITOS VASORELAXANTES DO PV3

Foi investigado se o efeito relaxante produzido pelo PV3 dependeria da síntese/sinalização de NO. Para este, os anéis da artéria renal com endotélio funcional foram previamente incubados com Éster metílico de N(gama)-nitro-L-arginina (L-NAME - 100 μ M, que é um inibidor não seletivo da eNOS, durante 30 minutos para avaliação da participação do NO. Após o período de incubação dos antagonistas, as preparações foram pré-contraídas com Phe (1 μ M) e, quando a resposta contrátil atingiu o platô, a curva CCE para o PV3 foi construída.

5.8 ENSAIOS *IN VIVO* – EFEITOS DO PV3 NA FISILOGIA RENAL E HEMODINÂMICA CARDIOVASCULAR E RENAL

5.8.1 DROGAS

As drogas utilizadas foram Heparina sódica (Liquemine, 5000U.I/mL – Roche Laboratories, Brasil); Tiopental sódico (THIOPENTAX®) (2,5%) (Cristália Ltda); halotano (2% em O₂ 100%; halotano; Cristália, Itapira, SP, Brasil).

5.8.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA ATRAVÉS DE PLETISMOGRAFIA DE CAUDA

A pletismografia de cauda foi usada para confirmar os níveis de pressão arterial de animais hipertensos, como critério de inclusão para realização dos experimentos. Os animais passaram por um período prévio de adaptação a manipulação e contenção por 1 semana. Após o período de adaptação, as medidas de pressão arterial foram realizadas por 3 dias antes do início dos tratamentos (uma média dos valores de pressão arterial sistólica obtidos diariamente, foi calculada ao final do terceiro dia).

Para coletar as medidas, os animais foram alojados em uma caixa aquecedora com temperatura aproximada de 36°C durante 15 minutos para dilatação da artéria caudal. Na sequência, o animal foi colocado em caixa individual com maravalha e um manguito de borracha foi posicionado na base da cauda juntamente com um receptor de pulso, ambos acoplados a um transdutor e conectados ao sistema de aquisição de dados (Powerlab 4/25, ML0380/D, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A partir da insuflação e desinsuflação do manguito em intervalos regulares determinou-se a PAS pela média aritmética de triplicata dos valores para o mesmo registro.

5.8.3 EFEITOS DE PV3 SOBRE A FUNÇÃO RENAL

Para realizar o estudo da função renal, inicialmente os ratos foram pesados e alojados em gaiolas metabólicas individuais, com livre acesso a água (250 mL) e ração (30 g). Neste período os animais ficaram por 24 horas para adaptação à gaiola. Após este período foi medido o volume urinário, separação das amostras de urinas, pesagem de fezes, cálculo da ingestão de ração e água, reposição de ração e água (situação controle pré-tratamento). Em seguida os animais receberam injeções intraperitoneal com veículo (solução fisiológica 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µg/Kg; 9,5 µg/kg, 50 µg/kg, 2,5 mg/kg e 5 mg/kg. Em seguida, os animais permaneceram por

mais 24 horas, onde no final da etapa foram medidos os volumes de urina e armazenados para os testes bioquímicos, foram pesados as fezes e ração, seguido da medição do volume de água. Logo após, os animais foram eutanasiados através de sobredose de anestesia com o Tiopental sódico (THIOPENTAX®) (2,5%), seguido pela coleta do sangue para realização de testes futuros.

Foram monitorados e determinados os seguintes parâmetros: massa corpórea, ingestão de água, ingestão de ração, volume urinário, sódio*, potássio*, creatinina*, ritmo de filtração glomerular (RFG)*, ureia*, albumina e ácido úrico* (*Parâmetros determinados através da análise da urina e plasma dos ratos).

As determinações bioquímicas (creatinina, albumina, ácido úrico, uréia, proteínas totais, sódio e potássio) da urina e do plasma sanguíneo foi feita por um analisador clínico de acesso randômico (Wiener Lab group- Cm 200) na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás e o kit de diagnóstico de análises clínicas da marca Bioclin.

A determinação do *clearance* de creatinina (CICr) foi realizada para estimar o valor do ritmo de filtração glomerular (RFG). A determinação do *clearance* de ureia foi realizada para estimar a taxa de depuração da ureia. Para realizar o cálculo do *clearance* (CL) de creatinina e de uréia foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{CL} = \frac{(\text{concentração da substância na urina} \times \text{Volume de urina})}{(\text{concentração da substância no plasma} \times \text{Tempo de coleta de urina})}$$

Abaixo está esquematizado na figura 4 a ordem cronológica dos experimentos para o estudo da função renal.

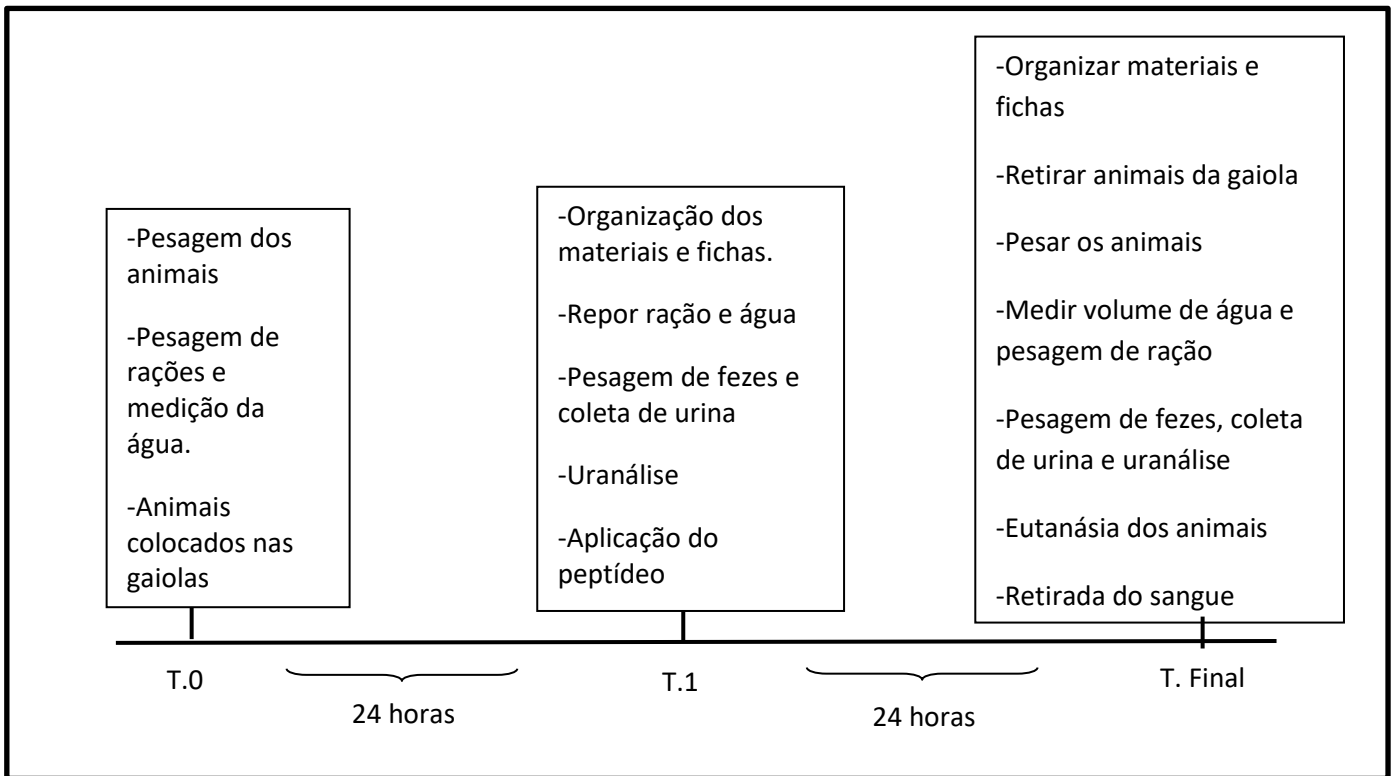


Figura 4: Representação esquemática da sequência experimental do estudo de função renal. Fonte: Autor.

5.8.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DO PV3 SOBRE A RESPOSTA HEMODINÂMICA RENAL E AÓRTICA: REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), RESISTÊNCIA VASCULAR RENAL (RVR) E RESISTÊNCIA VASCULAR AÓRTICA (RVA).

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados inicialmente com halotano (2% em O₂ 100%; halotano; Cristália, Itapira, SP, Brasil). A veia femoral direita foi canulada para a infusão do anestésico intravenoso tiopental (40 mg. Kg⁻¹). A artéria femoral direita foi canulada para o registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Posteriormente, foi realizada a traqueostomia, com o objetivo de evitar o esforço respiratório.

Após tricotomia no flanco lateral esquerdo, a região retroperitoneal foi exposta permitindo a visualização do rim esquerdo e da artéria renal. O fluxo sanguíneo renal (FSR) e aórtico (FSA) foi registrado por fluxometria de tempo de trânsito como descrito por Welch (143). Para isso, uma sonda em miniatura foi conectada a um fluxômetro T206 (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, EUA), que permite determinar o fluxo em valores absolutos (mL min⁻¹). Os sinais obtidos foram enviados ao sistema de aquisição e análise de dados MP150 (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, EUA).

Durante todo o experimento, a temperatura retal foi mantida entre 36 e 37°C com o auxílio de uma mesa térmica.

Após um período mínimo de 10 minutos para a estabilização dos parâmetros cardiovasculares, os animais normotensos e hipertensos foram submetidos à injeção intravenosa de PV3 nas doses de 2,5 mg/kg e 5 mg/kg para a avaliação dos efeitos hipotensor e anti-hipertensivo. Os parâmetros foram acompanhados pelos 30 minutos subsequentes às injeções.

Os valores de resistência vascular (RV) foram calculados a partir da razão entre PAM e FS, conforme a equação abaixo:

$$RV: \frac{PAM}{FS}$$

5.9 ENSAIOS *IN VIVO* – EFEITOS DE PV3 SOBRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS DE CAMUNDONGOS

5.9.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para iniciar o tratamento crônico de 10 semanas os animais foram separados em 4 grupos de forma aleatória, garantindo a homogeneidade de peso dos animais. Os grupos (n=5 cada) foram: grupo a ser tratado com dieta padrão (CT); grupo a ser tratado com a dieta padrão e ingestão do PV3 por pseudogavagem (gavagem utilizando pipeta monocanal); grupo a ser tratado com dieta hiperlipídica (HFD) e o grupo a ser tratado com dieta hiperlipídica; ingestão de PV3 por pseudogavagem (HFD+ PV3). Durante o período de tratamento crônico de 10 semanas, os animais foram mantidos no biotério do laboratório de distúrbios do metabolismo (LABDIME) em gaiolas com 5 animais em cada com acesso a água e ração *ad libitum* e ciclo de luz (claro/escuro) de 12 horas. Durante 10 semanas os animais receberam, diariamente, suplementação oral com PV3 (2,5 mg/Kg de peso corporal, 100 µL de solução) no mesmo horário por pseudogavagem utilizando pipeta monocanal mecânica (10-100 µL, Eppendorf®). O delineamento experimental do tratamento crônico está descrito na Figura a seguir:

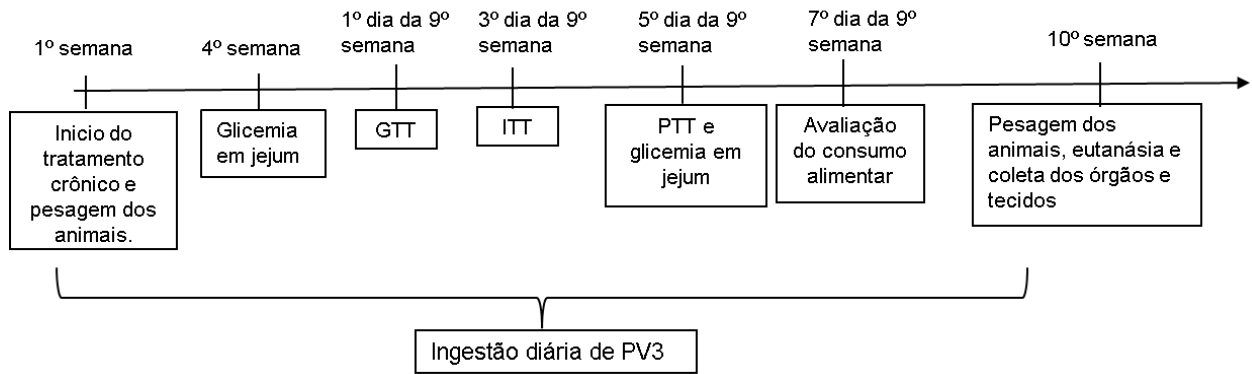


Figura 5: Representação esquemática do delineamento experimental ao longo das 10 semanas de tratamento. Fonte: Ator.

5.9.2 DIETA HIPERLIPÍDICA

A dieta hiperlipídica usada no experimento foi ofertada aos animais na forma de “pellets”. A composição da dieta hiperlipídica comparada à dieta padrão, a qual foi utilizada está demonstrada na Tabela 1. A composição de ácidos graxos das principais fontes de lipídios da dieta hiperlipídica está demonstrada na Tabela 2.

Tabela 1. Tabela Comparativa da composição nutricional da dieta hiperlipídica e da dieta padrão utilizadas durante os experimentos.

Ingredientes	Dieta Controle (g%)	Dieta Hiperlipídica (g%)
Carboidratos (c)	66	44
Fonte proteica (a)	20	20
Lipídios (b)	4	23
Fibras	5	5
Minerais	3,5	3,5
Vitaminas	1	1
L-cistina	0,3	0,3

Bitartarato de colina	0,25	0,25
Calorias de gordura (%/100 g)	9	45
Valor calórico (KJ/100g)	1591	1939

(a)-Fonte protéica: caseína comercial (aproximadamente 85% de proteína). (b)- Fração lipídica: Dieta controle =óleo de soja; Dieta hiperlipídica = óleo de soja e banha de porco. (c)- Fração carboidratos: amido, amido dextrinizado e sacarose.

Tabela 2. Composição de ácidos graxos do óleo de soja e banha utilizadas para preparo da dieta hiperlipídica dos animais.

Ácidos Graxos¹	Óleo de Soja (g%)	Banha de porco (g%)
C 14:0	0,08	2,15
C 16:0	11,34	28,37
C 16:1	0,08	2,62
C 18:0	3,08	12,83
C 18:1	22,84	40,30
C 18:2	54,81	13,14
C 18:3	6,43	0,30
C 20:0	0,39	0,20
C 20:1	0,24	0,10
C 22:0	0,52	0,00
C 24:0	0,18	0,00
SFA²	15,60	43,54
MUFA³ and PUFA⁴	84,40	56,46

¹C14:0 – ácido mirístico; C16:0 – ácido palmítico; C16:1 – ácido palmitoléico; C18:0 – ácido esteárico; C18:1 – ácido oleico; C18:2 – ácido linoleico; C18:3 – ácido α linolênico; C20:0 – ácido araquídico; C20:1 – ácido gadoléico; C22:0 – ácido behênico; C24:0 – ácido lignocérico.

²SFA – ácidos graxos saturados; ³ MUFA – ácidos graxos monoinsaturados; ⁴ ácidos graxos polinsaturados.

5.9.3 AVALIAÇÃO DO GANHO DE MASSA E DO CONSUMO ALIMENTAR

Para avaliar os efeitos do PV3 no ganho de massa corporal, os animais foram pesados semanalmente até o final do tratamento crônico. A avaliação do consumo alimentar foi feita na décima semana. Inicialmente os animais ficaram de jejum por 12 horas, após esse período foi colocado 250 g de dieta padrão e 40 g de dieta hiperlipídica, ao final de 12 horas foi pesado a dieta para monitorar o consumo alimentar na fase clara, a dieta foi fornecida novamente com peso padronizado para monitorar o consumo alimentar nas últimas 12 horas, o que corresponde a fase escura. Ao final do experimento tivemos o consumo alimentar ao longo das 24 horas ao juntar as duas fases do ciclo biológico dos animais.

5.9.4 GLICEMIA EM JEJUM

A medição da glicemia em jejum foi feita na quarta semana (para análise do quadro da resistência à insulina) e no final da nona semana. Para realizar o teste os animais ficaram de jejum por 12 horas, em seguida foi feito um pequeno corte na extremidade da cauda para a coleta de sangue. A glicose foi dosada usando um glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics, Basileia, Suíça).

5.9.5 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG)

O TTG foi realizado no início da nona semana de tratamento crônico. Inicialmente os animais ficaram 12 horas de jejum, logo após os animais foram alimentados pelas suas respectivas dietas por 2 horas, em seguida foi retirado a dieta dos animais, a qual ficaram 4 horas em jejum. Para iniciar o teste foi feito um pequeno corte na extremidade da cauda do animal e foi efetuada uma primeira coleta de sangue para a dosagem de glicose em glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics, Basileia, Suíça), o que equivale ao tempo zero (t0) do teste. Em seguida, foi realizada a injeção de uma solução glicosada a 25% (1 g/Kg de peso corporal), administrada intraperitonealmente (IP), com posteriores coletas de amostras sanguíneas nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos para as dosagens de glicose. Para calcular a

resposta ao estímulo de glicose durante ao teste de tolerância à glicose foi estimada a área total sob a curva de glicemia pelo método trapezoidal.

5.9.6 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (TTI)

Para realizar o teste TTI foi utilizado o mesmo protocolo de jejum do teste TTG, permanecendo 12 horas de jejum, seguido de 2 horas de alimentação e 4 horas de jejum. Após este período de tempo foi feito um pequeno corte na extremidade da cauda para a coletar o sangue e fazer a dosagem de glicose no glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics, Basileia, Suíça), a primeira coleta marca o tempo zero (t_0) do teste. Em seguida, foi realizada a injeção de insulina regular recombinante (1,5 UI/kg), administrada IP com posteriores coletas de amostras sanguíneas nos tempos 5, 10, 15 e 30 minutos para as dosagens de glicose. Para calcular a resposta ao estímulo de glicose durante ao teste de tolerância à glicose foi estimada a área total sob a curva de glicemia pelo método trapezoidal. Para fazer o cálculo da taxa de decaimento (KTT) foi baseada na linearidade dos dados de glicemia, deste modo os dados foram transformados em escala logarítmica, e traçado uma reta de regressão linear do log neperiano, no cálculo utilizou 3 pontos de glicemia, até o tempo de 15 min.

5.9.7 TESTE DE TOLERÂNCIA AO PIRUVATO (TTP)

No teste do TTP, os animais permaneceram em jejum por 12 horas, neste teste não houve a realimentação. Inicialmente foi feito um pequeno corte na extremidade da cauda para a coletar o sangue e fazer a dosagem de glicose no glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics, Basileia, Suíça), a primeira coleta marca o tempo zero (t_0) do teste. Em seguida foi administrada injeção IP de uma solução de piruvato (20%) (2 g/kg) com posteriores coletas de amostras sanguíneas nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos para as dosagens de glicose. Para calcular a resposta ao estímulo de glicose durante ao teste de tolerância à glicose foi estimada a área total sob a curva de glicemia pelo método trapezoidal.

5.9.8 COLETA DE ÓRGÃOS E TECIDOS

No final das 10 semanas os camundongos foram anestesiados com injeções de 50 µl i.p. para retirada do fígado, hipotálamo, rim, tecido adiposo marrom, tecido adiposo epididimal e tecido adiposo retroperitoneal. A anestesia continha 60mg/kg ketamina (Fort Dodge Animal Health, Ft. Dodge, IA) e 20 mg/kg de xilazina (Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA), em seguida os animais receberam uma injeção de diazepam 20 µl i.p. Após a anestesia, os órgãos e os tecidos foram coletados e pesados em uma balança semianalítica, e armazenados em eppendorf, em gelo seco. No final da coleta todos os materiais biológicos foram armazenados em freezer -80°C para posteriores análises.

5.9.10 ENSAIO *EX VIVO* DE ESTÍMULO DO FÍGADO COM INSULINA

Para realizar o ensaio *ex vivo* de estímulo do fígado com insulina foi retirado uma pequena porção do lóbulo direito do fígado no momento da eutanásia dos camundongos. A porção do fígado foi colocada em placas com 6 poços/wells com 1 mL de Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen, EUA), com soro fetal bovino 10% (Invitrogen, EUA) e 1% de penicilina (100 U /mL)/estreptomicina (100 µg /mL) (Invitrogen, EUA), em seguida o material foi armazenado em uma estufa própria para meio de cultura com temperatura de 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade por 2 horas. Logo após, o meio foi retirado e lavado com PBS (0,1 M, pH 7,5), para que fosse acrescentado 990 µL de meio de cultura sem soro com 10 µL de insulina (100nM) para os grupos estimulados e foi acrescentado 1 mL de meio sem soro para os grupos sem o estímulo de insulina, a reação teve duração de 40 minutos. Em seguida o meio foi retirado e a porção de fígado foi lavado com PBS e armazenado em freezer -80 °C para futuros testes.

5.9.11 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E AVALIAÇÃO DE SUA EXPRESSÃO POR WESTERN BLOTTING

Para fazer a extração das proteínas de fígado, foi retirado um fragmento do fígado e foi homogeneizado em tampão de extração (100 mM Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10 mM de ortovanadato de sódio; 2 mM PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina) com auxílio de um homogeneizador Politron na velocidade de 25000 rpm, por aproximadamente 20

segundos. Em seguida foi adicionado Triton X-100 a 10 % no extrato. O volume de Triton X-100 adicionado correspondeu a 10% do volume total do extrato. Após a adição do Triton X-100 as amostras foram mantidas em repouso no gelo por pelo menos 40 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 4°C, por 30 minutos a 12000 RPM para remover o material insolúvel. Somente o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Parte deste foi utilizado para dosagem do conteúdo proteico total pelo método colorimétrico de Biureto e parte foi estocada (Biofreezer a -80°C) em tampão Laemmli + 100 mmol/L de DDT para os ensaios de Western Blotting.

As amostras dos extratos totais proteicos em tampão de Laemmli foram colocadas rapidamente em fervura por 5 min, em seguida as amostras foram aplicadas em gel de poli-acrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência molhada da BIO-RAD em tampão de transferência contendo metanol e SDS. A membrana de nitrocelulose foi incubada “overnight” com anticorpo específico (PEPCK: sc-32879, IRS-1: sc-559, glicose 6-fosfatase (G6Pase- α):sc-25840, GAPDH: sc-25778, PI3Kinase p85 α : sc-1637 e proteína quinase B fosforilada (pAKT): cell-4060S). Foram utilizados secundários Rabbit (#7074S) e Mouse (#7076S) da marca KPL©. As proteínas reconhecidas pelos anticorpos secundários foram detectadas por quimioluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). As intensidades das bandas foram quantificadas submetendo as autorradiografias desenvolvidas a densitometria óptica usando o software Scion Image (Scion Corp., MD, EUA) e normalizadas para o controle de carga (GAPDH).

5.9.12 REAL-TIME Q-PCR

Os tecidos de fígado e hipotálamo foram coletados em condições livres de RNases e armazenadas em biofreezer (- 80°C) para extração de RNA total com reagente Trizol (InVitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de RNA das amostras foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (A260) e a 280nm (A280), e a integridade do RNA isolado foi determinada pela razão A260:A280. Em seguida, realizou-se a técnica de transcrição reversa (RT-PCR) utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems).

A expressão relativa foi determinada usando os primers com sistema de detecção TaqMan para os genes alvo. Os primers utilizados foram G6PC (Mm00839363_m1), PI3K (Mm00435673_m1), Pck1 (Mm00551411_m1), PRKaa2 (Mm01264789_m1), PTEN (140094961), POMC (Mm00435874_m1), AgRP (Mm0475829_g1), NPY (Mm014101146_m1), CART (Mm04210469_m1) e ACTB (4351315 da marca Applied Biosystems) foi usada como controle endógeno. A expressão gênica foi quantificada realizando PCR em tempo real em uma plataforma ABI Prism 7500 Fast. Os dados foram analisados usando um Sequence Detection System 2.0.5 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e expressos como valores relativos determinados pelo método do ciclo de limiar comparativo (Ct) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), de acordo com as recomendações do fabricante.

5.10 ANÁLISE E ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os testes estatísticos utilizados foram análise de variância de uma via (One-Way ANOVA), duas vias (Two-Way ANOVA) seguido de pós teste de Tukey ou teste T pareado, quando apropriado. Os testes utilizados estão descritos nas legendas de cada figura. O software utilizado foi o GraphPad Prism 9. A significância estatística foi considerada quando $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 COMPARAÇÃO COM BANCO DE DADOS

Este estudo buscou fazer uma revisão sistemática comparando as sequências de aminoácidos presentes no extrato PV3 como observado no sequenciamento feito pelo nosso grupo de estudo (35). As sequências de aminoácidos do extrato PV3 homólogas às sequências de aminoácidos de outras fontes alimentares relatadas na literatura foram colocadas na Tabela 3. Na revisão sistemática foram levadas em consideração sequências homólogas com atividade anti-hipertensiva.

Tabela 3: Comparação das sequências de aminoácidos encontrados pelo nosso grupo de estudo com sequências de aminoácidos encontradas por outros autores.

Sequência peptídica presente em PV3	Peptídeos encontrados na literatura		
	Sequência	Fonte alimentar	Referência
DYGAELPPR	DY	Broto de Bambu	(89)
DPLPDKNR	PLP	Leite	(90)
DFSETSGPPGSDK	GPP	Trigo	(91)
DPGPPPGETPR			
NKFYGWR	FY	Wakame (alga)	(92)
QHAEGLPDQQR	GLP	Pele de Salmão	(93)
TSLVGEEEEESQDR	EEEEES	Feijão comum	(94)
TVGEVSEEGQQRK	VSE	Feijão comum	(94)
EQEVSEEGKQRDK			
TVGEVSEEGQQRK	EV	Feijão comum	(94)
QPVKVSTPTLVEVSR	EV	Feijão comum	(94)
EQEVSEEGKQRDK	EV	Feijão comum	(94)
QDEVKEVQR	EV	Feijão comum	(94)
QLAVTQVPTLVEVSR	EV	Feijão comum	(94)
EQEVSEEGKQRDK	EV	Feijão comum	(94)
EMEV	EV	Feijão comum	(94)

KEVESEETDPR	EV	Feijão comum	(94)
QDEVKQVER	EV	Feijão comum	(94)
TAFNAAEVNSK	EV	Feijão comum	(94)
EYLTPDNK	EY	Feijão comum	(94)
EYNKATGR	EY	Feijão comum	(94)
QLAVTQVPTLVEVSR	AVT	Feijão comum	(94)
DFDTEEEPVDK	DF	Feijão comum	(94)
SSSTEDFFSK	DF	Feijão comum	(94)
DFSETSGPPGSDK	DF	Feijão comum	(94)
QKTALVELLK	ELL	Feijão comum	(94)
ELLER	ELL	Feijão comum	(94)
LHVFSFDHEQRR	SF	Feijão comum	(94)
VAAFALVPVKGADR	AF	Feijão comum	(94)
TAFNAAVNSK	AF	Feijão comum	(94)
WLGYYAVSVLLLR	VLL	Feijão comum	(94)
MNGPLLR	PLL	Feijão comum	(94)
SYLQGFSK	GF	Feijão comum	(94)
GFVLELR	GF	Feijão comum	(94)
NKYFGWR	KY	Wakame seaweed (alga)	(95)
NKFYGWR	FY	Wakame (alga)	(95)
VLSPNRGDGLK	DG	Soja	(96)
SSSEEPNVDGSK	DG	Soja	(96)
NKFYGWR	KFYG	Wakame (alga)	(97)
QDSSLSPPTPAGK	LSP	Milho	(98)
VLSPNRGDGLK	LSP	Milho	(98)
QAAYFGWR	AY	Farinha de milho	(99)
NKFYGWR	GW	Molho de soja	(100)

QAAYFGWR	AY/GW	Molho de soja	(100)
SYLQGFSK	SY	Molho de soja	(100)
WLGYYAVSVLLR	GY	Molho de soja	(100)
RPMTVGYK	GY	Molho de soja	(100)
VAAFALVPVKGAADR	AF	Molho de soja	(100,101)
TAFNAAEVNSK	AF	Molho de soja	(100,101)
TSLVGEEEEESQDR	VG	Molho de soja	(100)
RPMTVGYK	VG	Molho de soja	(100)
LVGGELHDVPK	VG	Molho de soja	(100)
NTFDEEEHSSR	TF	Farelo de trigo	(102)

6.2 OSMOLARIDADE DO PV3

Para usar uma molécula ou uma droga como injetável, é ideal que a solução tenha osmolaridade similar àquela dos fluidos corporais (aproximadamente 280-300 mOsm/kg H₂O), para que haja pouca ou nenhuma interferência na tonicidade dos compartimentos intracelular e extracelular. Deste modo, foi realizada uma faixa de concentração do PV3 (50 a 1000 µg/mL) para avaliar a osmolaridade e nestes resultados foi encontrado que o extrato PV3 apresenta osmolaridade baixa conforme o aumento da concentração da solução. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 4.

As propriedades osmóticas de uma substância precisam ser conhecidas para evitar qualquer tipo de complicação no organismo. O ideal é que a solução tenha osmolaridade próxima àquela dos fluidos corporais (aproximadamente 280-300 mOsm/kg H₂O), para que haja pouca ou nenhuma interferência na tonicidade dos compartimentos intracelular e extracelular. Os resultados mostraram que o extrato PV3 apresenta osmolaridade baixa, com valor inferior ao dos líquidos corporais mesmo na mais alta concentração testada, como pode ser visto na Figura 6.

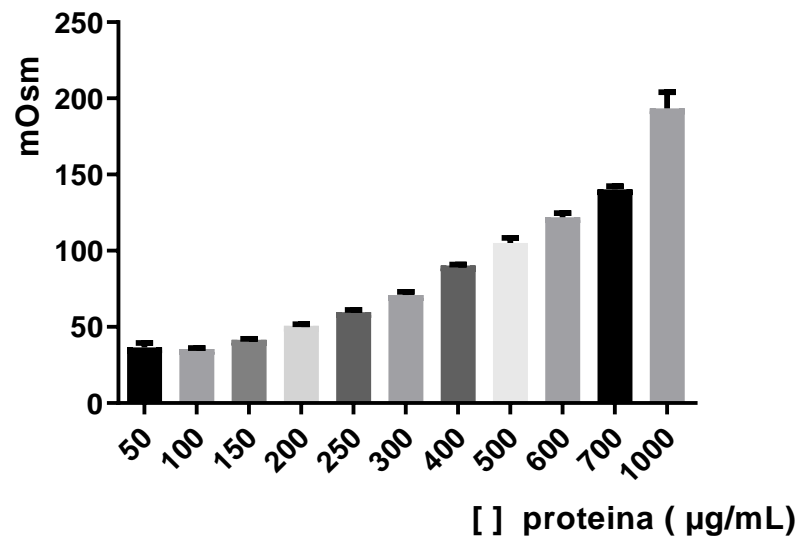


Figura 6: Avaliação da osmolaridade do PV3 na faixa de concentração de 50 a 1000 µg/mL. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão.

6.3 QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS DE SÓDIO E POTÁSSIO EM PV3

O PV3 na concentração de 313 µg/mL foi escolhido para avaliar a quantidade de sódio e potássio na solução. Encontramos 251,9 mmol/L de íons sódio e 69,6 mmol/L de íons potássio no extrato de PV3.

6.4 ENSAIOS *EX VIVO* - EFEITO DO PV3 SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS RENAIIS

6.4.1 REATIVIDADE VASCULAR DE ARTÉRIAS RENAIIS

Este estudo avaliou a capacidade do PV3 em modular a vasomotricidade da artéria renal *ex vivo*, o que forneceria evidências e hipóteses mecânicas de um possível efeito hipotensor. Os resultados mostram que PV3 promoveu dilatação máxima dos anéis isolados de artéria renal com a preservação do endotélio, com valores de $47,8 \pm 2,5\%$ em WT e $41,0 \pm 8,7\%$ em SHR. Os resultados mostram ainda que houve uma diferença significativa ao comparar as linhagens WT e SHR: anéis de artéria renal oriundos de ratos WT foram mais propensos ao vasorelaxamento do que aqueles de SHR. Estes resultados podem ser vistos na figura 7.

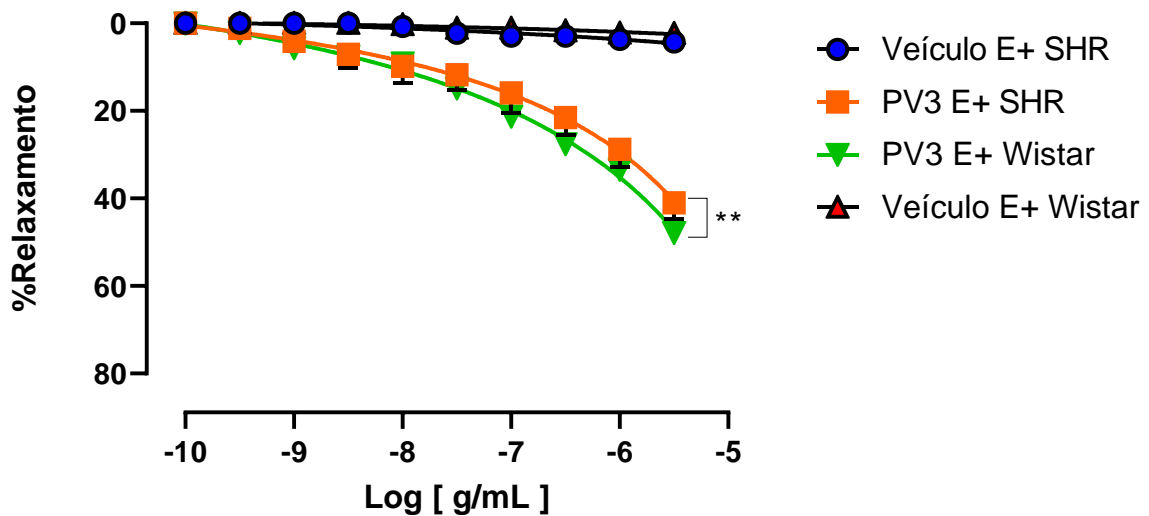


Figura 7: Efeito vasorelaxante do PV3 em anéis de artérias renais de WT e SHR com o endotélio preservado (E+). Os valores estão expressos como média \pm EPM de 4-5 animais por grupo. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão por 4-5 animais por grupo. Comparação dos modelos usados pela análise de Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. ** $p < 0,05$ WT vs. SHR.

6.4. 2 EFEITO RELAXANTE DE PV3 É DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

Após a observação do efeito vasorelaxante do PV3 em anéis de artéria renal, iniciamos a investigação dos potenciais mecanismos envolvidos. Inicialmente, verificamos se tais efeitos dependeriam de vias constitutivas do endotélio. Foi avaliado se o efeito induzido pelo PV3 era dependente ou não do endotélio, utilizando-se anéis de artéria renal com (E+) e sem a preservação (E-) do endotélio. Os resultados mostram que um endotélio preservado é condição *sine qua non* para que PV3 exerça seus efeitos uma vez que ao remover o endotélio, o PV3 não causou nenhum efeito relaxante em nenhuma das linhagens de animais usadas (E. máx.: $3,0 \pm 1,8$ % em WT e $6,6 \pm 3,3$ %). Tais resultados estão descritos na figura 8.

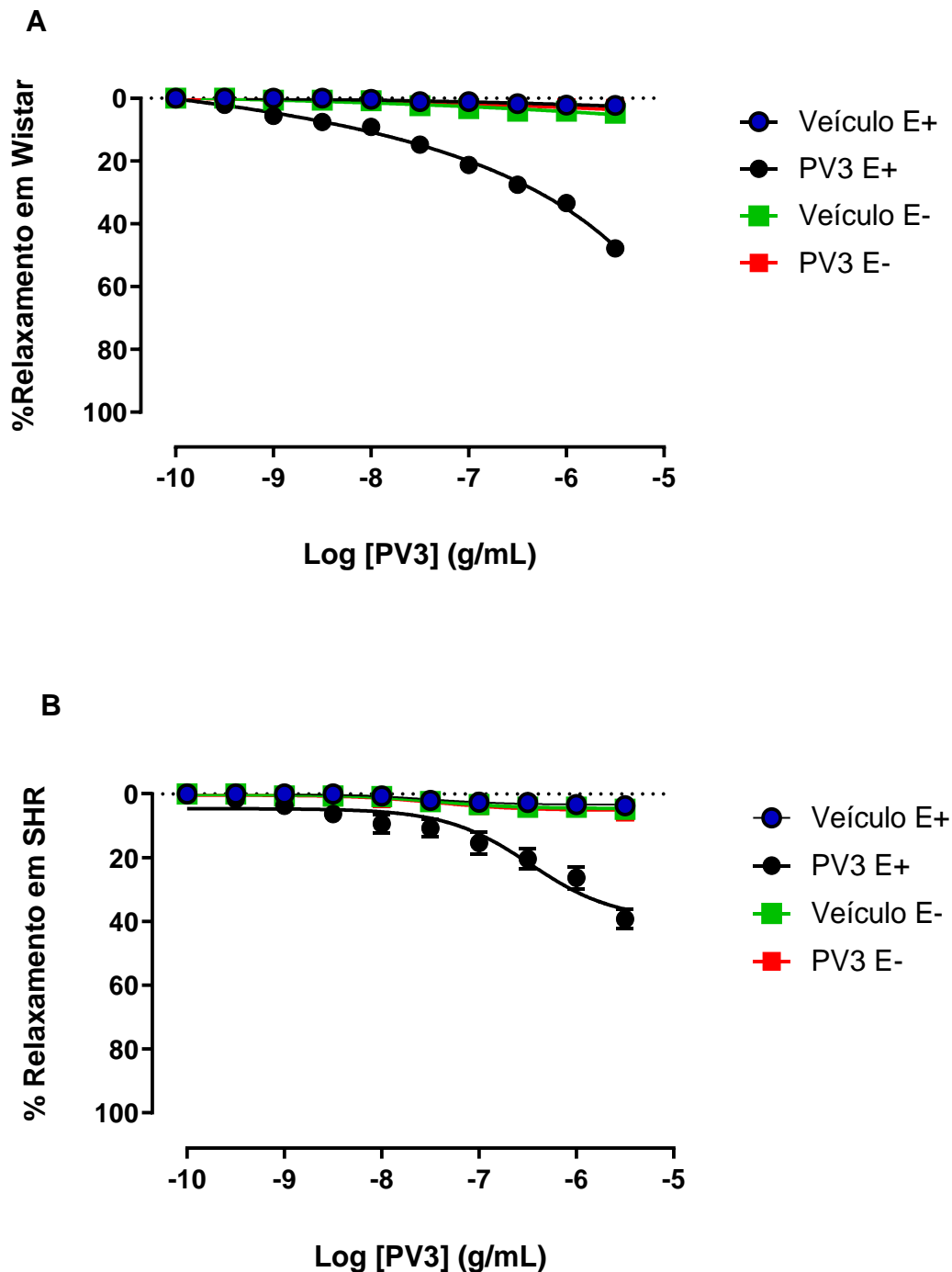


Figura 8: Avaliação do envolvimento endotelial no efeito vasorelaxante do PV3 em anéis de artérias renais extraídos de WT (painel A) e SHR (painel B). As siglas E+ representam que a preparação ocorreu com a preservação do endotélio e E- representa a situação sem a preservação do endotélio. Os valores estão expressos como média \pm EPM por 4-5 animais por grupo. Comparação dos modelos usados pela análise de Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey.

6.4.3 EFEITO RELAXANTE DO PV3 É DEPENDENTE DE VIA OXIDONITRÉRGICA

Uma vez determinado que o efeito relaxante do PV3 depende do endotélio, foi investigado se as vias oxidonitrérgicas induzem a resposta relaxante do vaso.

Os resultados mostram que ao incubar os anéis de artéria renal com o inibidor da enzima eNOS (L-NAME, 100 μ M), houve inibição do vasorelaxamento induzido pelo PV3 (E máx.: 2,8 \pm 1,2% em WT e 8,9 \pm 4,66 % em SHR). Tais resultados podem ser vistos na Figura 9. Deste modo, foi possível identificar que o efeito vasorelaxante do PV3 depende da atividade da enzima NOS.

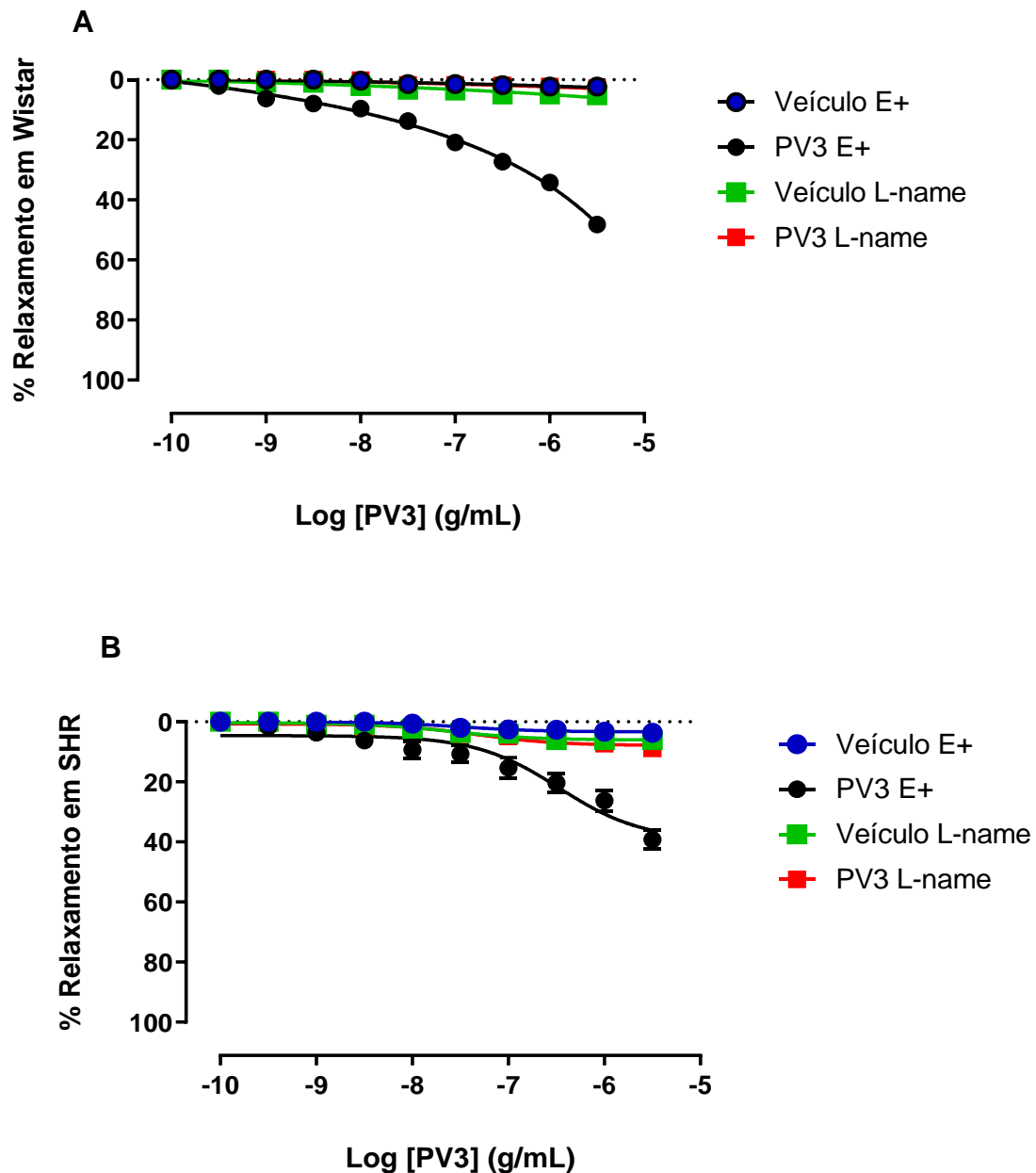


Figura 9: Avaliação do envolvimento da via NOS nos efeitos vasorelaxantes dependentes de endotélio evocados por PV3 em anéis de artérias renais extraídos de WT (painel A) e SHR (painel B). Os valores estão expressos como média \pm EPM por 4-5 animais por grupo. Comparação dos modelos usados pela análise de Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey.

6.5 ENSAIOS *IN VIVO* – EFEITOS DO PV3 NA FISIOLOGIA RENAL E HEMODINÂMICA CARDIOVASCULAR E RENAL

6.5.1 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

Este estudo utilizou animais da linhagem SHR e WT por serem modelos de animais que se assemelham à forma humana da hipertensão primária e a condições normais de função e pressão arterial (104). Para confirmação do estado de hipertensão dos SHR, foi feita a aferição da pressão arterial sistólica por pletismografia. Nossos dados condizem com a literatura, onde os SHR usados neste estudo com faixa etária de 14^a a 15^a semanas apresentaram pressão arterial sistólica de $192,5 \pm 7,9$ mmHg, ou seja, estavam de fato hipertensos. O grupo normotenso (WT) por sua vez, tiveram pressão arterial sistólica de $117 \pm 8,0$ mmHg.

6.5.2 ESTUDO DA FUNÇÃO RENAL

6.5.2.1 PARÂMETROS METABÓLICOS MENSURADOS APÓS 24 HORAS DE INJEÇÃO DO PV3.

Como esperado, o tratamento agudo com PV3 (injeção única e coleta após 24h) não afetou a massa corporal dos animais. Uma exceção foi observada no grupo de WT que recebeu PV3 na dose de 2,5 mg/kg que apresentou peso menor que os outros grupos. Este resultado está evidenciado na figura a seguir (Figura 10).

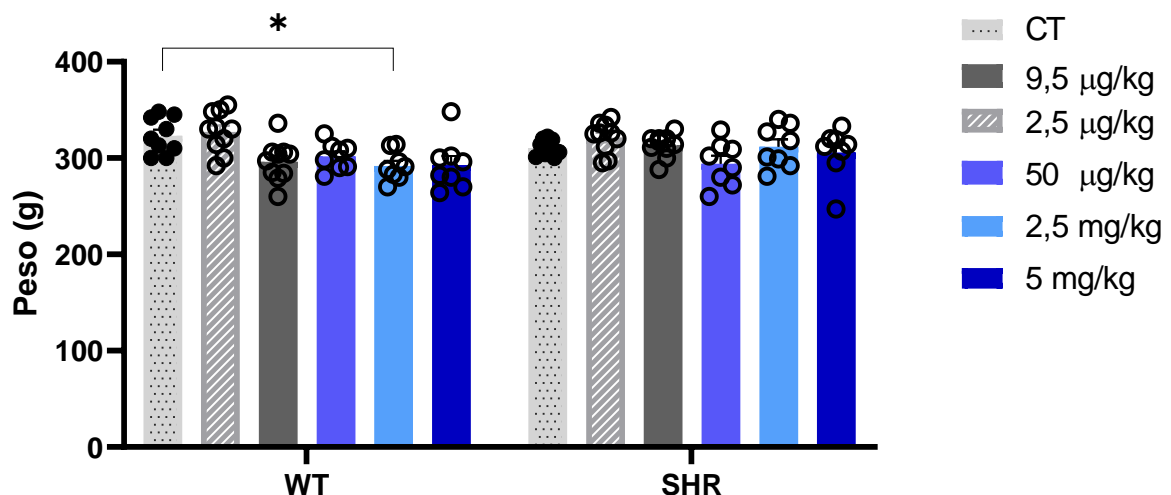


Figura 10: Comparação do peso corporal (g) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), amostrado 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. Os valores estão expressos como média \pm

EPM (n=8 por grupo). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ WT vs SHR nas diferentes doses.

Em relação aos resultados de ingestão de ração e fezes, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ao observarmos as variáveis linhagens e tratamento. Também não houve diferença na massa de fezes excretadas ao se comparar linhagens estudadas (WT e SHR). Contudo, SHR injetados com PV3 na dose 5mg/kg ingeriram menos alimentos do que seu controle na mesma linhagem (Figura 11).

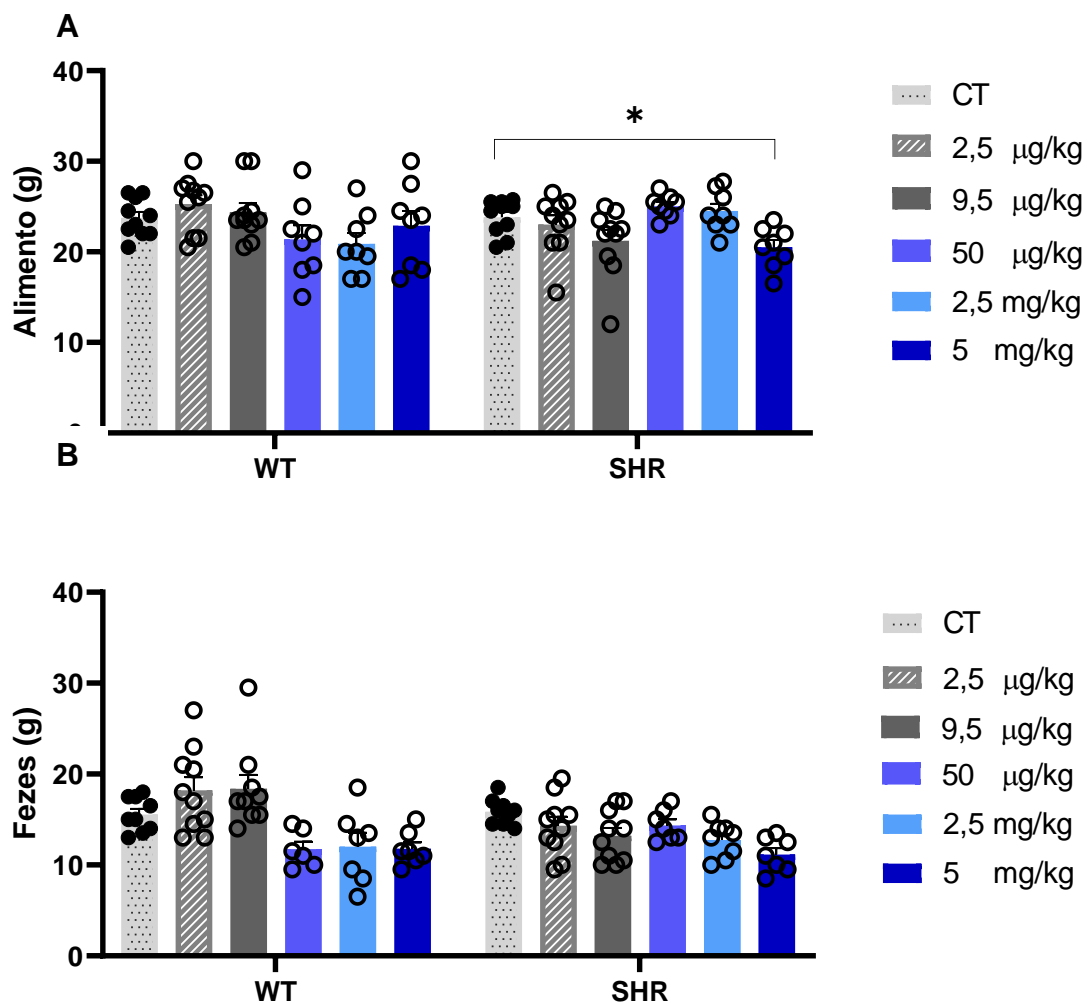


Figura 11: Comparação da massa de ração ingerida (g) (A) e de fezes (g) excretada(B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), amostrada 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 9,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 2,5 mg/kg e 5 mg/kg . Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=6-8 por grupo). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$.

Da mesma maneira, não houve diferença entre linhagens e grupos quanto à ingestão de água. Quando comparadas com veículo, as diferentes doses do PV3 não alteraram a ingestão de água de animais normotensos e hipertensos (Figura 12 A). O volume de urina excretado também não diferiu entre as linhagens WT e SHR injetadas com veículo, mas houve aumento de volume urinário dentro da linhagem WT tratados com PV3 nas doses de 2,5 2 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e de 2,5 mg/Kg (12 B).

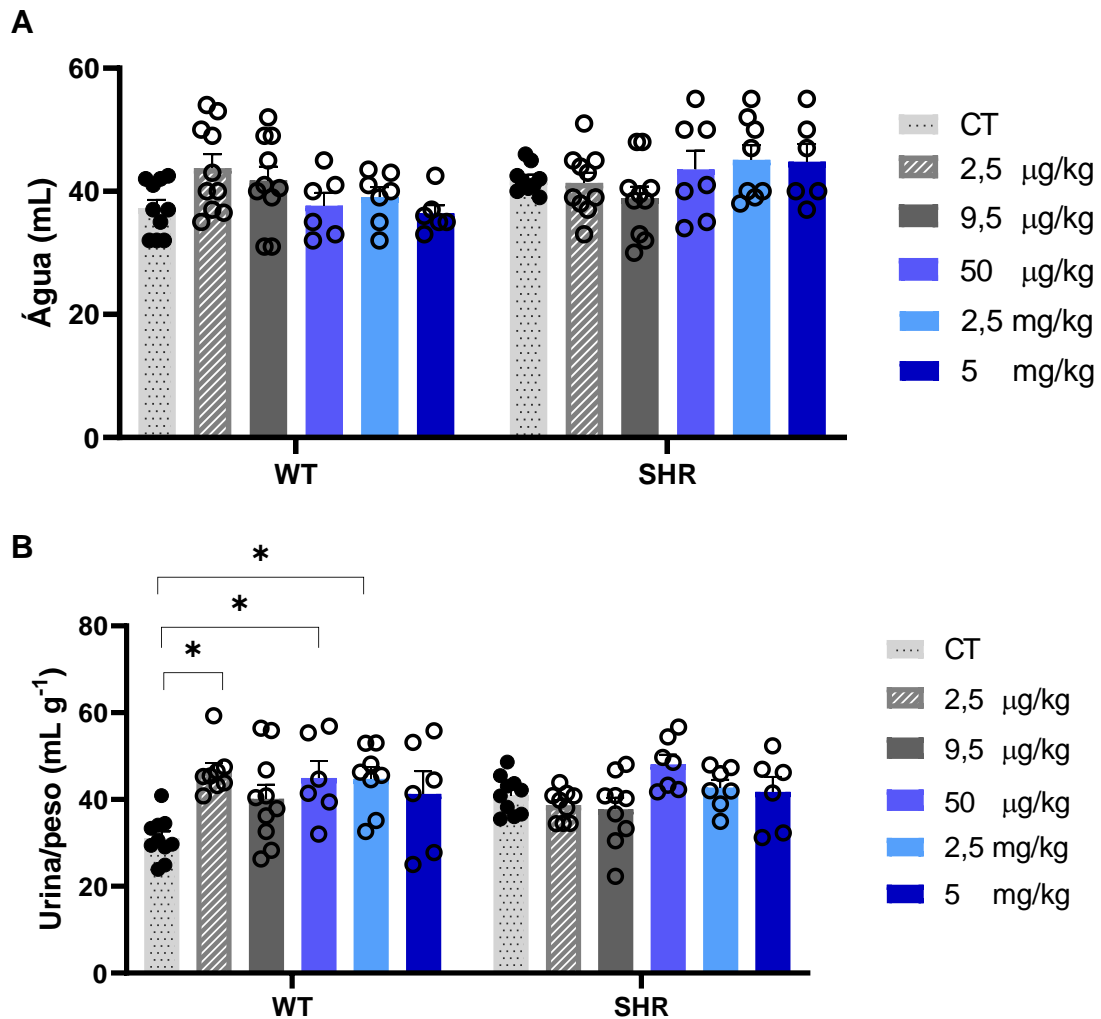


Figura 12: Comparação do volume de água ingerido (mL) (A) e Volume de urina calculado pelo peso (mL/g) (B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), amostrada 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 9,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg . Os valores estão expressos como média \pm EPM ($n=6-8$ por grupo). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ WT vs SHR nas diferentes doses.

6.5.2.2 NÍVEIS DE SÓDIO [Na^+] E POTÁSSIO [K^+] PLASMÁTICO E URINÁRIO.

Os níveis de sódio sérico e urinário em animais normotensos e hipertensos foram avaliados para verificar se o PV3 poderia interferir na natriurese pressórica. De

maneira interessante, os resultados mostram que o PV3 aumentou a excreção de sódio em animais hipertensos (SHR) quando comparado com o veículo, e com WT que receberam PV3 nas doses de 2,5, 9,5 e 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 2,5 e 5 mg/Kg (Figura 13 A). Nesses resultados, destacamos um aumento da excreção de sódio comparando o veículo com a dose de 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Esse mesmo tratamento causou uma excreção de sódio de $343,75 \pm 49,55$, que é aproximadamente o dobro do excretado por seu respectivo grupo controle injetado com veículo. Em relação aos níveis de sódio sanguíneos, foi observado que PV3 reduziu os níveis de sódio plasmático nas doses 2,5; 9,5 ;2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg no grupo SHR quando comparado com o veículo (Figura 13 B). Tal redução dos níveis de sódio sérico ocorreu nos mesmos grupos onde ocorreram aumentos na excreção deste íon.

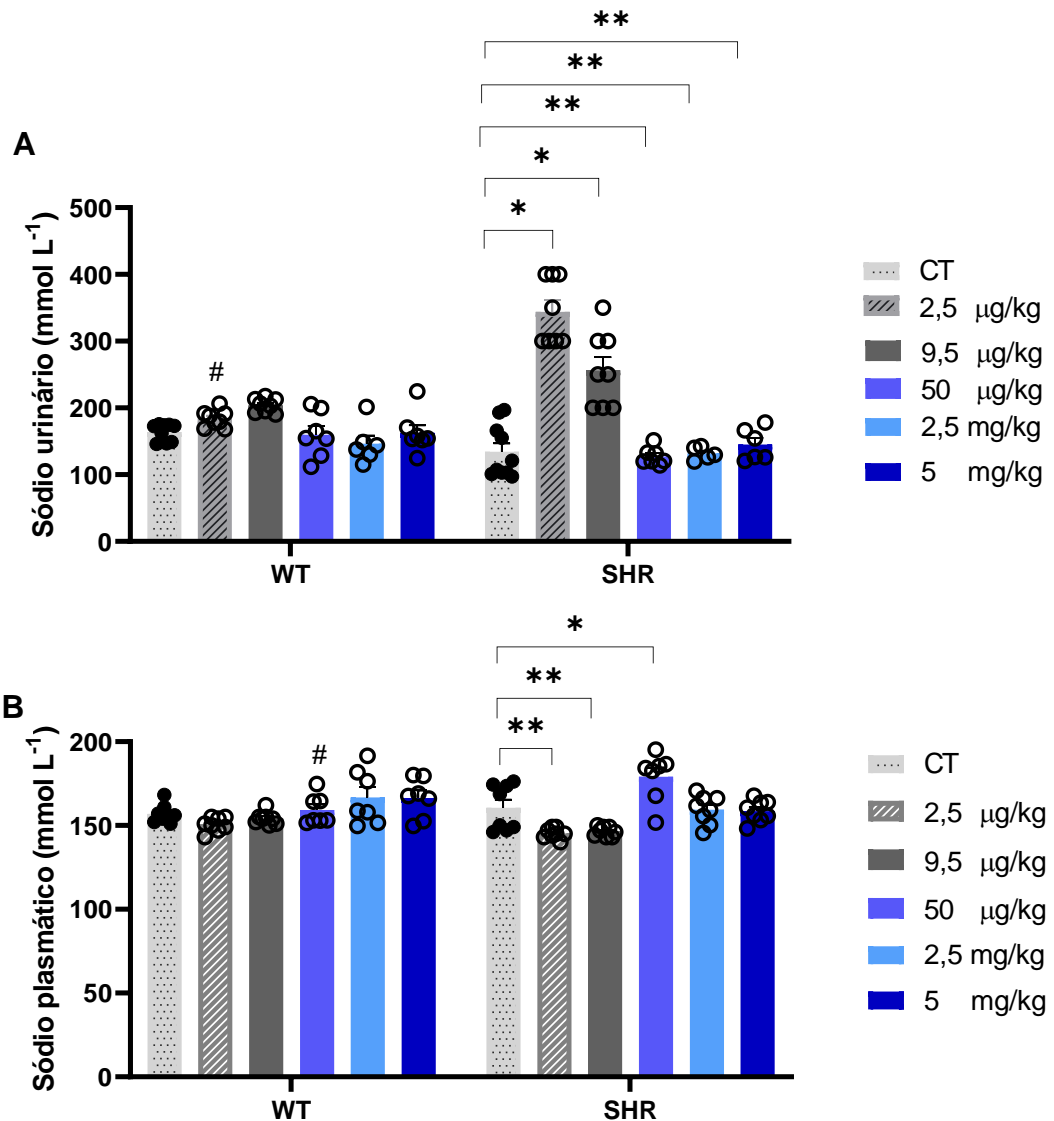


Figura 13: Comparação sódio urinário (painel A) e plasmático (painel B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6-8 por grupo). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. * p <0,05 WT vs SHR em diferentes doses. # p <0,05 indica diferença entre linhagens WT e SHR para mesma dose ou veículo (interação das variáveis independentes).

PV3 nas doses de 2,5 e 9,4 µg/kg aumentou a excreção de potássio em WT e SHR (Figura 14 A). Já o potássio plasmático foi maior em WT tratados com PV3 na dose de 9,5 µg/kg, mas foi menor em SHR que receberam PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg.

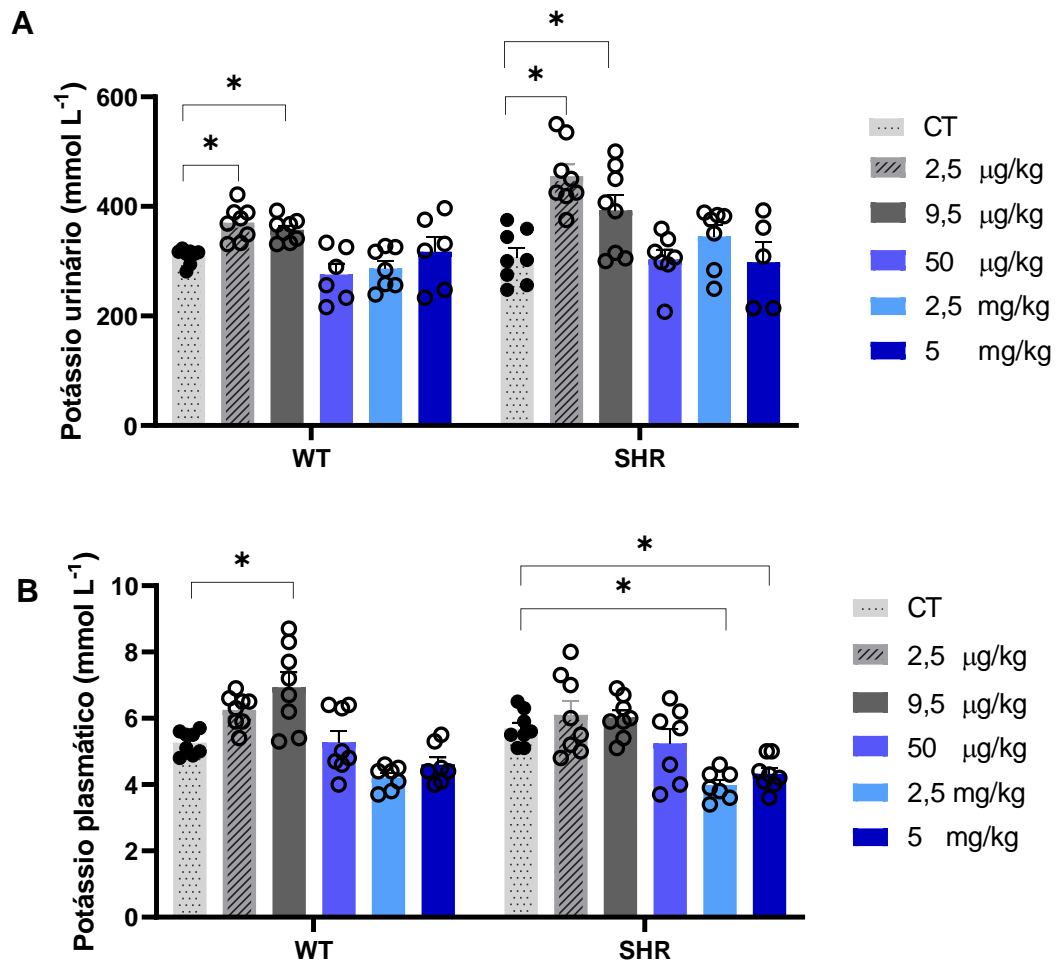


Figura 14: Comparação potássio urinário (painel A) e plasmático (painel B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de de 2,5 μg/kg; 9,5 μg/kg; 50 μg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6-8 por grupo). Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. * p < 0,05 WT vs SHR em diferentes doses.

6.5.2.3 NÍVEIS DE CREATININA PLASMÁTICA E URINÁRIA, CLEARANCE DE CREATININA.

Nesta etapa do estudo foram avaliados os níveis de creatinina plasmática e urinária. Os resultados encontrados mostram que os níveis de creatinina plasmática diminuíram em WT injetados com PV3 nas doses de 2,5 e 9,5 μg/Kg e 2,5 mg/Kg e em SHR tratados com PV3 nas doses de 50 μg/Kg e 2,5 mg/Kg (Figura 15 A). PV3 causou redução na excreção de creatinina nas doses de 2,5 μg/Kg no grupo WT e SHR, e na dose de 9,5 μg/Kg para o grupo SHR (Figura 15 B).

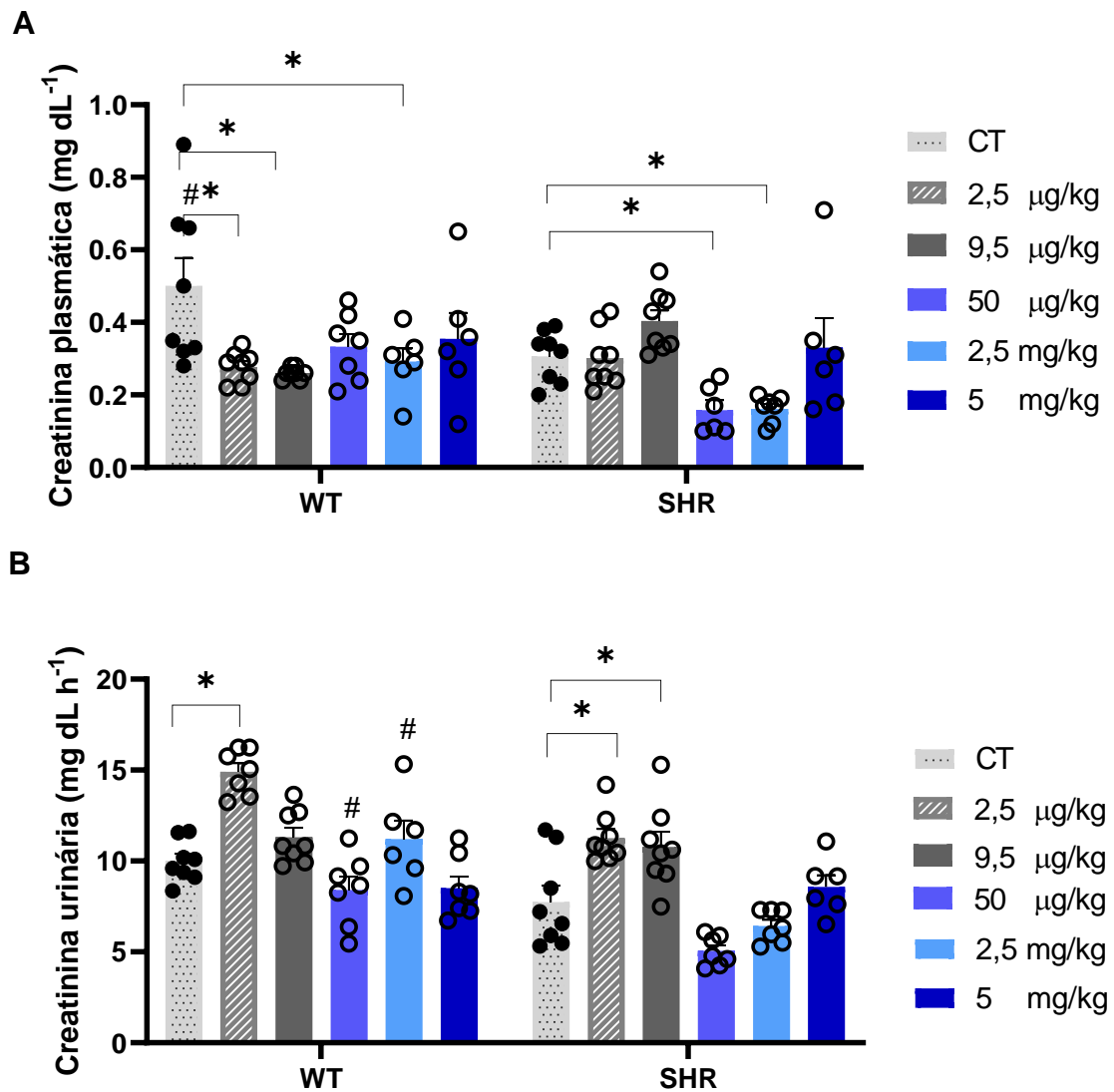


Figura 15: Comparação da creatinina plasmática (painel A) e urinária (painel B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6-8 por grupo). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. * p <0,05 WT vs SHR em diferentes doses. # p<0,05 indica diferença entre linhagens WT e SHR para mesma dose ou veículo (interação das variáveis independentes).

Ao avaliar o efeito do PV3 sobre o *clearance* de creatinina (Taxa de depuração de creatinina), foi observado que houve aumento do *clearance* de creatinina em WT tratados com PV3 nas doses de 2,5 e 9,5 µg/Kg e 2,5 mg/Kg e em SHR que receberam PV3 na dose de 2,5 µg/Kg (Figura 16).

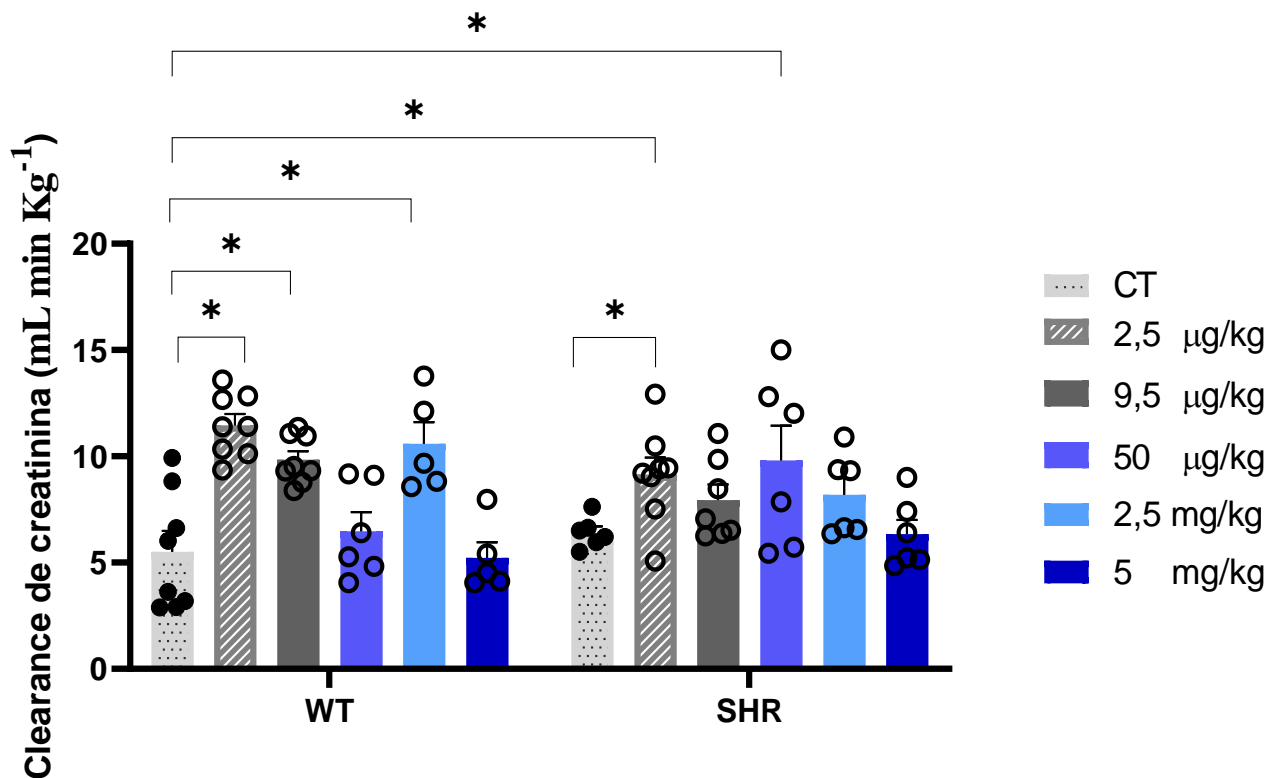


Figura 16: Clearance de creatinina por peso (ml/min/kg) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR) medidos 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6-8 por grupo). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. * p <0,05 WT vs SHR em diferentes doses.

6.5.2.4 NÍVEIS DE UREIA SÉRICA E URINÁRIA E CLEARANCE DA URÉIA

Os níveis de uréia plasmática foram avaliados. Os resultados evidenciaram que o tratamento com PV3 na dose de 9,5 µg/Kg reduziu os níveis de uréia plasmática em WT, ao passo que tal tratamento de 5mg/kg aumentou este parâmetro em SHR (vs. respectivos grupos injetados com veículo). Ratos normotensos apresentaram maiores níveis de uréia plasmática do que a linhagem hipertensa. Entretanto, o tratamento com PV3 não afetou os níveis de uréia urinária quando comparados os grupos tratados com os respectivos controles na mesma linhagem (Figura 17 B).

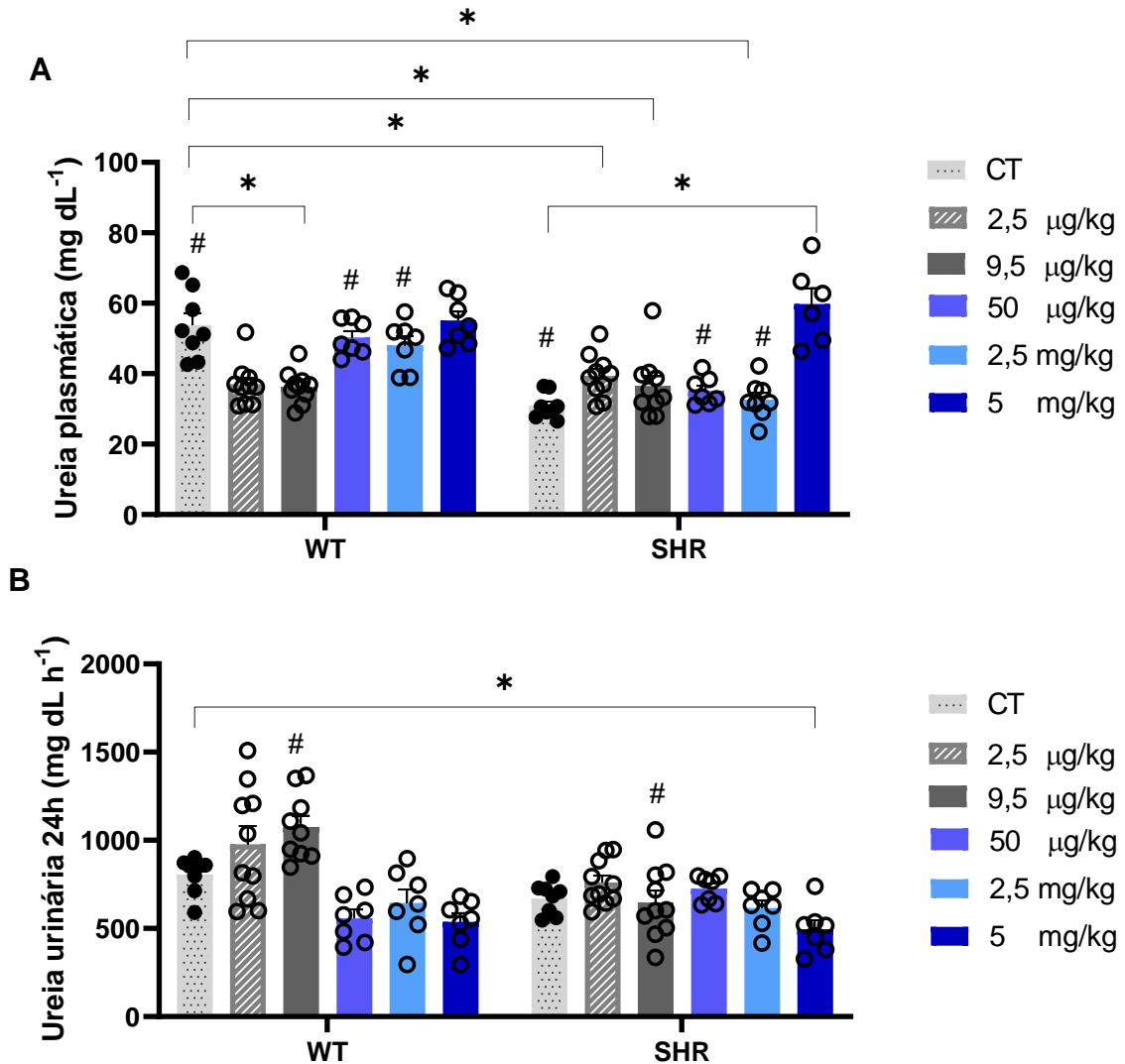


Figura 17: Comparação da ureia plasmática (painel A) e urinária (painel B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6-8 por grupo). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. * p < 0,05 WT vs SHR em diferentes doses. # p < 0,05 indica diferença entre linhagens WT e SHR para mesma dose ou veículo (interação das variáveis independentes).

Em relação ao *clearance* de uréia os resultados mostram que SHR tem menor depuração de uréia em comparação com WT. O tratamento com PV3 reduziu o *clearance* de uréia na dose 5 mg/Kg em SHR (PV3 vs controle) e aumentou a taxa de depuração de uréia de WT tratados com PV3 nas doses de 2,5 e 9,5 µg/Kg (PV3 vs controle) (Figura 18).

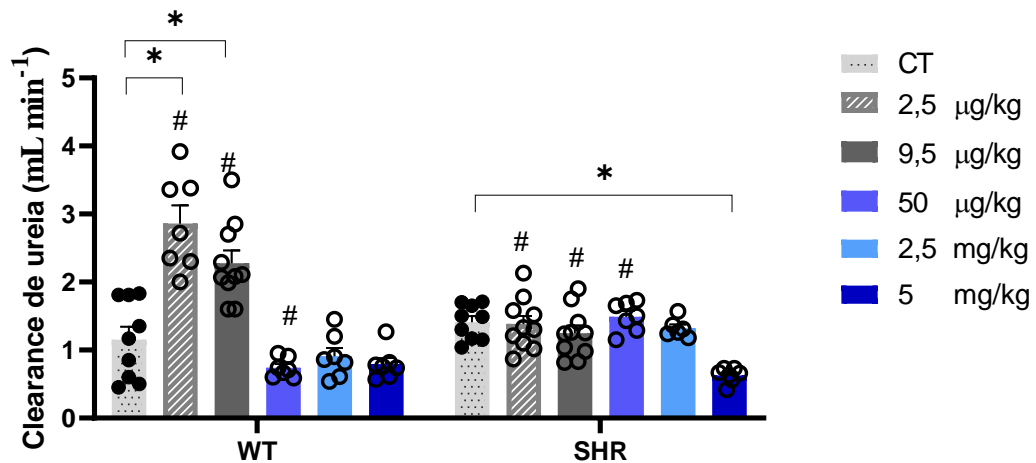


Figura 18: Comparação da *clearance* de ureia entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6-8 por grupo). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. * p <0,05 WT vs SHR em diferentes doses. # p<0,05 indica diferença entre linhagens WT e SHR para mesma dose ou veículo (interação das variáveis independentes).

6.5.2.5 NÍVEIS DE ÁCIDO ÚRICO PLASMÁTICO E URINÁRIO, PROTEÍNAS TOTAIS PLASMÁTICA E URINÁRIA.

Os resultados obtidos a respeito dos níveis de ácido úrico urinário mostraram que tais níveis se apresentaram naturalmente mais elevados na linhagem SHR (SHR vs WT) (Figura 19 A). Foi observado também que o tratamento com PV3 reduziu esse parâmetro na linhagem SHR nas doses 2,5 e 9,5 µg/Kg (PV3 vs controle) (Figura 19 A). Ao analisar os resultados dos níveis de ácido úrico plasmático, observou que os níveis aumentaram nas doses de 2,5 e 9,5 µg/Kg com o grupo veículo nas linhagens WT e SHR (Figura 19 B).

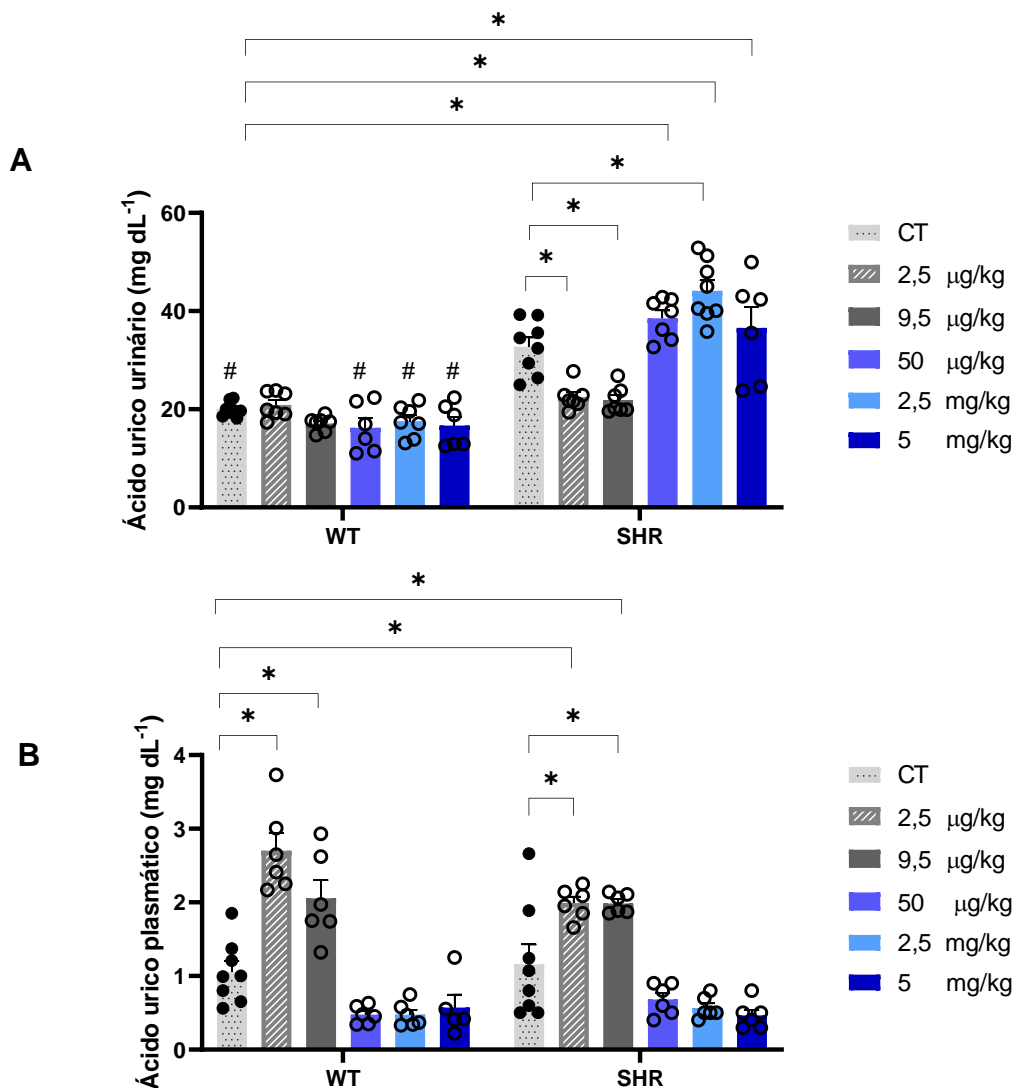


Figura 19: Comparação da ácido úrico urinário (painel A) e sérico (painel B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6-8 por grupo) Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. * p <0,05 WT vs SHR em diferentes doses. # p <0,05 indica diferença entre linhagens WT e SHR para mesma dose ou veículo (interação das variáveis independentes).

Os resultados de análise de proteínas totais demonstraram que a administração do PV3 nos animais WT não alterou os níveis de proteínas no plasma, enquanto na linhagem SHR observou um pequeno aumento de níveis de proteína plasmática, o que pode ser resultado da injeção de peptídeos, visto que é uma fonte proteica.

Enquanto o PV3 não alterou a taxa de excreção de proteínas totais em WT e SHR (Figura 20).

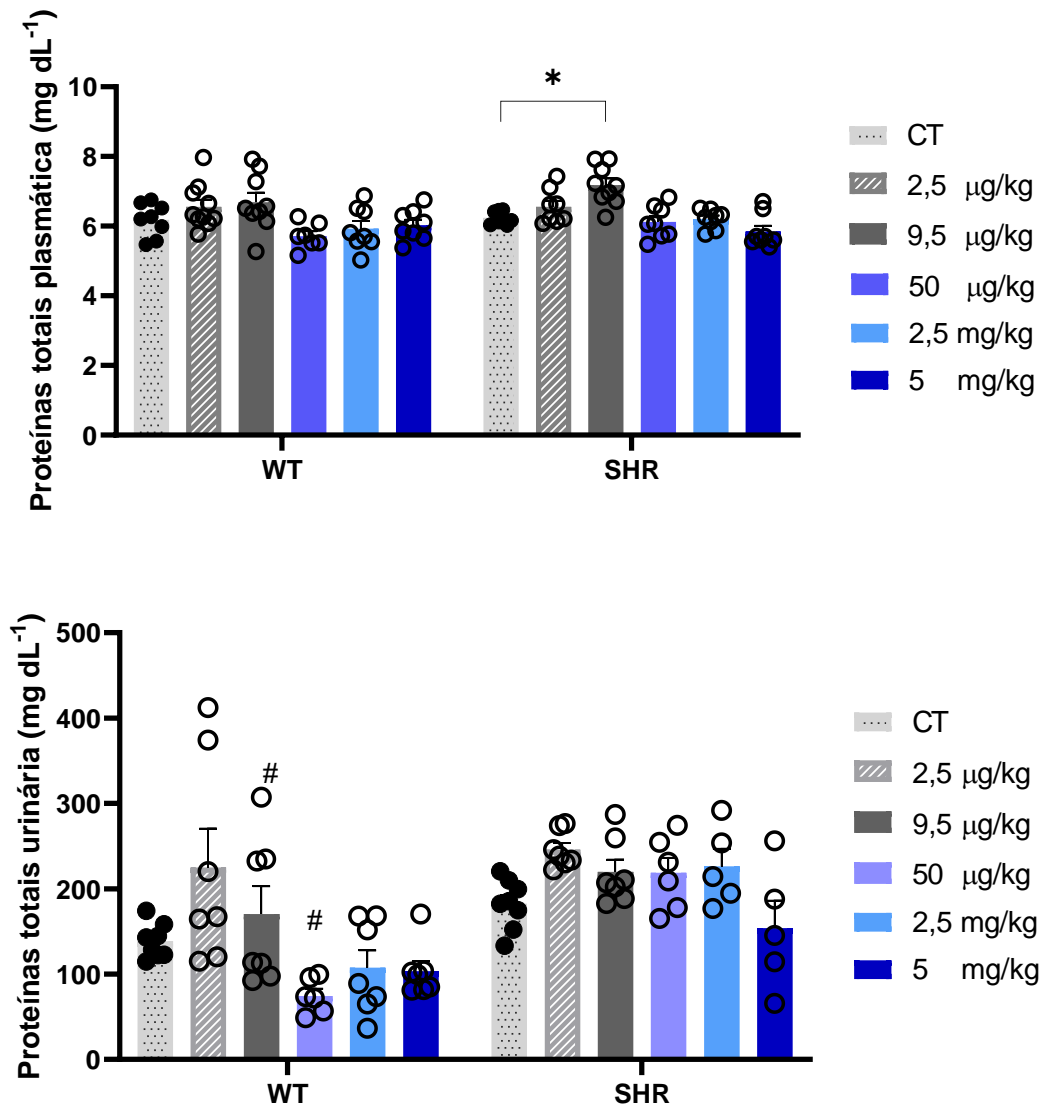


Figura 20: Comparação dos níveis de proteínas totais plasmática (painel A) e urinária (painel B) entre os animais normotensos (WT) e hipertensos (SHR), medidas a partir de urina e sangue amostrados 24h após injeção intraperitoneal de veículo (solução salina - NaCl 0,9%) ou PV3 nas doses de 2,5 µg/kg; 9,5 µg/kg; 50 µg/kg; 2,5 mg/Kg e 5 mg/Kg. Os valores estão expressos como média ± EPM (n=6-8 por grupo). Análise Two-Way ANOVA seguido por pós-teste de Tukey. * p <0,05 WT vs SHR em diferentes doses. # p <0,05 indica diferença entre linhagens WT e SHR para mesma dose ou veículo (interação das variáveis independentes).

6.5. 3. ESTUDO DO PV3 SOBRE A FUNÇÃO CARDIOVASCULAR

6.5.3.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM PV3 SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS

Essa série experimental foi empregada para avaliar o efeito do PV3 sobre a PAM após um período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares de 10 min. Os valores basais de PAM estão apresentados na Tabela 4. Os níveis de PAM amostrados em SHR foram mais elevados que os de WT, confirmando o estado hipertensivo do referido modelo experimental.

Tabela 4. Valores basais da PAM de WT e SHR dos grupos nas doses de 2,5 e 5 mg/kg do PV3.

Dose	WT		SHR	
	2,5 mg/kg	5 mg/Kg	2,5 mg/kg	5 mg/Kg
PAM (mmHg)	106,25 ±9,24	107,23 ±13,0	153,13 ±19,25	147,85±15,67

Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (N= 5 animais por grupo).

Após a injeção de PV3, foi observado uma redução da PAM instantaneamente em WT e SHR, conforme observado nas Figuras 21 e 22 (painel A). Em WT, a redução foi de $39,7 \pm 15,3$ mmHg ($35,8 \pm 11,6$ %) para a dose de 2,5 mg/Kg e $31,8 \pm 21,7$ mmHg ($30,7 \pm 21,8$ %) para a dose de 5 mg/Kg, onde a redução da PAM foi significativo em mmHg e em porcentagem (Figura 21 B e C).

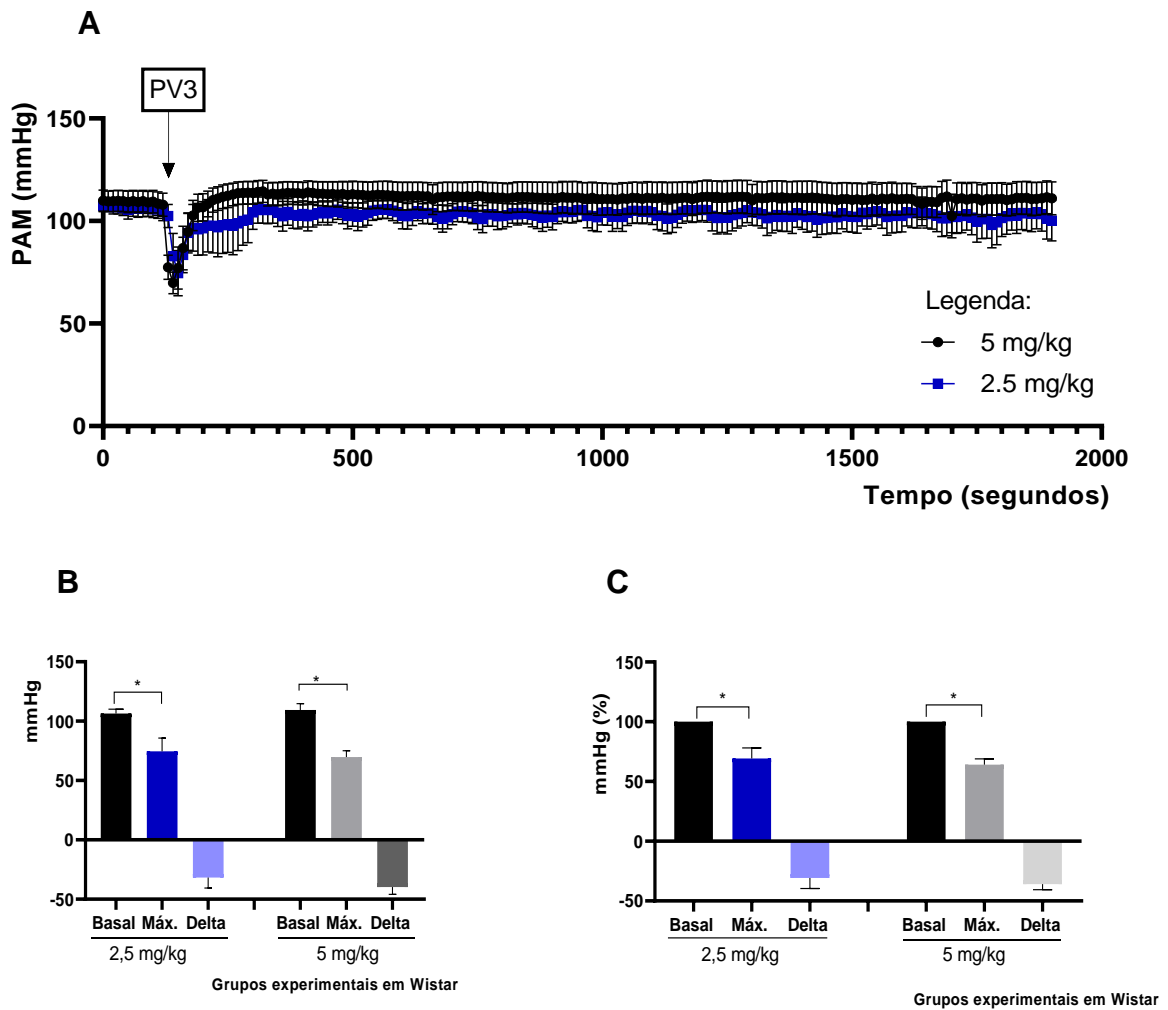


Figura 21: Efeito do PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg sobre a pressão arterial de ratos normotensos (WT). Painel A: efeitos do PV3 na pressão arterial ao longo do tempo de registro. Painel B: valores basais, respostas máximas e deltas em mmHg. Painel C: valores basais, respostas máximas e deltas em %. Os valores estão expressos como média \pm EPM(n=5). One-Way ANOVA ou teste T de student. * p <0,05 basal vs. respostas máximas.

Para a linhagem SHR, foi observado reduções de $31,4 \pm 21,7$ mmHg ($21,6 \pm 16$ %) para a dose de 2,5 mg/Kg e $47,3 \pm 21,7$ ($26,1 \pm 18,7$ %) para a dose de 5 mg/Kg, onde a diferença significativa da redução entre o valor basal foi a nível de porcentagem (Figura 22 B e C).

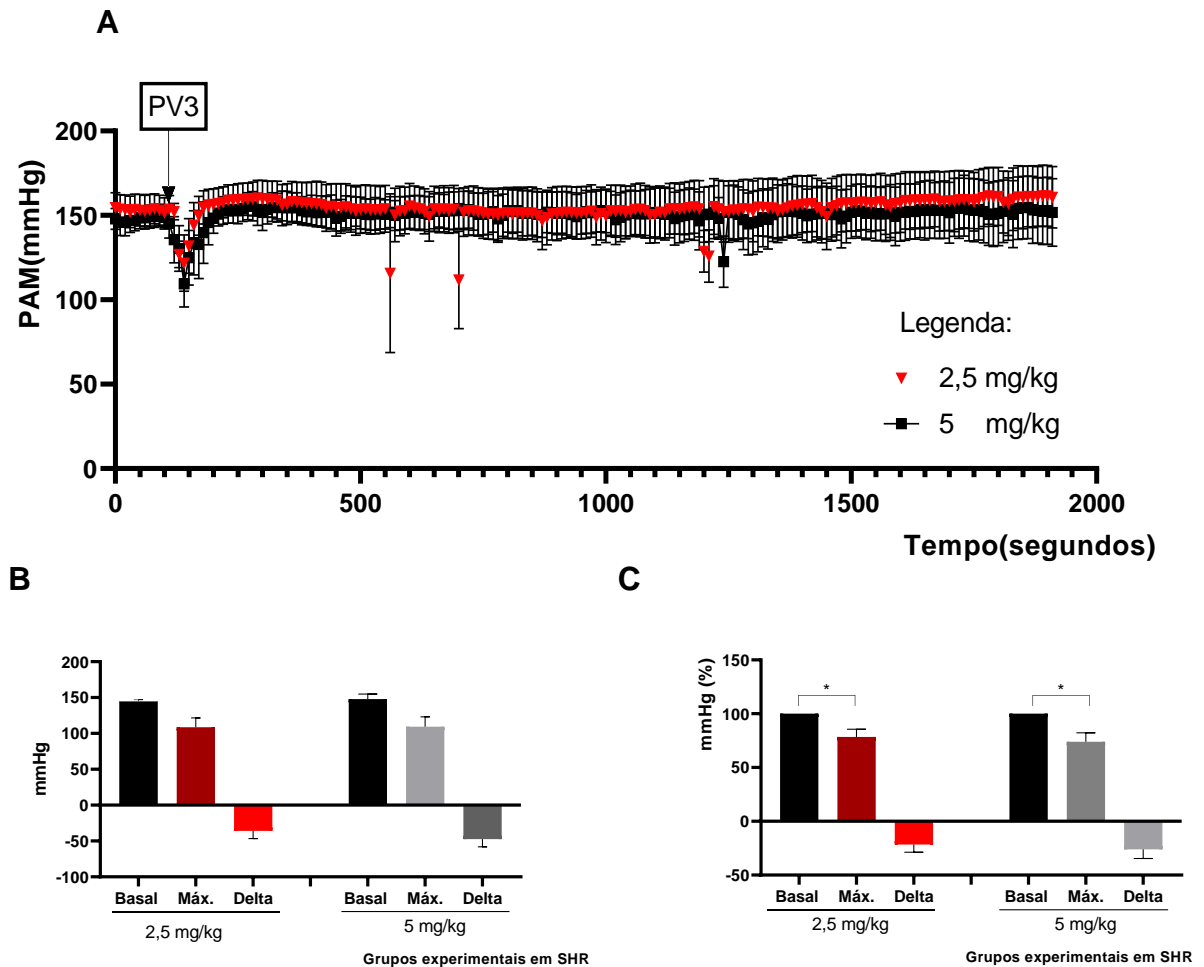


Figura 22 – Efeito do PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg sobre a pressão arterial de ratos hipertensos (SHR). Paineil A: efeitos do PV3 na pressão arterial ao longo do tempo de registro. Paineil B: valores basais, respostas máximas e deltas em mmHg. Paineil C: valores basais, respostas máximas e deltas em %. Os valores estão expressos como média \pm EPM(n=5). One-Way ANOVA ou teste T de student. * p < 0,05 basal vs. respostas máximas.

6.5.3.2 EFEITO DO PV3 SOBRE A RESISTÊNCIA VASCULAR DAS ARTÉRIAS AORTA E RENAL

Após a avaliação do efeito do PV3 no PAM, foi avaliado o seu efeito sobre a resistência vascular da artéria aorta (RVA) e renal (RVR) em WT e SHR. Essa série experimental foi empregada para avaliar o efeito do PV3 sobre a RVA e RVR após estabilização das mesmas. Os valores basais da RV da artéria aorta e renal podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores basais da RVA e da RVR de WT e SHR dos grupos da dosagem de 2,5 e 5 mg/kg do PV3.

	WT		SHR	
Dosagem	2,5 mg/kg	5 mg/Kg	2,5 mg/kg	5 mg/Kg
RVA (mmHg/min)	3,23 ± 0,48	4,09 ± 0,97	3,98 ± 0,73	3,60 ± 0,49
RVR (mmHg/min)	52,45 ± 19,17	50,33 ± 22,21	47,85 ± 15,27	44,60 ± 8,69

Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=5).

Após a estabilização e injeção do PV3 nas doses testadas, foi possível identificar a redução da resistência vascular da artéria aorta em WT (Figura 23 painel A) e SHR (Figura 24 painel A). Em WT a redução da resistência vascular da artéria aorta foi de $1,24 \pm 0,30$ mmHg/ min ($38,33 \pm 7,3$ %) e $1,13 \pm 0,36$ mmHg/ min ($28,58 \pm 9,9$) para as doses de 2,5 e 5 mg/Kg, respectivamente (Figura 23 painéis B e C)

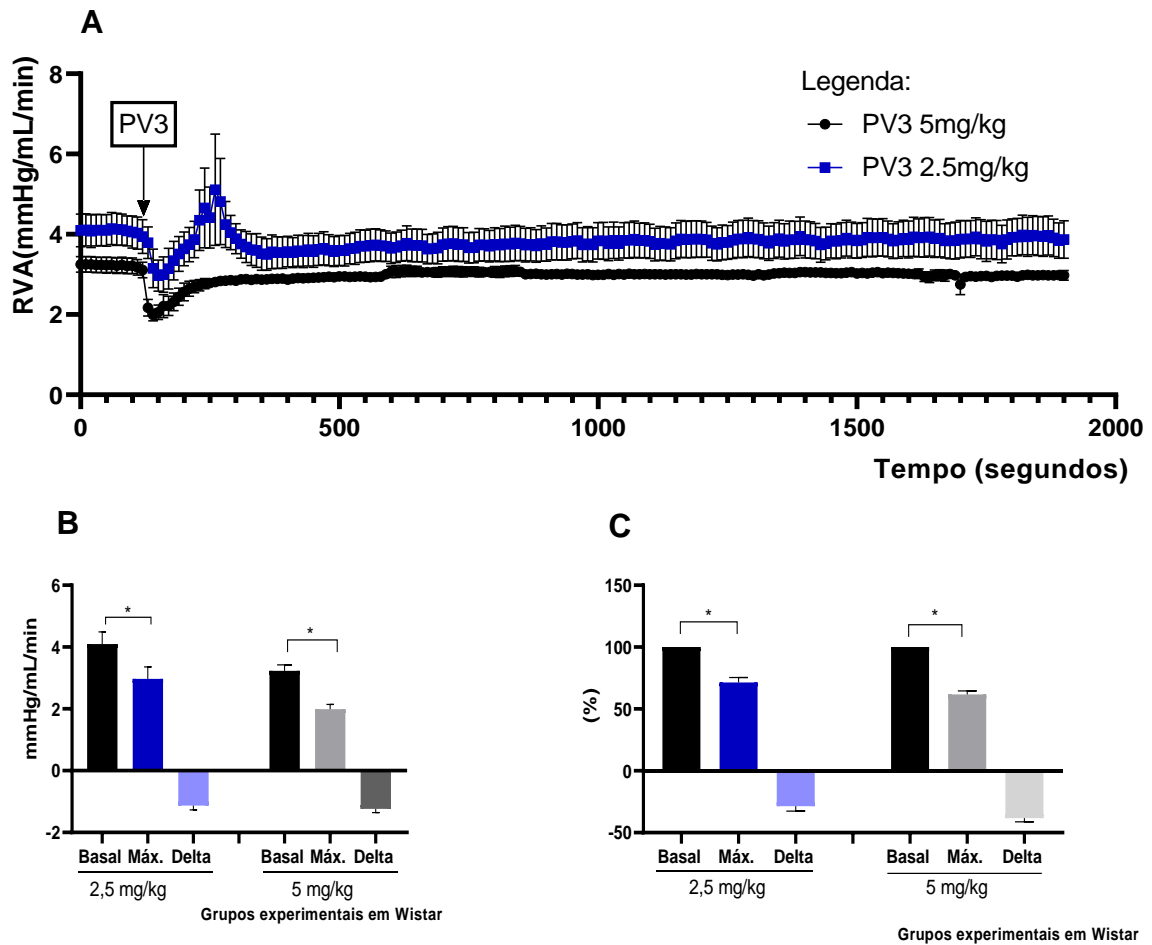


Figura 23: Efeito do PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg sobre a resistência vascular aórtica de ratos normotensos (WT). Painel A: efeitos do PV3 sobre a resistência vascular aórtica ao longo do tempo de registro. Painel B: valores basais, respostas máximas e deltas em mmHg/mL/min. Painel C: valores basais, respostas máximas e deltas em %. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=5$). One-Way ANOVA ou teste T de student. * $p < 0,05$ basal vs. respostas máximas.

Em SHR a redução da resistência vascular em artéria aorta foi de $0,81 \pm 0,5$ mmHg/min ($19,5 \pm 11$ %) e $1,2 \pm 0,7$ ($32,3 \pm 15,6$ %) para as doses de 2,5 e 5 mg/Kg, respectivamente (Figura 24 painéis B e C). As reduções da resistência vascular de artéria aorta foram significativas nas duas doses testadas quando expressos em porcentagem para as duas linhagens testadas (Figuras 23 painel C e 24 painel C).

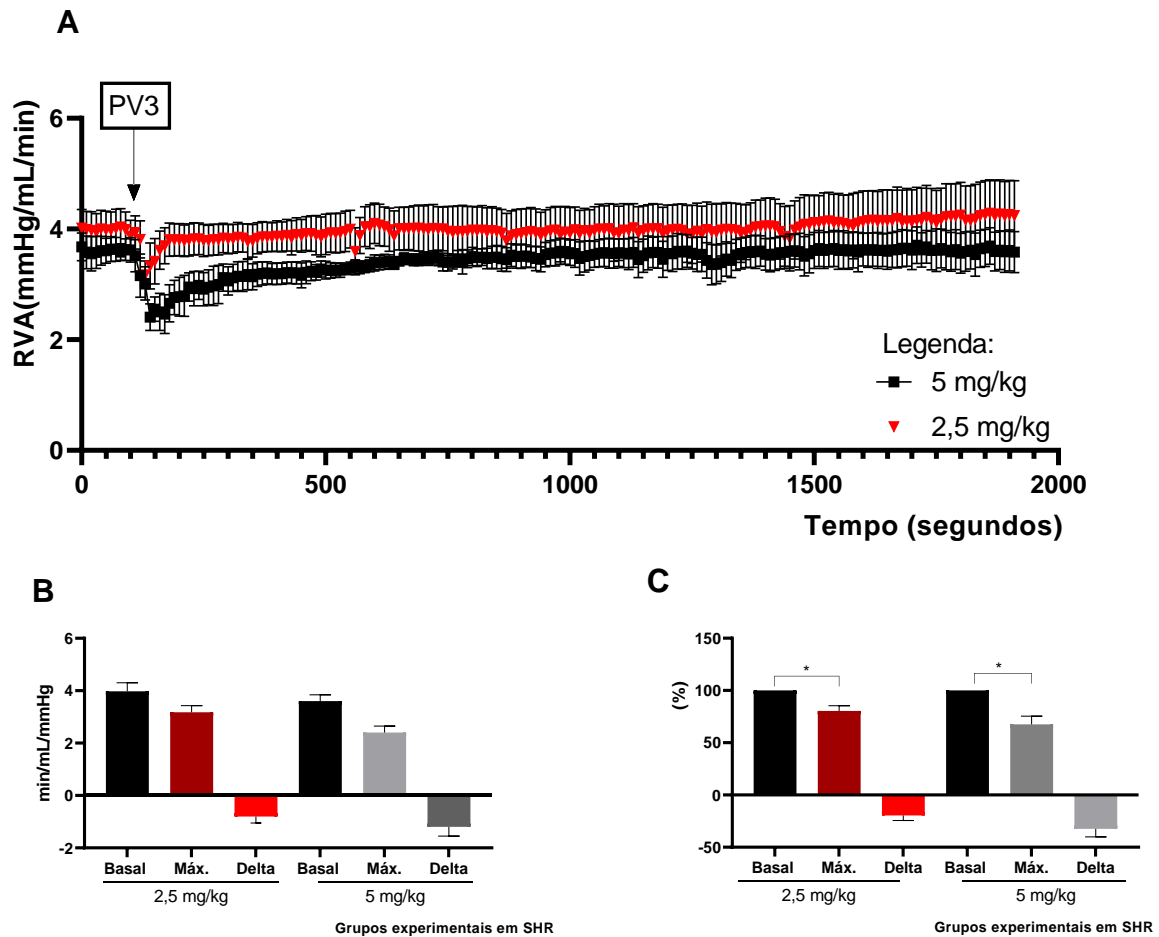


Figura 24: Efeito do PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg sobre a resistência vascular aórtica de ratos hipertensos (SHR). Painel A: efeitos do PV3 sobre a resistência vascular aórtica ao longo do tempo de registro. Painel B: valores basais, respostas máximas e deltas em mmHg/mL/min. Painel C: valores basais, respostas máximas e deltas em %. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão (n=5). One-Way ANOVA ou teste T de student. * p < 0,05 basal vs. respostas máximas.

O mesmo efeito encontrado para a artéria aorta foi observado nos testes utilizando-se a artéria renal. Após a injeção do PV3 identificou-se uma queda significativa da resistência vascular da artéria renal para as duas doses testadas e para as duas linhagens de animais testadas (Figuras 25 e 26). Ao se avaliar a linhagem WT a redução observada foi de $13,8 \pm 6,7$ mmHg/min ($26 \pm 8,2$ %) e 12 ± 9 mmHg/min ($23 \pm 11,4$ %) para as doses de 2,5 e 5 mg/ Kg, respectivamente (Figura 25 painéis B e C).

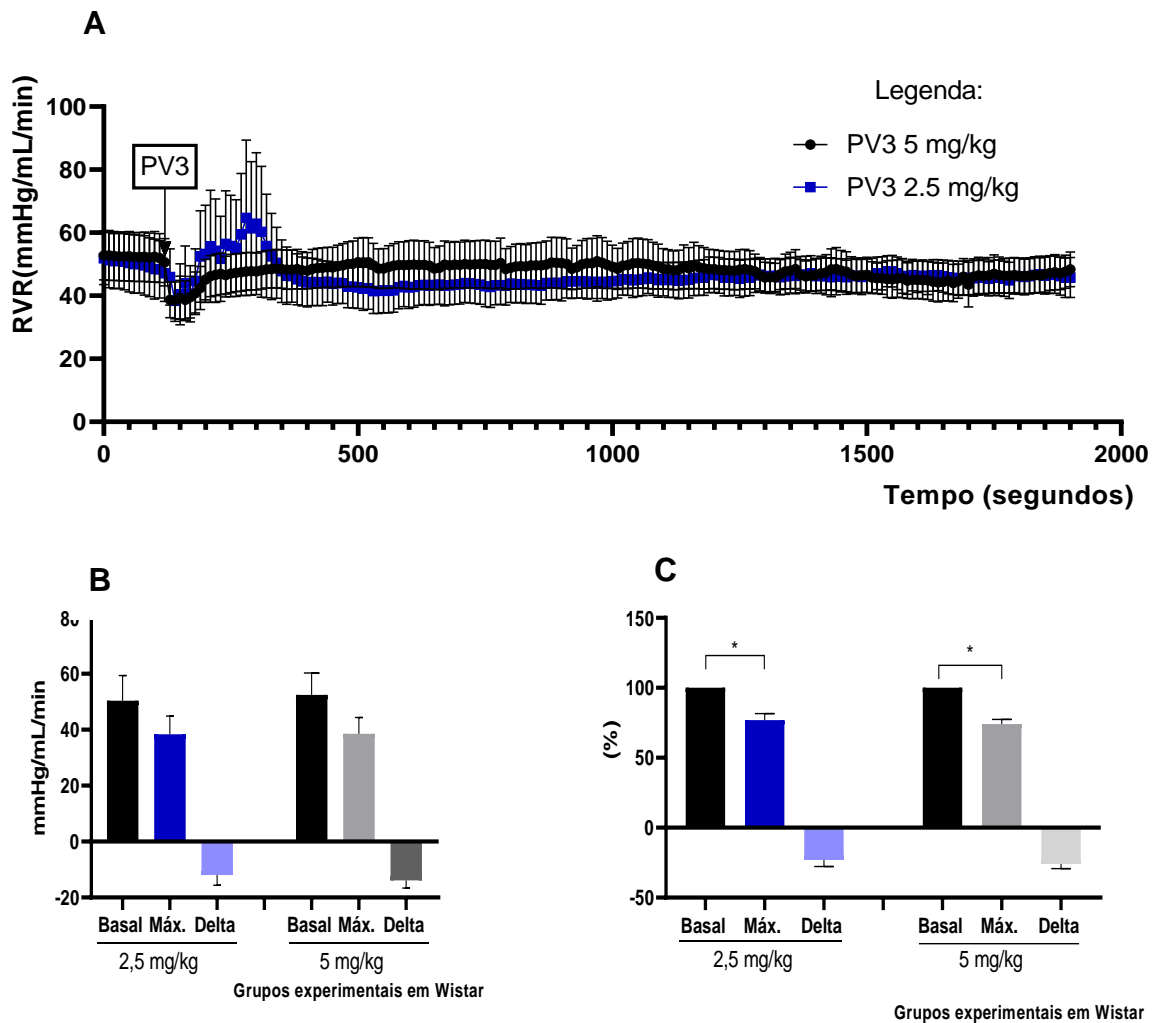


Figura 25: Efeito do PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg sobre a resistência vascular renal de ratos normotensos (WT). Painel A: efeitos do PV3 sobre a resistência vascular aórtica ao longo do tempo de registro. Painel B: valores basais, respostas máximas e deltas em mmHg/mL/min. Painel C: valores basais, respostas máximas e deltas em %. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=5). One-Way ANOVA ou teste T de student. * p <0,05 basal vs. respostas máximas.

Em SHR a redução da resistência vascular da artéria renal foi de $10,2 \pm 7,9$ ($20,2 \pm 9,9$ %) e $16,1 \pm 7,5$ mmHg/ min ($34,7 \pm 11,6$ %) para as doses de 2,5 e 5 mg/Kg, respectivamente (Figura 26 painéis B e C). As reduções da resistência vascular de artéria renal foram significativas nas duas doses testadas quando expressos em porcentagem para as duas linhagens testadas (Figuras 25 painel C e 26 painel C).

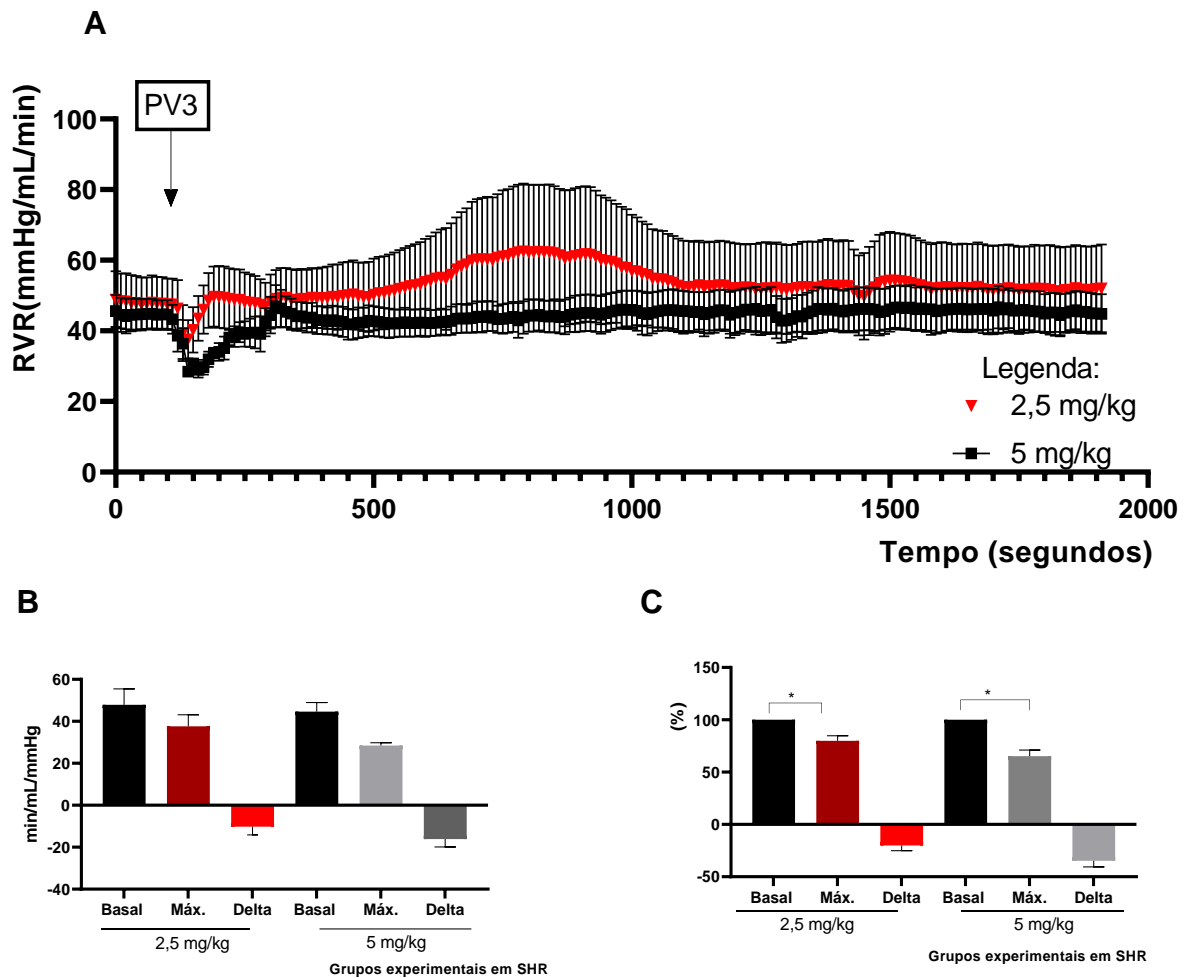


Figura 26: Efeito do PV3 nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg sobre a resistência vascular renal de ratos hipertensos (SHR). Painel A: efeitos do PV3 sobre a resistência vascular renal ao longo do tempo de registro. Painel B: valores basais, respostas máximas e deltas em mmHg/mL/min. Painel C: valores basais, respostas máximas e deltas em %. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=5). One-Way ANOVA ou teste T de student. * p <0,05 basal vs. respostas máximas.

6.6 ENSAIOS *IN VIVO* VOLTADOS PARA O EFEITO DO PV3 SOBRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS DE CAMUNDONGOS APÓS 10 SEMANAS DE TRATAMENTO CRÔNICO

6.6.1 INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE PV3 POR 10 SEMANAS NO GANHO DE MASSA

Durante o tratamento crônico foi feito um monitoramento do peso corporal dos animais semanalmente. O grupo que recebeu HFD e HFD+ PV3 tiveram aumento de peso significativo na quarta semana quando comparado com a primeira semana (Figura 27), enquanto no grupo controle o aumento de peso se deu na quinta semana e o grupo PV3 o aumento de peso foi significativo na sexta semana. Após a sexta

semana, o ganho de massa foi atenuado no grupo HFD+PV3 quando comparado com o grupo HFD, mostrando que mesmo com o consumo de dieta rica em gordura o PV3 foi capaz de prevenir e evitar o ganho de massa excessivo. Durante as 10 semanas de monitoramento, o grupo HFD teve um aumento de peso corporal quando comparado com o grupo de controle, PV3 e HFD+PV3. Os resultados dos deltas calculado pela diferença entre a 1 e 10 semanas (Figura 28) mostra a eficácia da dieta em desenvolver obesidade e o efeito do PV3 em reduzir o ganho de massa. Ao avaliar o grupo dieta padrão com o grupo PV3 não houve diferença significativa entre o peso corporal (Figura 28).

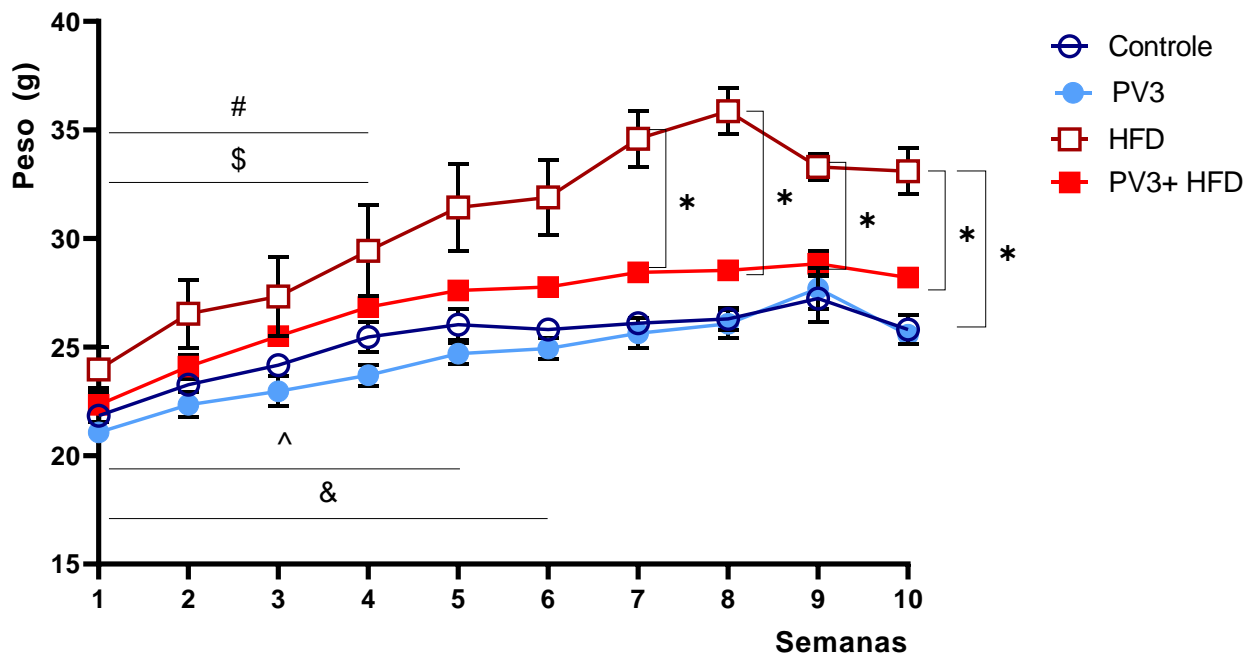


Figura 27: Influência da ingestão diária de PV3 por 10 semanas no ganho de massa corporal. A imagem está evidenciando o monitoramento do ganho de massa semanal desde o início do tratamento de forma gradativa. # $p < 0,05$ indica o início do ganho de massa que difere estatisticamente do ponto inicial do tratamento (1ª semana) no grupo HFD. \$ $p < 0,05$ indica o início do ganho de massa que difere estatisticamente do ponto inicial do tratamento (1ª semana) no grupo HFD +PV3. ^ $p < 0,05$ indica o início do ganho de massa que difere estatisticamente do ponto inicial do tratamento (1ª semana) no grupo controle. & $p < 0,05$ indica o início do ganho de massa que difere estatisticamente do ponto inicial do tratamento (1ª semana) no grupo PV3. * $p < 0,05$, Teste Anova Two-Way, seguido de pós teste de Tukey, $p < 0,05$.

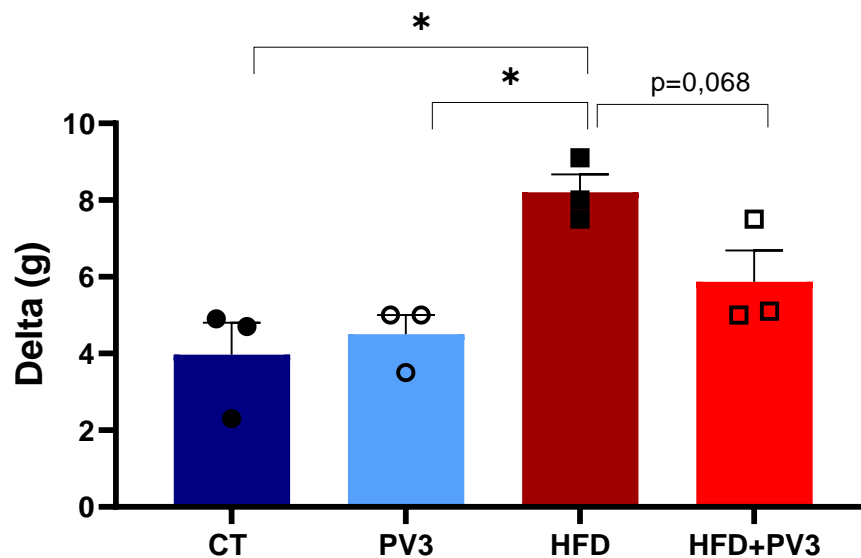


Figura 28: Influência da ingestão diária de PV3 por 10 semanas no ganho de massa corporal. A imagem evidencia o delta da avaliação do ganho de massa corporal calculado pela diferença dos pesos entre a 1^o e a 10^a semana. * $p < 0,05$, Teste Anova Two-Way, seguido de pós teste de Tukey, $p < 0,05$.

6.6.2 INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE PV3 POR 10 SEMANAS NO INGESTÃO ALIMENTAR

Após o monitoramento do ganho de massa dos animais foi necessário avaliar a ingestão alimentar ao final do tratamento crônico. Deste modo foi observado que os grupos que receberam a HFD consumiram mais alimento comparado com os grupos que receberam a dieta padrão na fase escura, e no somatório total do tempo. Este resultado é justificado pelo fato que a HFD é mais palatável e calórica, fazendo com que o animal consuma mais. Ao avaliar o efeito do PV3 notamos que não houve influência no consumo alimentar nos grupos testados (Figura 29).

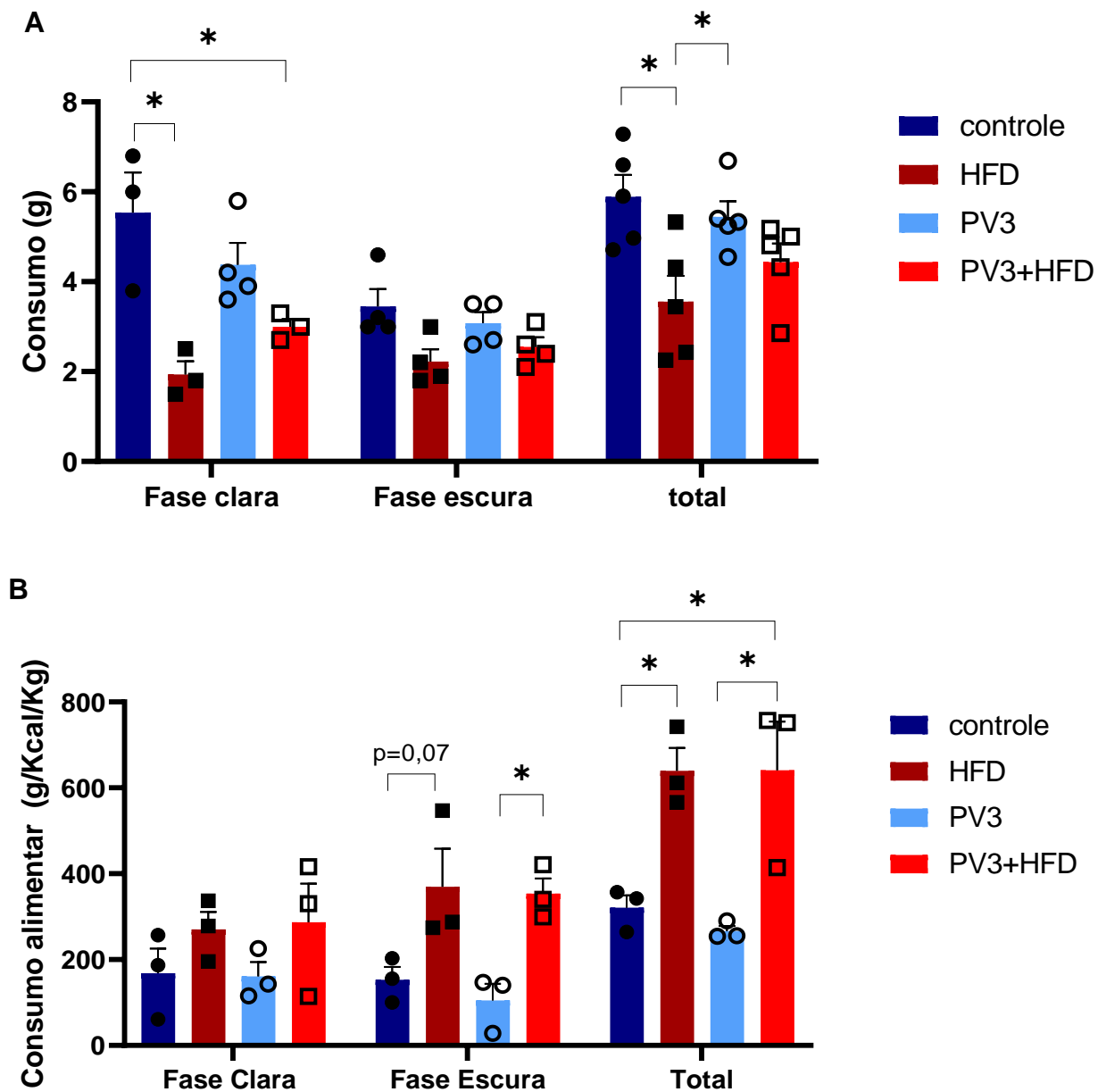


Figura 29: Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento no consumo alimentar. No painel A está o consumo alimentar em gramas. No painel B está representando o consumo alimentar calculado pela Kcal e pelo peso do animal. A avaliação do teste de consumo foi realizada na última semana de experimentos. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=3). * $p < 0,05$, Teste Anova Two-Way, seguido de pós teste de Tukey.

6.6.3 INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE PV3 POR 10 SEMANAS NO PESO DOS ÓRGÃOS E TECIDOS

Com intuito de avaliar se o PV3 interfere no tamanho dos órgãos foi feita uma pesagem nos órgãos de interesse: Rim, Fígado, Tecido adiposo marrom (BAT), tecido adiposo epididimal (EPI) e tecido adiposo retroperitoneal (RET). Ao avaliar o rim

esquerdo, notamos que não houve diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 30 painel A), enquanto que, houve diferença no rim direito entre o grupo HFD e o grupo dieta padrão (Figura 30 painel B). Nos tecidos EPI e RET houve uma diminuição do peso corporal, quando comparado o grupo HFD+PV3 com o grupo HFD (Figura 30 painéis C e D), mostrando que o PV3 foi capaz de diminuir a adiposidade nos camundongos que receberam a dieta rica em gordura (Figura 31). No BAT, o aumento do tecido foi significativo no grupo HFD (Figura 30 painel E) e no fígado o peso do órgão foi menor nos grupos que receberam a dieta rica em gordura (HFD e HFD+PV3) (Figura 30 painel F), estes resultados são em decorrência da alimentação rica em gordura.

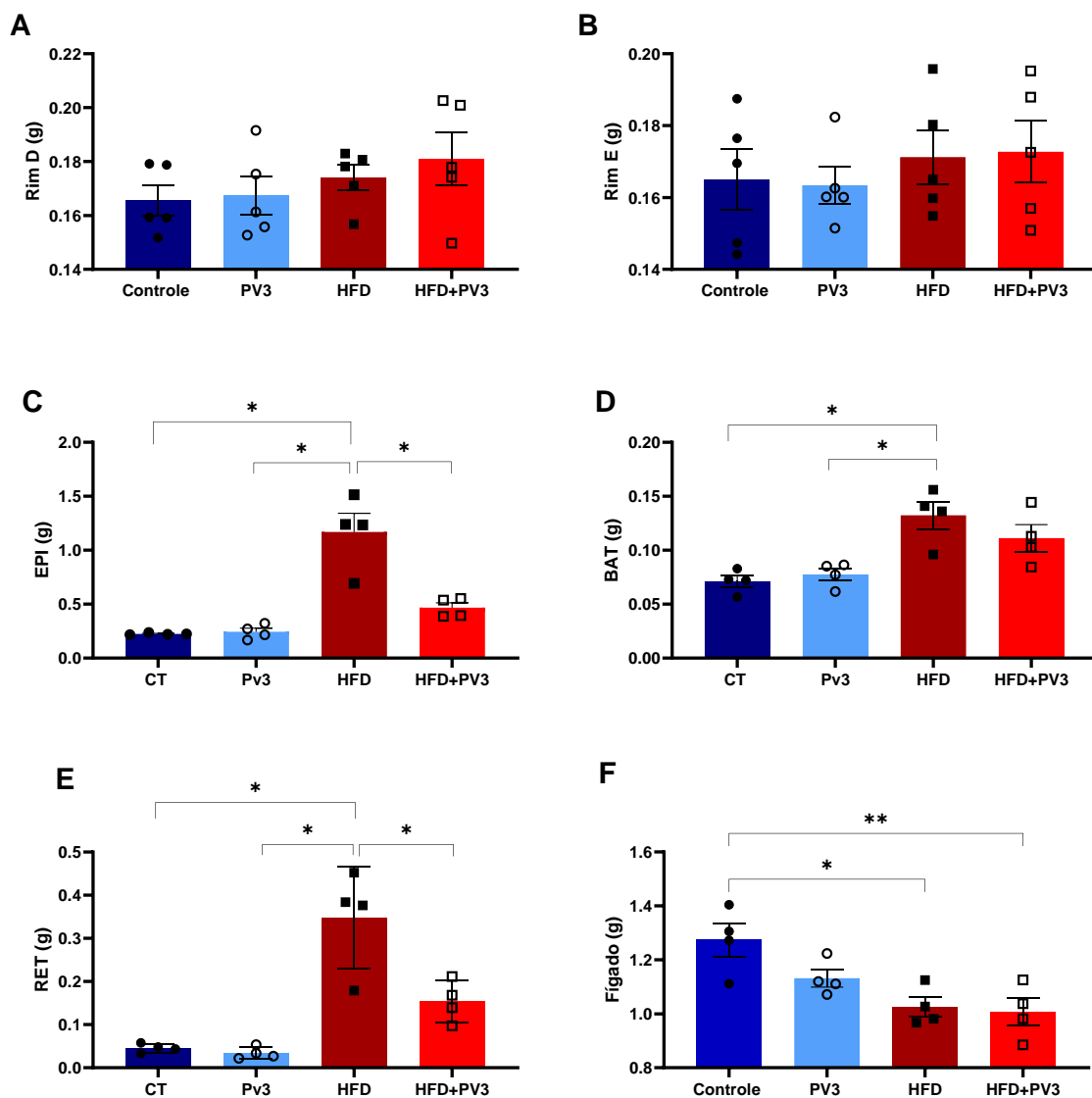


Figura 30: Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento no peso de órgãos e tecidos. A pesagem dos órgãos e tecidos se deu no último dia de experimento no momento da eutanásia. Em A e B, se refere a pesagem do rim direito e esquerdo; em C, se refere a pesagem do

tecido adiposo epididimal; em D, se refere a pesagem do tecido adiposo retroperitoneal; em E, se refere a pesagem do tecido adiposo marrom e em F, se refere a pesagem do fígado. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=5-4). * $p < 0,05$, Teste Anova Two-Way, seguido de pós teste de Tukey.

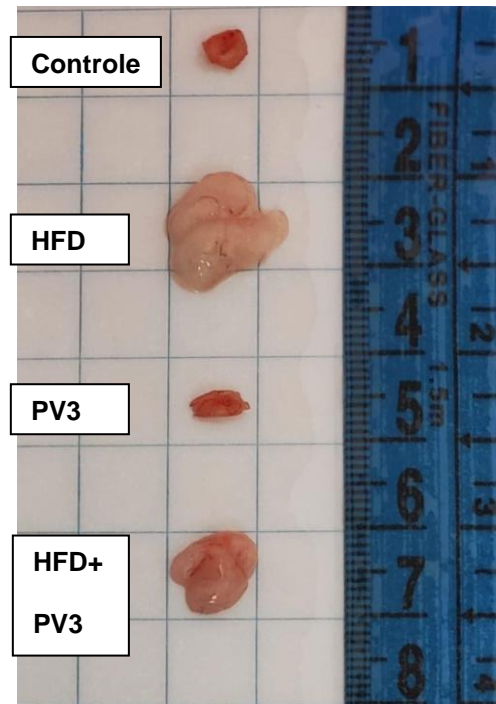


Figura 31: Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento na redução de adiposidade em tecido adiposo epididimal.

6.6.4 INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE PV3 POR 10 SEMANAS NA GLICEMIA EM JEJUM

Para a análise da glicemia em jejum foi avaliado os camundongos em 2 períodos: na quarta semana e na nona semana de tratamento. Na quarta semana os níveis glicêmicos foram parecidos em todos os grupos testados, não houve diferença entre os grupos. Na nona semana foi observado que o grupo HFD apresentou maiores níveis glicêmicos, representando uma pré-disposição para resistência à insulina, enquanto o grupo HFD+PV3 teve os níveis glicêmicos menores comparado ao grupo controle e HFD, demonstrando o efeito hipoglicêmico do PV3 (Figura 32).

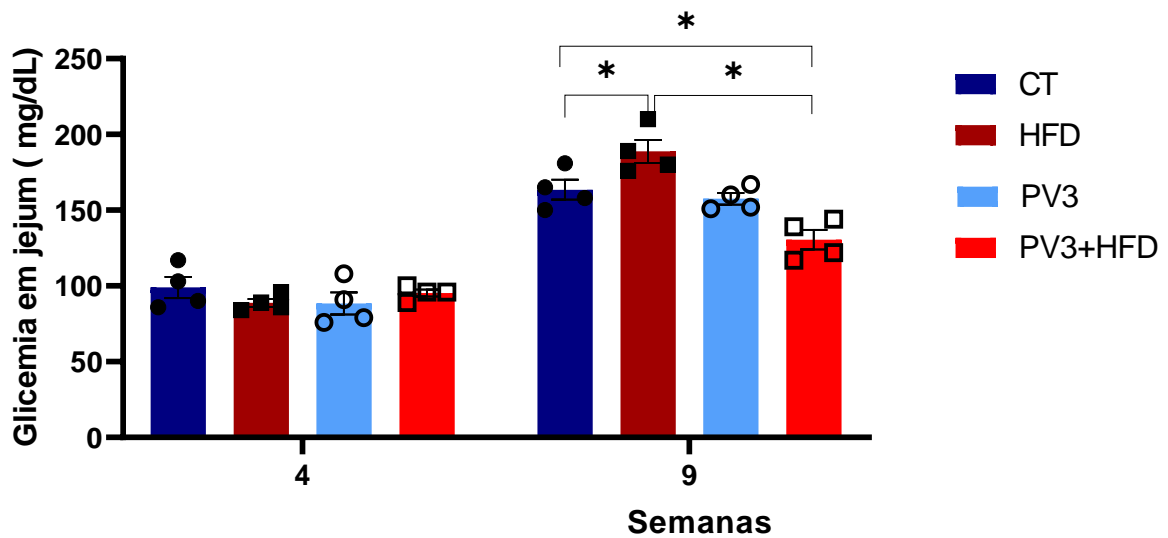


Figura 32: Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento na glicemia em jejum. A avaliação da glicemia em jejum foi feita após 4 e 9 semanas. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=4). * $p < 0,05$, Teste Anova Two-Way, seguido de pós teste de Tukey.

6.6.5 INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE PV3 POR 10 SEMANAS NO TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG), TOLERÂNCIA À INSULINA (TTI), TAXA DE DECAIMENTO (TTKI) E TOLERÂNCIA AO PIRUVATO (TTP)

Na penúltima semana do tratamento crônico foram feitos os testes de TTG, TTI e TTP em dias alternados para não ter influência do stress no resultado. Inicialmente foi feito o teste de tolerância à glicose, neste teste houve diferença significativa na área sob a curva nos grupos analisados PV3 e PV3+ HFD comparado com o grupo controle de dieta padrão. Foi observado ainda que a área sob a curva do grupo HFD foi maior que a do grupo que recebeu a dieta padrão, este resultado confirma o quadro de resistência à insulina que esses animais apresentam após consumir dieta hiperlipídica após 8 semanas (Figura 33 painéis A e B).

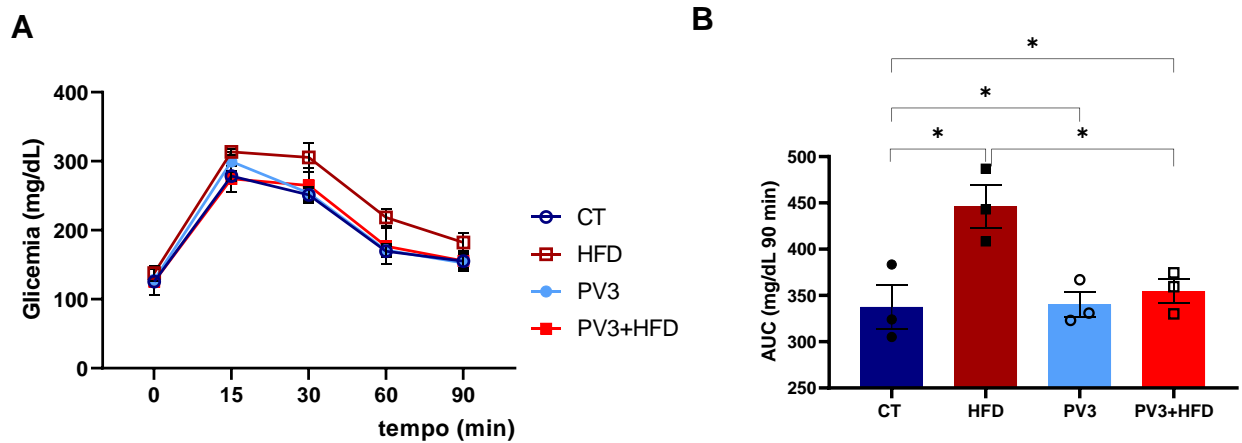


Figura 33: Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento no teste de tolerância à glicose (TTG). Em A, se refere a curva dos níveis de glicose do teste de TTG ao longo de 120 minutos. Em B, se refere a área sob a curva dos níveis de glicose no teste de TTG. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=3). * $p < 0,05$, Teste Anova Two-Way, seguido de pós teste de Tukey.

A avaliação da sensibilidade à insulina na intolerância à glicose foi investigada através da depuração da glicose plasmática em função do tempo após a injeção de insulina. Em relação ao TTI a área sob a curva foi maior no grupo HFD, confirmando o modelo experimental de resistência à insulina. O grupo Pv3 teve a área sob a curva maior que o grupo controle, em virtude da maior captação de glicose, o que é visto na taxa de TTKi. O TTKi é uma taxa constante de desaparecimento de glicose, sendo uma medida da sensibilidade à insulina; valores maiores indicam maior sensibilidade tecidual à insulina. Neste cálculo houve diferença estatística entre o grupo PV3 com os demais grupos experimentais, mostrando que o PV3 é sensível à insulina em animais normoglicêmicos. A ausência de resposta do grupo HFD+PV3 comparado com o grupo controle na AUC de TTI e TTKi é um indicativo de que este grupo mesmo recebendo uma dieta hiperlipídica não desenvolveu o quadro de resistência à insulina, o que nos mostra que o PV3 é capaz de prevenir a resistência à insulina. (Figura 34 painéis B e C).

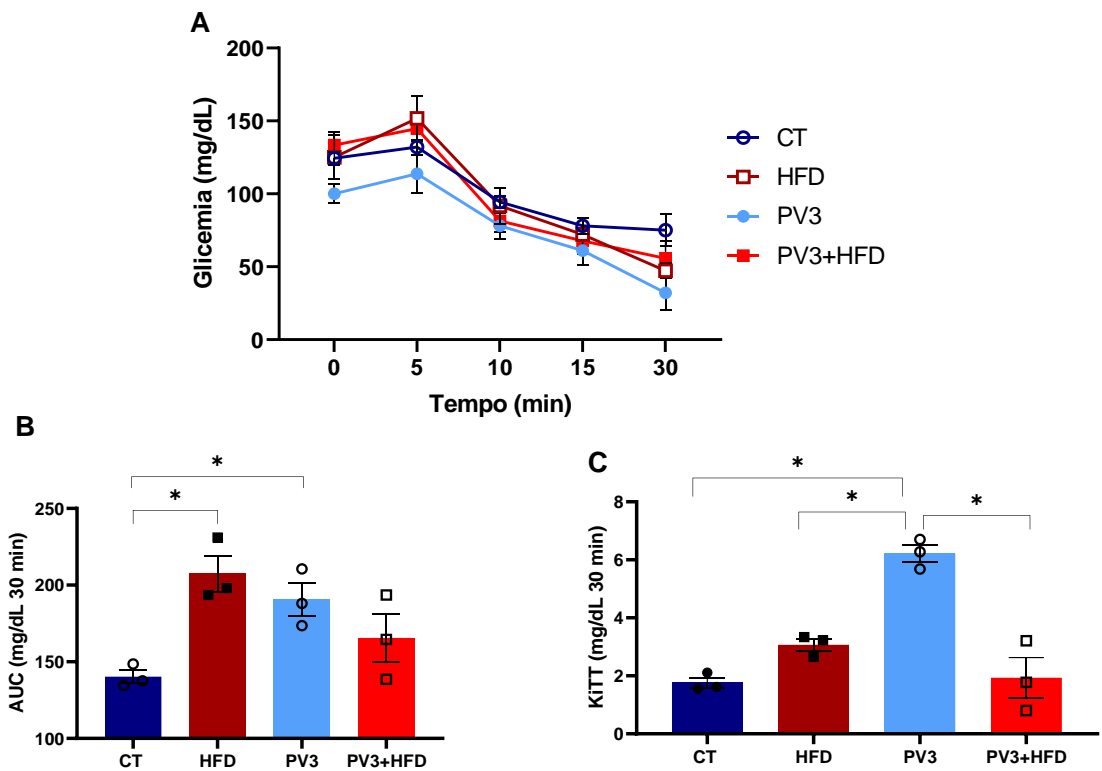


Figura 34: Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento no teste de tolerância à insulina (TTI). Em A, se refere a curva dos níveis de glicose do TTI ao longo de 30 minutos. Em B, se refere à área sob a curva dos níveis de glicose do TTI. Em C se refere aos valores da taxa de decaimento dos níveis de glicose após a injeção de insulina. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=3). * $p < 0,05$, Teste Anova Two-Way, seguido de pós teste de Tukey.

Foi feito o teste de tolerância ao piruvato para avaliar o grau de sensibilidade hepática à insulina do PV3. Ao realizar o TTP, observamos que não houve diferença significativa entre os grupos analisados. Portanto o PV3 não interferiu estatisticamente na tolerância ao piruvato (Figura 35 painéis A e B).

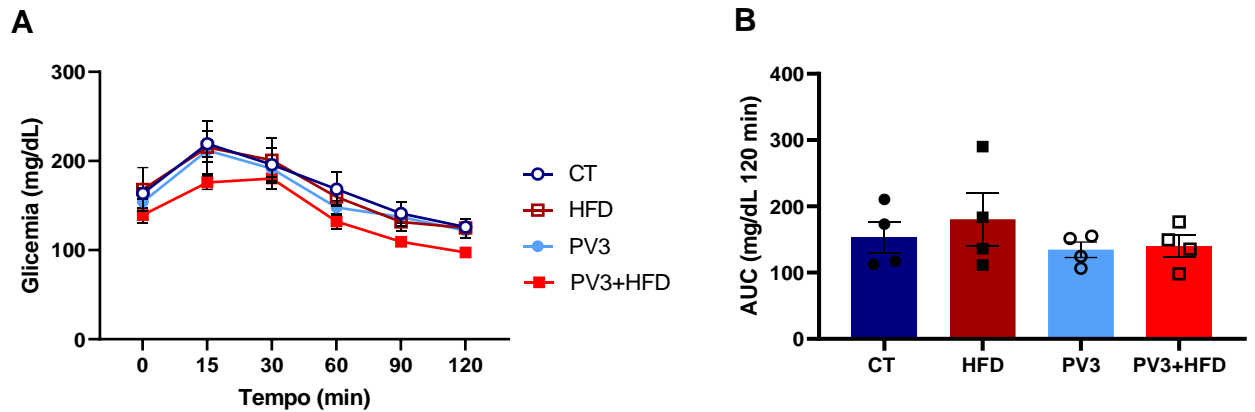


Figura 35: Influência da ingestão de PV3 por pseudogavagem por 10 semanas de tratamento no teste de tolerância ao piruvato (TTP). Em A, se refere a curva dos níveis de glicose no teste de TTP ao longo de 120 minutos. Em B, se refere à área sob a curva dos níveis de glicose do teste de TTP. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=3). * $p < 0,05$, Teste Anova Two-Way, seguido de pós teste de Tukey.

A tabela abaixo resume todos os valores da área sob a curva de cada teste de tolerância, TTG, TTI e TTP, e KTTI dos grupos tratados.

Tabela 6: Resumo da área sob a curva (AUC) dos testes TTG, TTI e TTP, e KTTI entre os grupos analisados.

	AUC TTG	AUC TTI	KTTI	AUC TTP
<i>CT</i>	337 \pm 40,9	79,3 \pm 28,8	1,76 \pm 0,3	153,2 \pm 47,1
<i>HFD</i>	446,2 \pm 39,3 *	139,6 \pm 44,7 *	3,07 \pm 0,4	180,3 \pm 79,0
<i>PV3</i>	340,3 \pm 23,4 *	97,5 \pm 4,0*	6,21 \pm 0,5*	134,5 \pm 23,1
<i>HFD+PV3</i>	354,6 \pm 22,6 *	126,8 \pm 11,8	1,9 \pm 1,2	140,0 \pm 32,6

Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=3). * $p < 0,05$, Teste Anova Two-Way, seguido de pós teste de Tukey.

6.6.6 AVALIAÇÃO DA VIA DA INSULINA POR WESTERN BLOTTING APÓS 10 SEMANAS DE INGESTÃO DE PV3

Após a confirmação da influência do PV3 na glicemia dos camundongos, surge a necessidade de investigar as vias de sinalização da insulina. Deste modo investigamos expressão de proteínas e enzimas importantes na via de regulação da insulina e da glicose, foi feito a expressão do IRS, PI3K, PEPCK e G6Pase. Desse modo, foi observado que o PV3 aumentou a expressão de IRS nos grupos que receberam a dieta padrão e a dieta hiperlipídica (Figura 36 painéis A e C). No grupo

que recebeu a dieta padrão juntamente com o PV3, tiveram a expressão de G6Pase e PEPCK aumentada quando comparado com o grupo controle (Figura 36 painéis B, D, F e H), este aumento pode ser reflexo do efeito hipoglicêmico do PV3 confirmado no TTG, onde os níveis de glicose foram baixos o suficiente para estimular a via gliconeogênese. Foi observado ainda que o grupo HFD também teve o aumento da expressão de PEPCK, este aumento confirma o quadro de resistência à insulina que este grupo apresenta (Figura 36 painéis F e H). Em relação a PI3K não houve diferença significativa (figura 36 painéis E e G).

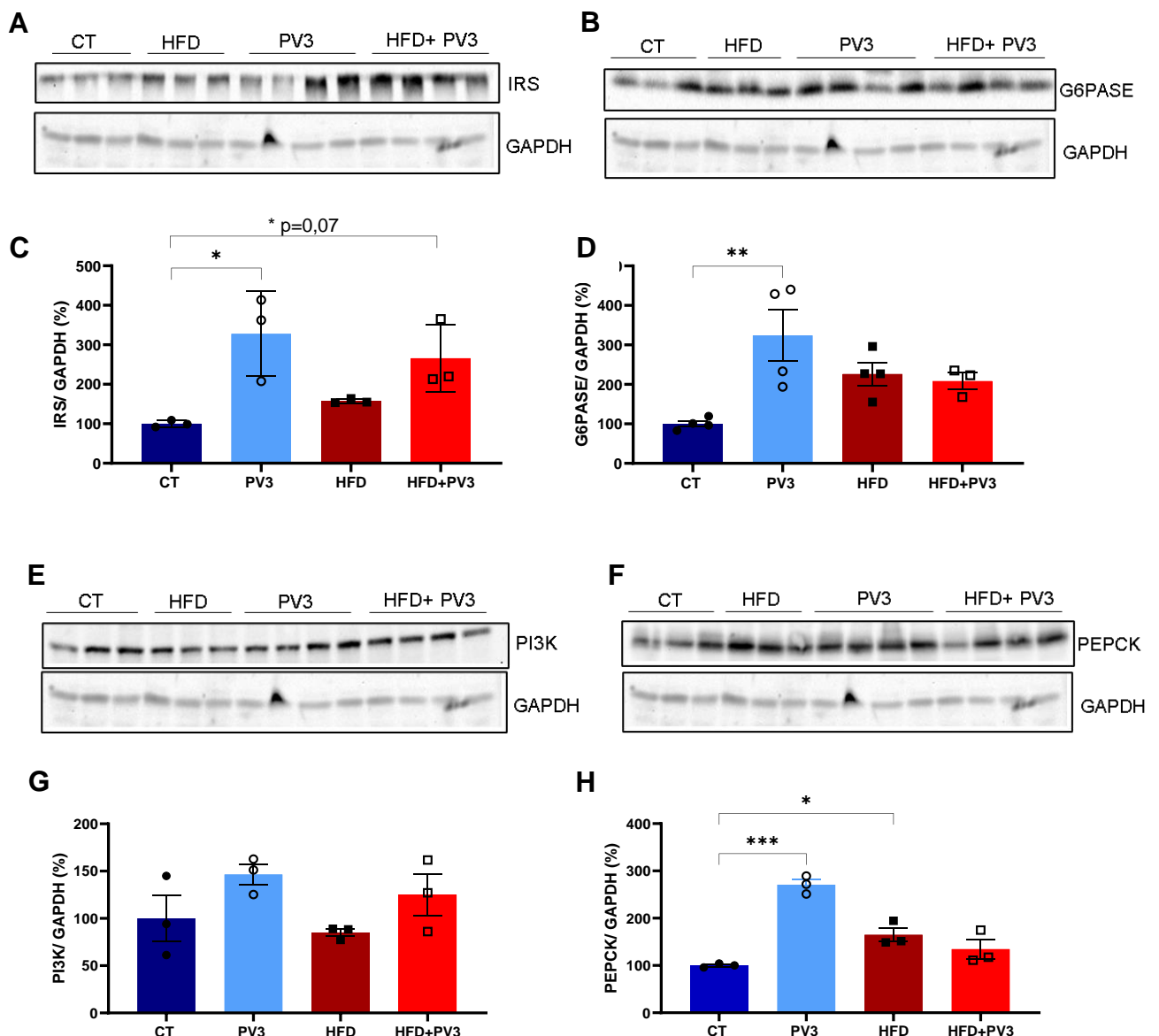
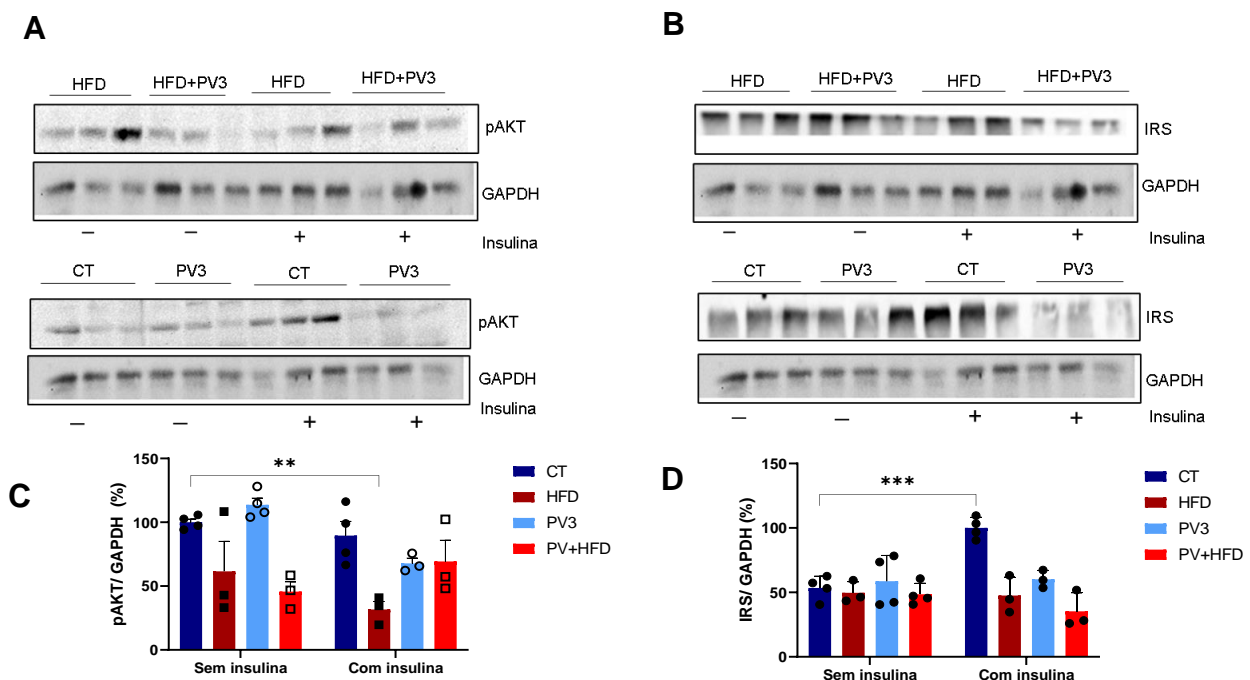


Figura 36: Efeitos da ingestão de PV3 na sinalização de insulina. Análise representativa de Western blot de proteína conteúdo de IRS, G6Pase, PI3K e PEPCK no fígado. Para o controle da carga de gel, foi feita a razão com GAPDH. Os dados foram obtidos no final de um período experimental de 10

semanas para camundongos C57 alimentados com dieta padrão regular (CT) e rica em gordura (HFD) e comparados com os de camundongos alimentados com dieta HF e ingestão por pseudogavagem de PV3 e com dieta padrão e ingestão por pseudogavagem de PV3. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=4-3). Teste Anova Two-Way, seguido por pós teste Tukey. *P < 0,05.

Ainda utilizando o fígado desses animais, uma pequena porção foi avaliada após o estímulo *ex vivo* de insulina, neste teste foi verificada a expressão de pAKT, IRS, G6Pase e PEPCK. Após a análise foi avaliado que o PV3 não alterou a expressão das proteínas testadas sem e com o estímulo de insulina (Figura 37). Na análise da expressão de pAKT no grupo HFD após o estímulo, a expressão dessa proteína estava diminuída, ressaltando a diminuição da sensibilidade da insulina nestes animais (Figura 37 painéis A e C). Ao avaliar o grupo HFD com estímulo de insulina, observou-se que a expressão de pAKT também estava reduzida quando comparado com o grupo controle sem insulina, este resultado é em virtude da dieta hiperlipídica que reduz a sensibilidade à insulina (Figura 37, painéis A e C). Em relação às proteínas IRS e PEPCK não houve diferença estatística entre os grupos testados (Figura 37, painéis B, D, F e H). E na análise da expressão de G6PASE, foi observado que no grupo PV3 aumentou a expressão após o estímulo com insulina (Figura 37, painéis E e G).



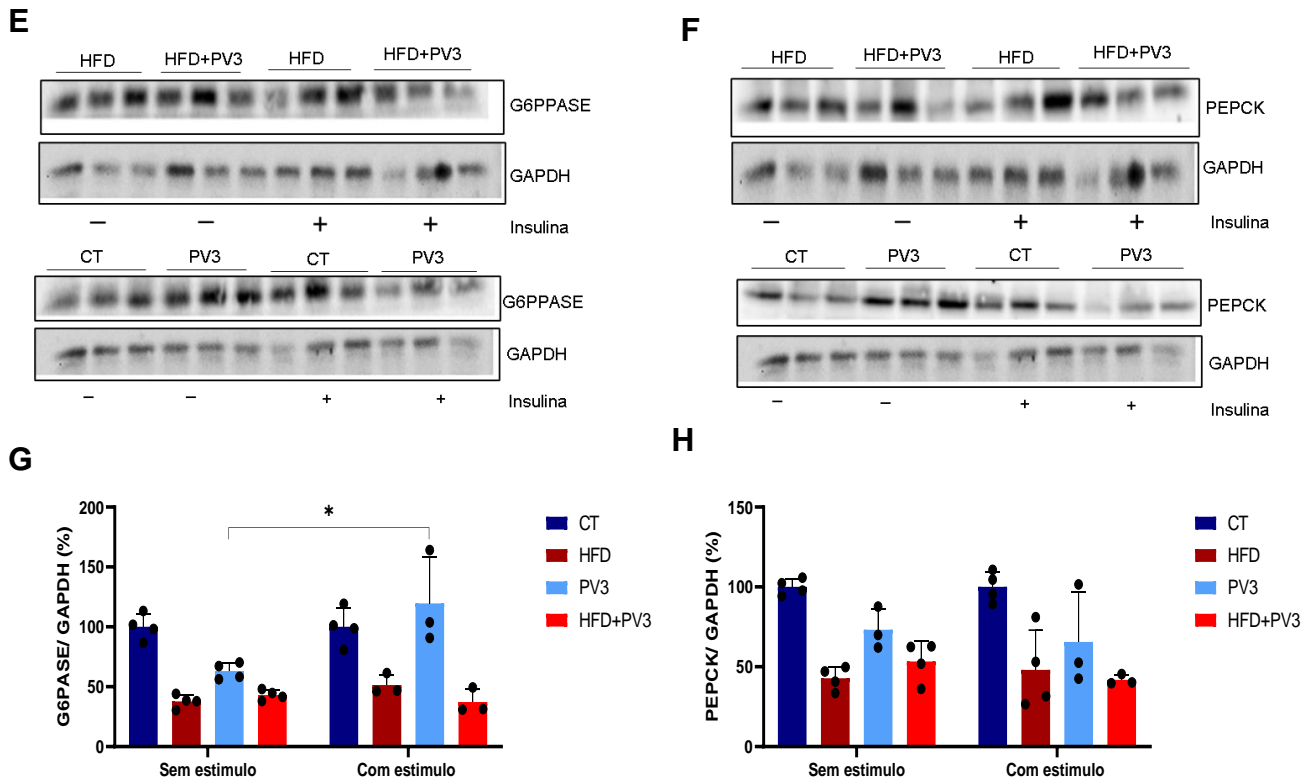


Figura 37: Efeitos de ingestão de PV3 na sinalização de insulina. Análise de expressão proteica de pAKT, IRS, G6Pase e PEPCK no fígado após estímulo de soro ou insulina regular (10 μ M) em meio de cultura *ex vivo*. Para o controle da carga de gel, as membranas foram normalizadas para GAPDH. Os dados foram obtidos no final de um período experimental de 10 semanas para camundongos C57 alimentados com dieta padrão regular (CT) e rica em gordura (HFD) e comparados com os de camundongos alimentados com dieta HFD e ingestão de PV3 e dieta padrão e ingestão de PV3. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=4-3). Teste Anova Two-way, seguido de pós teste de Tukey. *P < 0,05.

6.6.7 AVALIAÇÃO DA VIA DA INSULINA POR RT- QPCR APÓS 10 SEMANAS DE INGESTÃO DE PV3

Neste estudo foi feita análise de RT-qPCR para verificar a influência do PV3 em genes específicos da via de insulina. Deste modo, observou que os grupos que receberam a ingestão de PV3 aumentaram a expressão gênica de IRS, ainda neste parâmetro o PV3 aumentou a expressão gênica de AKT, Pi3K, PTN, PCK1 e PRKAA2 no grupo HFD+PV3 (figura 38). Adicionalmente foi feito um teste para avaliar a expressão gênica em fígado estimulado com insulina, neste teste foi observado que a expressão gênica de G6PC estava aumentado após o estímulo de insulina no grupo HFD+PV3, e no mesmo grupo a expressão gênica de PCK foi diminuída após o estímulo com insulina (Figura 39 painel C).

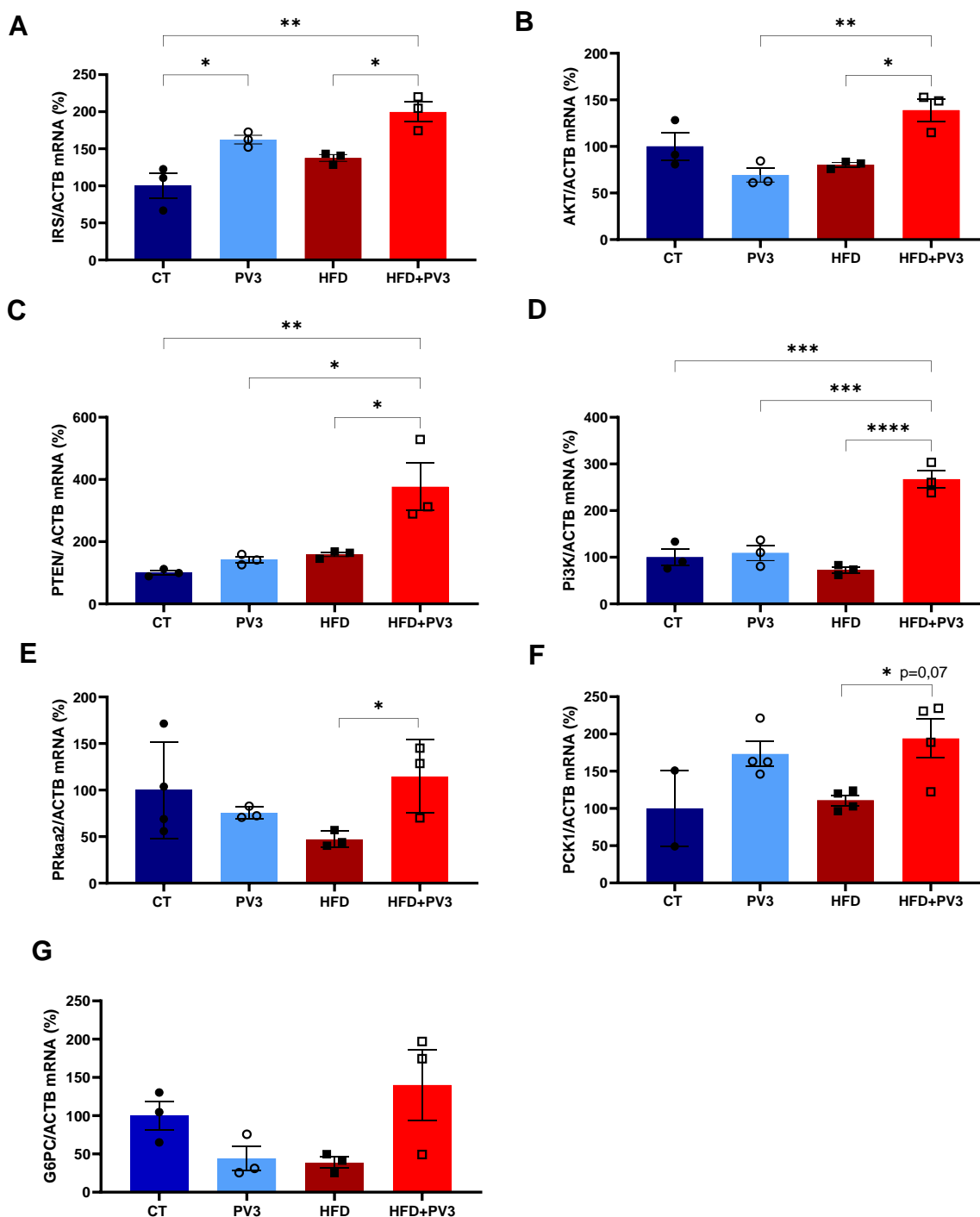


Figura 38: Efeitos de ingestão de PV3 na sinalização de insulina. Análise representativa de RT-qPCR de genes expressos IRS, AKT, G6PC, PI3K, PTEN, PRKAA2 e PCK1 no fígado. No qPCR utilizou ACTB como padrão de normalização. Os dados foram obtidos no final de um período experimental de 10 semanas para camundongos C57 alimentados com dieta padrão regular (CT) e rica em gordura (HFD) e comparados com os de camundongos alimentados com dieta HFD e ingestão de PV3 e dieta padrão e ingestão de PV3. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=4-3). Teste Anova Two-way, *P < 0,05; seguido de pós teste de Tukey, *P < 0,05.

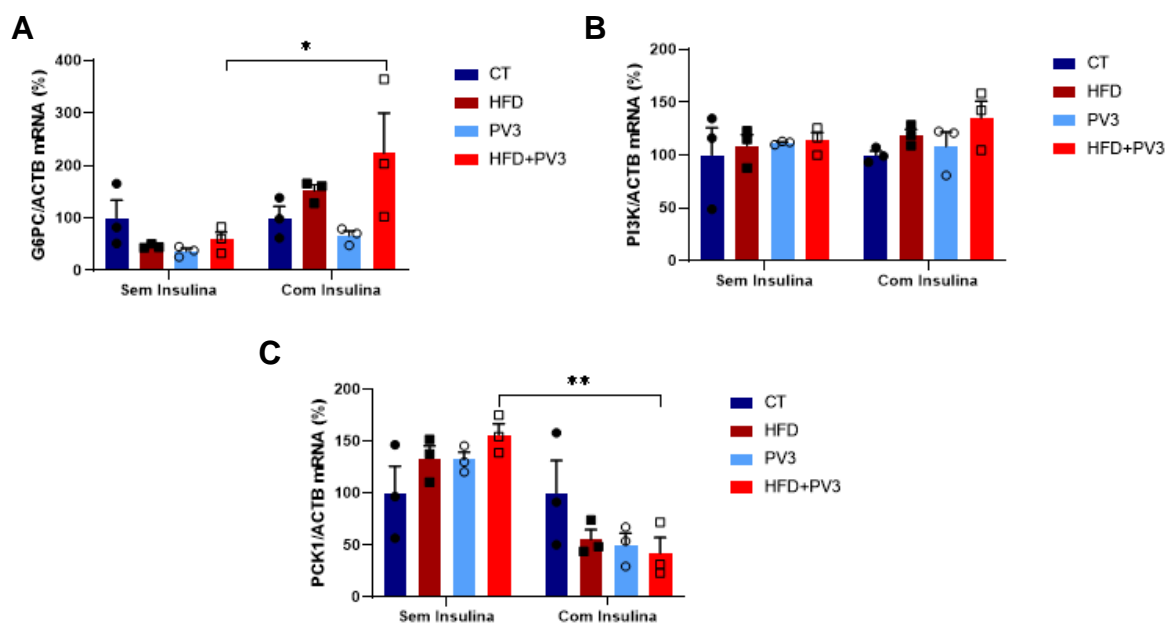


Figura 39: Efeitos de ingestão de PV3 na sinalização de insulina. Análise representativa de RT-qPCR de genes expressos G6PC, PI3K e PCK1 no fígado após estímulo de soro ou insulina regular (10 UI) em meio de cultura *ex vivo*. No qPCR utilizou ACTB como padrão de normalização. Os dados foram obtidos no final de um período experimental de 10 semanas para camundongos C57 alimentados com dieta padrão regular (CT) e rica em gordura (HFD) e comparados com os de camundongos alimentados com dieta HFD e ingestão de PV3 e dieta padrão e ingestão de PV3. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=4-3). Teste Anova Two-way, seguido de pós teste de Tukey. *P < 0,05.

6.6.8 AVALIAÇÃO DE VIAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO POR RT- QPCR APÓS 10 SEMANAS DE INGESTÃO DE PV3

O hipotálamo é um dos centros regulatórios do controle do gasto energético e consumo alimentar, nele estão contidos neuropeptídeos que regulam a saciedade e o gasto energético, como neuropeptídeos pró-opiomelanocortina (POMC) e cocaína e anfetaminas (CART) que apresentam ação anorexígenos e o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada agouti (AgRP) que apresentam ação orexígenos e PRKAA2 hipotalâmica atua na regulação do balanço energético e na ingestão de alimentos. Deste modo foi avaliado os níveis de mRNA dos neuropeptídeos POMC, CART, NPY, AgRP e PRKAA2. Neste estudo, foi avaliado que o PV3 aumentou os níveis de mRNA de POMC no grupo HFD+PV3 (Fig. 40 painel A), o que contribui para o aumento do gasto energético, comprovando o resultado do peso, em que este grupo teve redução no ganho de massa comparado com o grupo HFD. E observamos ainda que o PV3 aumento os níveis de mRNA de AGRP e diminuiu os níveis de mRNA de NPY nos grupos HFD+PV3 (Fig. 40 painel C e D), que são genes responsáveis pelo aumento

da ingestão de alimentos e diminuição do gasto energético. Por mais que o AGRP e o NPY atuam com as mesmas respostas na maioria dos casos, pode acontecer de terem modulação mais alta do que outro (103), conforme os nossos achados, este fato pode ser explicado pelo fato do NPY ser co-expresso pelo AGRP. Outro achado do nosso estudo foi o aumento dos níveis de mRNA de PRKAA2 no grupo PV3 (Fig. 40 painel E), o que pode contribuir com o aumento do gasto energético neste grupo.

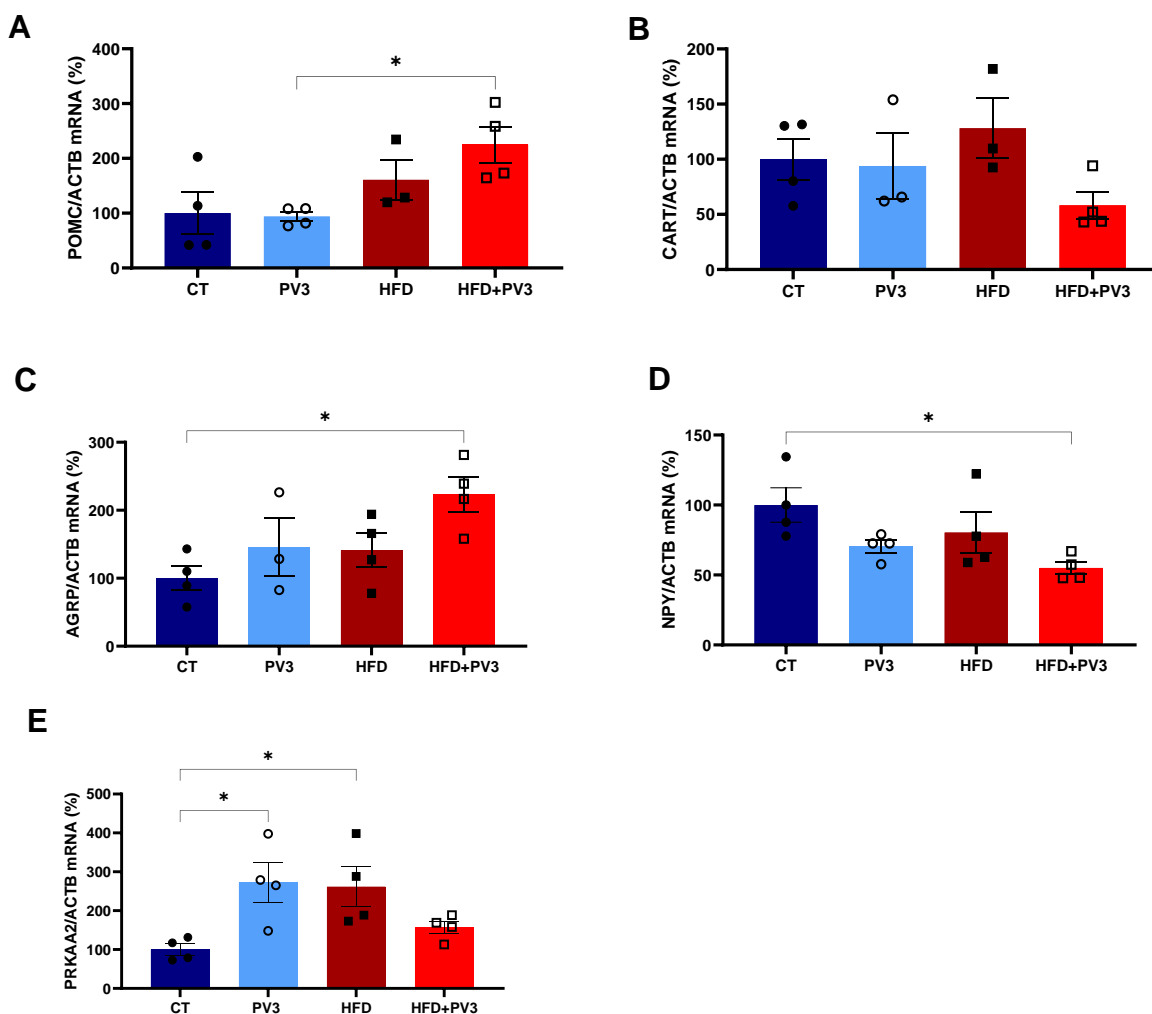


Figura 40: Efeitos de ingestão de PV3 no metabolismo energético. Análise representativa de RT-qPCR de genes expressos POMC, AGRP, CART, NPY e PRKAA2 no hipotálamo. No qPCR utilizou ACTB como padrão de normalização. Os dados foram obtidos no final de um período experimental de 10 semanas para camundongos C57 alimentados com dieta padrão regular (CT) e rica em gordura (HFD) e comparados com os de camundongos alimentados com dieta HFD e ingestão de PV3 e dieta padrão e ingestão de PV3. Os valores estão expressos como média \pm EPM (n=4-3). Teste Anova Two-way, *P < 0,05; seguido de pós teste de Tukey.

7. DISCUSSÃO

Os principais resultados deste estudo são: I) O conteúdo de PV3 apresenta um grau de homologia de sua estrutura primária com diversas sequências de aminoácidos descritos na literatura que apresentam atividade anti-hipertensiva, II) PV3 possui baixa osmolaridade, III) PV3 provocou efeito relaxante dependente do endotélio e de vias oxidonitrérgicas; IV) PV3 causou efeito natriurético; V) PV3 melhorou os níveis de ácido úrico em SHR, VI) PV3 causou efeito hipotensor concomitante à redução na resistência vascular nos leitos vasculares aórtico e renal; VII) PV3 reduziu a adiposidade em animais que receberam a dieta hiperlipídica; VIII) PV3 tem efeito hipoglicemiante e anti-hiperglicemiante; IX) PV3 preveniu a resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica, X) PV3 aumentou a sensibilidade a respostas da insulina provavelmente através da superexpressão e atividade do receptor para insulina.

7.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

As proteínas e os peptídeos apresentam uma sequência de aminoácidos única que confere uma determinada estrutura tridimensional, e conseqüentemente favorece a sua função biológica (15,26,35). Segundo Nelson e Cox (12), a comparação de proteínas e peptídeos funcionalmente semelhantes de diferentes espécies pode indicar a presença de sequências de aminoácidos semelhantes, conservadas ao longo da evolução. Deste modo, há uma ligação íntima entre a estrutura primária da proteína e sua função.

As homologias entre os dipeptídeos e peptídeos encontradas neste trabalho com aqueles já relatados na literatura é extremamente importante para auxiliar na elucidação dos efeitos associados ao PV3, especialmente no que se refere ao entendimento dos mecanismos fisiológicos associados ao efeito hipotensor apresentado por essa fração, bem como na busca de mecanismos adicionais potencialmente envolvidos nesses efeitos.

Como relatado por Nakahara e colaboradores (2010) os dipeptídeos GW, AY, SY, GY e VG apresentaram efeito hipotensor via inibição da ECA, sendo observados valores de IC50 (Concentração inibitória referente à mínima concentração necessária do peptídeo para inibir 50% de uma determinada atividade enzimática) variando entre

30 µg/mL (para o peptídeo GW) e 1100 µg/mL para o VG. Essa efetividade variada de inibição da ECA foi relacionada à composição de aminoácidos da sequência, e está intimamente associada à presença de aminoácidos com grupos hidrofóbicos nas cadeias laterais. É possível, portanto, que essas sequências dipeptídicas presentes nos peptídeos NKFYGWR, QAAYFGWR, SYLQGFSK, WLGYYAVSVLLR, RPMTVGYK, TSLVGEEEESQDR, RPMTVGYK e LVGGELHDVPK, possam contribuir para uma possível atividade hipotensora dessas moléculas.

Os autores Sato e colaboradores (2002) e Suetsuna e colaboradores (2004) demonstraram que os dipeptídeos FY e KY possuem efeito de inibição sobre a atividade da ECA. Os autores Sato e colaboradores (2002) compararam os efeitos obtidos na administração do peptídeo FY e do medicamento anti-hipertensivo captopril em animais SHR na dose de 1 mg/kg. Eles observaram que o dipeptídeo FY obteve um efeito hipotensor maior que o captopril após 9 horas de administração. A redução observada na administração do dipeptídeo FY foi de 15,7 mmHg e do captopril foi de 13,8 mmHg. Deste modo os peptídeos NKFYGWR e NKYFGWR podem apresentar efeito hipotensor por conter regiões cruciais para a inibição.

Os dipeptídeos AF, AY, SF e GF estão presentes nas sequências GFVLELR, VAAFALVPVKGADR, TAFNAAVNSK, QAAYFGWR, LHVFSFDHEQRR e, SYLQGFASK. De acordo com Zhu e colaboradores (2008), o dipeptídeo AF extraído do molho de soja exibiu atividade inibitória da ECA, com valor de IC₅₀ de 165 µmol/L. Por outro lado, Tagliazucchi e colaboradores (2015) trabalhando com o dipeptídeo AF derivado de feijão comum, observaram valores de IC₅₀ igual a 190 µmol/L. Os mesmos autores encontraram valores de IC₅₀ de 130 e 630 µmol/L para as sequências SF e GF, respectivamente. Além disso, os resultados obtidos no trabalho de Yang e colaboradores (2007) evidenciaram uma redução da pressão sanguínea sistólica de 9,5 mmHg após 2 e 4 horas da administração oral do dipeptídeo AY.

Outro dipeptídeo que possui atividade inibitória sobre a ECA é o dipeptídeo DY, observado na sequência DYGAELPPR, homólogo às sequências relatadas por Liu e colaboradores (2013) e Wu e Ding (2002). Esses autores avaliaram o potencial inibitório desse dipeptídeo por meio de determinação do IC₅₀, sendo observado valores de IC₅₀ igual a 32,31 ± 3,09 µg/mL no trabalho de Liu e colaboradores (2013) e 29,6 µg/mL no trabalho de Wu e Ding (2002). De acordo com Yokoyama e

colaboradores (1992) , o dipeptídeo DY é o centro inibidor da ECA na sequência peptídica DYGLY obtida do músculo do peixe bonito (*Katsuwonus pelamis*), e essa mesma sequência foi conservada após a digestão com termolisina, onde o DY continuou tendo seu efeito hipotensor.

Segundo Sánchez-Rivera e colaboradores (2016), os peptídeos de cadeia longa podem ser hidrolisados tanto no trato gastrointestinal por proteases, quanto no sangue por peptidases plasmáticas, resultando em fragmentos menores com atividade hipotensora por meio de efeitos sinérgicos. Para confirmar a sua hipótese, estes autores administraram oralmente um peptídeo precursor (HLPLP) em ratos da linhagem SHR. O peptídeo foi hidrolisado por enzimas digestivas e obteve os seguintes fragmentos: HLPL, LPLP, HLP, PLP e LPL. A administração do peptídeo precursor reduziu a pressão sanguínea sistólica e os autores observaram que o fragmento PLP, apresentou um efeito redutor mais duradouro, sendo observada redução de $21,2 \pm 3,4$ mmHg após 8h de administração do composto. O tripeptídeo PLP é homólogo ao tripeptídeo encriptado dentro da sequência DPLPDKNR do extrato PV3. Deste modo, o peptídeo DPLPDKNR encontrado no extrato PV3 pode apresentar atividade anti-hipertensiva após ser hidrolisado na corrente sanguínea ou trato gastrointestinal. É possível que uma vez hidrolisados, estes peptídeos encriptados se liberem do impedimento estérico ocasionado pelos aminoácidos adjacentes e fiquem com os sítios de interação disponíveis para se ligar a receptores de membrana e outras enzimas (3).

A partir do sequenciamento do PV3 feito por Graziani e colaboradores (2019), foram obtidos tripeptídeos e peptídeos homólogos a outras sequências relatadas na literatura, tais como as sequências encriptadas GPP, LSP, KFYG, GLP e PLL presentes nos peptídeos DFSETSGPPGSDK, DPGPPPGETPR, QDSSLSPPEPTAGK, MNGPLLRL, VLSPNRGDGLK, NKFYGWRL e QHAEGLPDPQQR. Esses peptídeos também estão relacionados com diferentes mecanismos de atividade anti-hipertensiva. Ma e colaboradores (2006) trabalhando com peptídeos de Trigo-Sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), observaram que o tripeptídeo GPP apresenta atividade inibitória de ECA, com valores de IC₅₀ de 6,25 µg de proteína/mL. Puchalska e colaboradores (2012) avaliaram a sequência LSP quanto a capacidade de reduzir a pressão arterial diastólica, e seus resultados evidenciaram uma redução de 5 mmHg na PA. Por outro lado, Suetsuna e colaboradores (2000)

observaram que a sequência KFYG foi capaz de reduzir 40-50 mmHg na pressão arterial sistólica. A sequência GLP encontrada pelos autores Lee e colaboradores (2014) resultou em uma inibição da ECA de IC_{50} 9.08 M.

Além disso, Tagliazucchi e colaboradores (2015) evidenciaram que o tripeptídeo PLL derivado de feijão comum apresentou boa capacidade de inibição da ECA, com IC_{50} igual a 337 $\mu\text{mol/L}$. De modo geral, para que um tripeptídeo tenha capacidade inibitória da ECA e efeito na redução da pressão arterial, é necessário que a sua sequência peptídica seja composta por aminoácidos aromáticos na região C terminal, um resíduo carregado positivamente na região intermediária e um resíduo hidrofóbico na região N terminal (13,14,43,90,92,95,99,104).

Levando em consideração as características essenciais para que um peptídeo possa apresentar atividade anti-hipertensiva, os peptídeos presentes na fração PV3 (35) são bons candidatos para o controle de doenças cardiovasculares.

7.2 OSMOLARIDADE E TEOR DE SÓDIO [Na⁺] E POTÁSSIO [K⁺] DO PV3

A osmolaridade foi medida para excluir a possibilidade de que a hipertonidade interferisse nos efeitos do PV3. Descobrimos que o PV3 é hipoosmótico, diminuindo assim as chances de um possível fluido hiperosmótico estar subjacente aos efeitos que, de fato, dependem apenas do conteúdo peptidérgico do PV3. Wang afirmou que as soluções a serem injetadas por via intramuscular ou subcutânea devem apresentar uma osmolaridade abaixo de 600 mOsm kg^{-1} e para injeções intravenosas, deve estar abaixo de 1000 mOsm kg^{-1} (106). Nesse sentido, as doses e concentrações de PV3 estão dentro da faixa recomendada, pois 1 mg mL^{-1} de PV3 contém 180 mOsm L^{-1} . Outro fator relacionado à tonicidade do PV3 foi o teor de sódio e potássio: os valores de sódio e potássio no PV3 (1mg mL^{-1}) foram 251,9 e 69,6 mmol L^{-1} , respectivamente, que ainda são considerados dentro da faixa isotônica (107).

7.3 EFEITO DO PV3 NA VASOATIVIDADE DE ARTÉRIA RENAL

A pressão arterial e o tônus vascular são determinados pelo estado contrátil das células do músculo liso que compõem a estrutura vascular (45). O músculo liso vascular é composto por uma monocamada de células endoteliais, que por sua vez

formam o endotélio vascular (108). O endotélio exerce papel na regulação do tônus vascular ou estado contrátil, tem função plaquetária, auxilia na coagulação e na adesão de monócitos. Além disso, atua em vasos de resistência por liberar fatores de relaxamento denominados de EDRFs (*Endothelium derived relaxing factors*), que compreendem o NO, prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (74); e podem liberar fatores de contração do endotélio conhecidos como EDCFs (*Endothelium derived contractile factors*) e a endotelina (109).

Sabendo destes conceitos, nossos estudos mostraram a capacidade do PV3 de promover um efeito relaxante na artéria renal, ampliando o conhecimento relatado por (35), que investigaram características semelhantes na aorta. Sabe-se que aumentos de pressão e tensão de cisalhamento na microvasculatura levam ao envelhecimento vascular prematuro e diminuem o potencial de moléculas relaxantes liberadas do endotélio (45,75,110). Ainda neste mesmo estudo de Graziani e colaboradores (2019) mostrou efeitos oxidonitrérgicos do PV3 em células endoteliais, o que amplia nossos dados atuais mostrando que o PV3 dilata os leitos renais e este depende de vias dependentes do NO endotelial, revelando assim o mecanismo vascular através qual o PV3 está atingindo efeitos cardiovasculares e renais. Outros autores também evidenciaram os mesmos efeitos em outros peptídeos de origem alimentar, como Shobako e colaboradores (2019) que testaram o tripeptídeo LAR advindo do arroz, em anéis da artéria mesentérica, sendo possível observar que o tripeptídeo induziu relaxamento acima de 50%. Ao avaliar o mecanismo de ação foi identificado que o LAR induziu o efeito vasorelaxante dependente do endotélio pela via oxidonitrérgica. Senejoux e colaboradores (2012), trabalhando com peptídeos extraídos de esguicho-do-mar (*Styela clava*), uma comida marinha da Coreia, também relataram efeito vasorelaxante dependente de endotélio e associado à via NOS.

Além dos efeitos encontrados no vaso sanguíneo, não se pode negligenciar que os efeitos antioxidantes do PV3 podem contribuir para proteger contra o envelhecimento vascular acelerado que está presente durante a hipertensão (19,75,111). No entanto, estudos adicionais tentando tratamentos crônicos são necessários para desvendar se o PV3 é angioprotetor.

Partindo da premissa de que o vasorelaxamento pode ser uma medida da função vascular dependente do endotélio (45), foi avaliado o efeito vasoativo do PV3 na artéria renal com endotélio preservado. Os resultados mostraram que o PV3 induziu a dilatação da artéria renal em WT e SHR; entretanto, a magnitude desse

efeito foi significativamente atenuada em SHR. É necessário ter em mente que o SHR é um modelo experimental de hipertensão relacionada à disfunção endotelial (75,112). O vasorelaxamento evocado por PV3 foi confinado a anéis arteriais com endotélio preservado e isso exclui o envolvimento de outras vias além daquelas dependentes do endotélio e de alvos primários expressos nas camadas de músculo liso vascular subendotelial. Portanto, esses efeitos sustentam a proposta do PV3 como terapia alternativa para melhorar a função vascular, com efeitos circulatórios positivos que vão muito além daqueles que envolvem a dinâmica de manuseio de fluidos e pressão.

7.4 EFEITO DO PV3 SOBRE A FUNÇÃO RENAL

Os resultados de pressão arterial sistólica em SHR estão condizentes com os diversos dados da literatura, desde a década de 1980, onde há relatos de que SHR apresentaram pressão arterial sistólica de 200 mmHg já na sexta semana de vida (113). Nesse sentido, os resultados hemodinâmicos obtidos nessa linhagem podem ser classificados como anti-hipertensivos.

Para estudar a função renal é necessário avaliar os aspectos que envolvem a formação da urina e os níveis de moléculas e eletrólitos que são excretados, sendo possível avaliar se o rim sofreu ou não uma lesão que possa comprometer a sua função. No presente estudo, observamos que a administração aguda de PV3 não provocou alteração em nenhum parâmetro que sugerisse nefrotoxicidade, como por exemplo, proteínas totais urinárias e proteínas totais plasmáticas, o que encoraja a condução de estudos futuros com sua administração crônica.

O PV3 na dose de 5mg/kg afetou a ingestão alimentar dos SHR. Esse achado é semelhante ao encontrado por Marczak e colaboradores (2006), que relataram que os peptídeos de canola hidrolisados administrados por via oral reduziram a ingestão de alimentos em camundongos por meio de mecanismos do sistema de colecistocinina (CCK). Outro relatório mostra que os peptídeos de soja apresentam efeitos semelhantes. Esses peptídeos são chamados de morfina de soja e apresentam atividades ansiolíticas e anorexígenas provavelmente por atuarem em receptores μ -opiídeos (115). A redução do comportamento alimentar causado pelo PV3 também pode ser derivada da presença de peptídeos que atuam como inibidores enzimáticos. Os inibidores de protease (ou seja, inibidores de tripsina/quimotripsina) provavelmente retardam o processo de digestão e aumentam os hormônios sacietogênicos (ou seja,

CCK), o que reduz a ingestão de alimentos (116). Ao analisar a quantidade de fezes dos animais, não houve diferenças nos grupos testados.

Quando a osmolaridade do fluido corporal está aumentada ou o volume ou pressão sanguínea estão reduzidos, o indivíduo percebe a sede ingerindo maior quantidade de água, tendo uma resposta dipsogênica maior (47). Considerando-se a importância da avaliação do efeito da administração do PV3 na ingestão de água, foi avaliado o volume de água ingerido, e os resultados obtidos permitiram inferir que não houve diferença entre os grupos experimentais e as linhagens WT e SHR, o que se pode concluir que o PV3 não interfere na osmolaridade plasmática (Figura 6).

A formação e composição da urina são parâmetros importantes para se avaliar a função renal. O rim é o órgão responsável pela formação de urina, e para que ela seja formada é necessário que ocorram 4 processos básicos: ultrafiltração do plasma pelo glomérulo, reabsorção de água e soluto, secreção de solutos selecionados pelo fluido tubular e, por fim a excreção (eliminação do fluido em forma de urina para fora do corpo) (45,46,64). O volume de diurese é influenciado pela variação da ingestão hídrica devido às mudanças de temperatura, umidade, estado de saúde e atividade sexual (117). A determinação do volume urinário é um importante parâmetro dentro da função renal para avaliar o fluxo urinário no decorrer de 24 horas (45). Ao analisar o volume urinário calculado pelo peso do animal, podemos observar que houve aumento no grupo WT nas doses de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2,5 \text{mg mL}^{-1}$. Este resultado pode ser em consequência ao aumento de excreção de sódio e potássio, achados da literatura afirmam que moléculas de potássio arrastam moléculas de água durante o processo de transporte passivo nas células renais no momento de reabsorção, secreção e excreção (45).

Eletrólitos tais como sódio e potássio são importantes para o controle do volume sanguíneo e controle dos batimentos cardíacos, para equilibrar a pressão sanguínea (46). O rim controla a pressão arterial através do mecanismo de natriurese pressórica, quando se tem pressão alta, o excesso de sódio e água é eliminado pela urina até que a pressão se restabeleça ao equilíbrio; e o oposto acontece também, em pressão baixa há a retenção de sódio e água, até restabelecer a pressão (45,46). Deste modo, é essencial que os níveis de sódio e potássio estejam em homeostase no plasma e na urina.

A linhagem SHR desenvolve hipertensão e danos em órgãos-alvo, principalmente nos rins (118,119). Apresentam também retenção exagerada de sal e

água devido à redução tanto da taxa de filtração glomerular (TFG) quanto da excreção urinária de sódio que pode ser causada por anormalidades em diversos mecanismos de transporte, principalmente os existentes no túbulo proximal (58,58,119). Neste estudo, enquanto o PV3 aumentou a excreção de Na^+ na linhagem hipertensa injetada com todas as doses, a excreção de potássio foi alterada apenas nos animais injetados com PV3 na dose de $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Esse achado é positivo para o tratamento da hipertensão, pois o manuseio de íons pode contribuir para a tonicidade do fluido e o volume intravascular; a última é variável, determinando diretamente a pressão. O PV3 pode interferir na atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase, no entanto, isso ainda precisa ser confirmado em estudos posteriores.

A depuração de creatinina reflete virtualmente a TFG (45). Observamos que a TFG estava aumentada em WT e SHR tratados com PV3. Nossos resultados também mostram que o PV3 aumentou a condutância vascular na artéria renal. Em conjunto, esses achados são evidências consistentes de que o PV3 é capaz de aumentar a filtração por meio de mecanismos dilatadores renovasculares. Essa combinação permite inferir que os efeitos do PV3 sobre a pressão resultam da redução do volume intravascular e de efeitos diretos sobre a vasomotricidade. Novamente, esses efeitos positivos elevam o PV3 como um potencial nutracêutico capaz de tratar doenças cardiovasculares nas quais nefropatias estão presentes

Os rins também controlam os níveis de ureia. A ureia é um metabólito derivado da amônia que é produzida no ciclo da ureia. A sua produção ocorre quase exclusivamente no fígado, sendo o destino da maior parte da amônia canalizada para esse órgão. A ureia é transportada pela corrente sanguínea até os rins, sendo excretada na urina. A ureia tem grande função no transporte de contracorrente ao longo da Alça de Henle, auxiliando no transporte de moléculas (46,61). Os resultados obtidos na análise de uréia plasmática (Figura 17) evidenciaram que teve diminuição dos níveis de uréia plasmática em WT na dose de $9,5 \mu\text{g/mL}$ e em SHR na dose de 5 mg/mL , em consequência houve aumento na taxa de depuração de uréia (Figura 17 e 18). Pode se dizer que o aumento da taxa de depuração de uréia pode ser em virtude da administração do PV3, onde podemos hipotetizar que houve um aumento do metabolismo de proteínas.

O ácido úrico é um metabólito resultante de reações químicas das purinas. Alguns aminoácidos são metabolizados no organismo gerando intermediários precursores de ácidos nucléicos, nucleotídeos e bases purínicas. As purinas são

degradadas em hipoxantina, que é convertida em xantina e por ação irreversível de uma enzima denominada de xantina oxidase, se transforma em ácido úrico (12). O ácido úrico em excesso causa a hiperuricemia, que pode estar relacionada com doenças renais crônicas (120). Portanto, a avaliação dos níveis de ácido úrico é necessária, e os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o PV3 foi benéfico em aumentar a excreção de ácido úrico plasmático em SHR, uma vez que o ácido úrico contribui para o aumento da pressão arterial prevalecida em SHR (58). Estudos mostram que ratos espontaneamente hipertensos tendem a apresentar níveis plasmáticos de ácido úrico mais elevados do que os animais normotensos; em nossos achados o PV3 conseguiu reduzir em SHR nas doses de 2,5 e 5 mg/mL, entretanto doses menores não foram suficientes para reduzir os níveis de ácido úrico plasmático, estando aumentando em WT e SHR.

7.5 EFEITO DO PV3 NA HEMODINÂMICA VASCULAR

A pressão arterial é uma variável física que depende do volume sanguíneo contido no leito arterial, e é determinada por fatores que definem a entrada do sangue no compartimento arterial (débito cardíaco) e a saída desse compartimento (resistência periférica). Existem vários mecanismos que modulam a pressão arterial (45), e neste trabalho foram avaliados os mecanismos envolvidos no tônus vascular (vasomotricidade) e na regulação a médio e longo prazo por intermédio da função renal. Após observarmos efeitos vasorelaxantes em artéria renal (*ex vivo*) e efeito natriurético e aumentou o TFG (*in vivo*), conduzimos experimentos complementares em WT e SHR para avaliar o efeito do PV3 sobre a PAM, RVA e RVR. Os dados mostram que o PV3 reduziu a PAM de WT e SHR nas doses testadas (2,5 e 5 mg/Kg) (Figura 21 e 22).

Achados na literatura relataram que outros peptídeos de origem alimentar apresentam efeito hipotensor, peptídeos estes que apresentam em sua composição aminoácidos hidrofóbicos e com carga positiva. Tais aminoácidos conseguem se ligar a sítios ativos de enzimas ou sítios de ligação de outras moléculas, e assim desenvolver a sua atividade biológica (10,13,14). A partir do sequenciamento realizado por Graziani e colaboradores (2019) foi possível identificar na literatura a existência de homologia entre os peptídeos presentes no extrato PV3 com vários peptídeos descritos na literatura, que apresentam composições de aminoácidos que permitem desenvolver atividade anti-hipertensiva.

Diversos estudos mostram que peptídeos homólogos ao PV3, porém presentes em outras fontes, têm efeito anti-hipertensivo. Sonklin e colaboradores (2020) testaram o efeito hipotensor de peptídeos de feijão mungu (*Vigna radiata*) em SHR. Em seus experimentos foi observado uma redução de 36 mmHg após 24 h de administração oral do peptídeo com peso molecular abaixo de 3 kDa. Estes resultados foram similares aos encontrados em nosso estudo, onde a redução da PAM foi de 31,39 e 47,27 mmHg nas doses 2,5 e 5 mg/Kg em SHR, respectivamente. Outros pesquisadores também relataram atividade anti-hipertensiva em seus testes. Yang e colaboradores (2007) encontraram redução discreta (9,5 mmHg) na pressão arterial sistólica de SHR após a administração oral do peptídeo presente em farinha de milho (50 mg/Kg). Nesta mesma dose, Suetsuna e Nakano (2000) encontraram redução substancial na PAM (40 a 50 mmHg) após a administração oral de peptídeo da alga *Undaria pinnatifida*. Sanchez-Rivera e colaboradores (2016) também evidenciaram redução significativa na PAM de 21,1 mmHg após 2h de administração oral de peptídeo obtido pela hidrólise de β -caseína. Portanto, há evidências robustas de que alguns peptídeos bioativos de origem alimentar apresentam potencial anti-hipertensivo.

Após a avaliação da PAM e FC foi avaliado o efeito do PV3 sobre a resistência vascular de artéria aorta e renal. A resistência vascular periférica é a resistência ao fluxo sanguíneo produzido por todos os vasos, e segundo a lei de Poiseuille, a resistência vascular periférica varia inversamente com a quarta potência do raio arterial (45), e a vasomotricidade é determinante do processo vascular. A resistência vascular pode sofrer alterações conforme ocorrem mudanças no diâmetro luminal devido à uma contração ou relaxamento do vaso sanguíneo, e isso pode variar em estados patológicos, como a hipertensão. Considerando que a avaliação da resistência vascular é importante para o estudo da hemodinâmica cardiovascular e renal (45–47), foram feitos testes para avaliar se o PV3 altera a resistência vascular aórtica e renal, visto que ele promoveu relaxamento das artérias renais, alterando a vasomotricidade. Os resultados evidenciaram que o PV3 foi capaz de reduzir a resistência vascular das artérias aorta e renal em WT e SHR, nas doses de 2,5 e 5 mg/Kg (Figuras 23,24,25 e 26). Sugerimos então que, ao menos em parte, os efeitos de PV3 sobre a pressão arterial resultam também da redução na resistência vascular nas artérias avaliadas. Apesar de os efeitos anti-hipertensivos de PV3 coincidirem com os de peptídeos homólogos de outras fontes, esse estudo é o primeiro a

desvendar efeitos e mecanismos hemodinâmicos (renovasculares) e endoteliais subjacentes.

7.6 EFEITO DO PV3 NO CONTROLE DE GANHO DE MASSA E SACIEDADE

Para a avaliação dos efeitos do PV3 no controle de ganho de massa e na saciedade, foi feito um estudo crônico por 10 semanas, neste período o peso dos camundongos C57Bl/6J foi avaliado semanalmente. Esta avaliação se fez necessária, pois o camundongo endogâmico C57Bl /6J se trata de uma linhagem amplamente utilizada como um modelo de indução da obesidade por dieta hiperlipídica, sendo assim, essa linhagem é mais suscetível a desenvolver obesidade, adiposidade elevada, intolerância à glicose e a resistência à insulina (122,123). O método induzido por dieta para levar ao quadro de obesidade é bastante válido no ambiente científico pois se assemelha bastante a obesidade humana e aos distúrbios metabólicos desencadeados por uma dieta rica em gordura (122).

Deste modo, ao avaliar o ganho de massa do grupo HFD ao longo das 10 semanas notamos que os animais apresentaram aumento no ganho de massa comparado aos demais grupos, comprovando o nosso modelo experimental de obesidade. Entretanto o grupo que recebeu a dieta hiperlipídica acompanhada com administração por pseudogavagem de PV3, os animais não tiveram um ganho de massa excessivo como o grupo HFD, eles apresentaram 5,4 g a menos que o grupo HFD, o que corresponde a 16% de redução. Ao compararmos o grupo HFD+PV3 com o grupo CT e PV3 não tiveram diferença entre os pesos, mostrando que o PV3 preveniu o ganho de massa quando suplementado com dieta hiperlipídica. Ao avaliar o índice (gramas) de tecido adiposo epididimal e retroperitoneal notamos também que o PV3 foi capaz de prevenir a adiposidade dos animais suplementados com a dieta hiperlipídica, confirmando assim os dados do ganho de peso. Tais resultados podem estar relacionados com a capacidade dos peptídeos de feijão comum terem ação hipocolesterolêmica (124,125).

Marques e colaboradores (2015) comprovaram a capacidade de peptídeos de feijão caupi em diminuir o colesterol exógeno. De acordo com seus testes *in silico*, o peptídeo de feijão caupi impediu a absorção do colesterol por meio da interação hidrofóbica entre os resíduos de aminoácidos com o colesterol, dificultando a sua solubilização nas micelas. Esta hipótese é válida visto que no sequenciamento feito por nosso grupo de pesquisa existem aminoácidos hidrofóbicos nas sequências

peptídicas encontradas. Para Marques e colaboradores (2015), a hidrofobicidade do peptídeo é essencial para a redução da adiposidade.

Ferreira e colaboradores (2015) encontraram em seus testes com isolado de globulina de feijão adzuki (300 mg/kg) administrado por gavagem foram capazes de reduzir o peso corporal de animais suplementados com dieta hipercolesterolêmicos quando comparado com animais que só receberam dieta hipercolesterolêmicos. Kuniz (2019) encontraram em seus estudos que o camundongo suplementado com dieta hiperlipídica também teve maior acúmulo de tecido adiposo epididimal e retroperitoneal, e com a suplementação do biopolímero sericina (Bicho de seda- *Lepidoptera, Bombycidae*) (1000mg/kg) por gavagem teve uma leve redução do tecido adiposo e do peso corporal.

Em relação a ingestão alimentar os grupos CT e PV3 não diferiram, e nem o grupo HFD com HFD+PV3. Entretanto ao compararmos o grupo HFD e o HFD+PV3 com o grupo CT teve um aumento da ingestão em ambos os grupos. Este resultado é decorrência ao alto teor de calorias que a HFD apresenta e por ser mais palatável, resultando a maior ingestão (129). Os nossos achados foram semelhantes aos de Lima e colaboradores (2019) que testaram a influência de peptídeos de feijão comum administrados por gavagem a ingestão alimentar e não viram diferença estatística entre o grupo tratado e controle.

O comportamento alimentar é controlado através de dois mecanismos opostos: a apetite e a saciedade (130). O apetite está associado com a busca, escolha e ingestão de alimentos, enquanto que a saciedade é o oposto, está associado a sinais inibitórios que desencadeiam após o consumo alimentar para limitar a quantidade ingerida, dando o sentimento de satisfação após a ingestão de alimentos (131). Os sinais de apetite e saciedade são controlados pelo hipotálamo, uma região do cérebro responsável por regular a homeostase energética mediada por várias outras respostas fisiológicas que são cruciais para o corpo (132).

O hipotálamo é dividido em três regiões: área hipotalâmica anterior, tuberal e mamilar, na região tuberal do hipotálamo se encontra o núcleo arqueado (ARC) que atua como regulador central do balanço energético. Dentro do ARC, existem neurônios orexígenos que expressam os neuropeptídeos NPY e a AgRP e Neurônios anorexigênicos que expressam os neuropeptídeos POMC e CART, esses neuropeptídeos atuam de forma antagônicas (130,131). AgRP e NPY são os primeiros grupos de peptídeos orexígenos que geram funções estimulantes do apetite durante

o déficit metabólico, deste modo esses dois neuropeptídeos têm a função de aumentar a ingestão alimentar e diminuir o gasto energético. Enquanto que o POMC e o CART são componentes importantes do sistema melanocortina que envolvem as vias sistêmicas e neurais para o controle do balanço energético, sendo assim o POMC é o principal mediador da sinalização da saciedade juntamente com o CART que diminuem a ingestão de alimentos e aumentam o gasto energético (130,133).

Deste modo, buscou-se avaliar o efeito de PV3 na expressão de mRNA expresso de AgRP, NPY, POMC e CART. Foi observado que o PV3 aumentou os níveis de mRNA de POMC, AgRP no grupo PV3+HFD e diminuiu os níveis de mRNA de NPY no grupo PV3+HFD. Estes achados nos mostram que o aumento dos níveis de POMC pode ter levado ao aumento do gasto energético acarretando a diminuição do ganho corporal dos animais PV3+HFD. Outro fator que pode ter contribuído para a diminuição do ganho de massa corporal foi a diminuição dos níveis de mRNA de NPY, estudos feitos por Qi e colaboradores (2022) mostraram que na ausência de NPY diminuiu o peso corporal, uma vez que o NPY é crucial para o armazenamento e participação de energia. Possivelmente em nossos dados como os níveis de NPY estão reduzidos isto pode ter levado a diminuição do armazenamento energético. Em contrapartida os níveis de mRNA de AgRP foram aumentados, refletindo no aumento do consumo alimentar nos animais suplementados por dieta hiperlipídica, uma vez que esse neuropeptídeo é orexígeno.

A Proteína quinase ativada por AMP (AMPK) ou PRKAA hipotalâmicas estão relacionadas à modulação do balanço energético e com importante função na regulação da alimentação (134). Por conta das suas funções o AMPK vem sendo alvo terapêutico em doenças metabólicas que englobam comportamentos alimentares prejudicados, incluindo obesidade e diabetes tipo 2. Relatos da literatura afirmam que ativadores de AMPK são indicados para restaurar níveis elevados de glicose no diabetes, uma vez que a AMPK tem a capacidade de diminuir a glicose plasmática, tanto pela repressão da expressão de enzimas da gliconeogênese no fígado, quanto pelo aumento da captação de glicose nos músculos e outros tecidos (134–136). Deste modo, em nossos resultados observamos aumento dos níveis de mRNA de PRKAA, o que pode ter contribuído com a prevenção dos danos provocados pela dieta hiperlipídica, como o ganho de massa e o aumento dos níveis glicêmicos, e tais fatores não foram encontrados no grupo PV3+HFD. Algumas moléculas de origem alimentar foram descritas por serem ativadores de AMPK, estudos feitos por Dragano (2011)

testaram o resveratrol, um composto fenólico encontrado na casca das uvas tintas, e observaram que este composto bioativo aumentou os níveis de Ca^{2+} intracelular e levando a ativação indireta de AMPK e conseqüentemente houve aumento da captação de glicose em musculo. Este mesmo composto foi descrito por Lamas e colaboradores (2018) para diminuir o acúmulo hepático de lipídios. Outro composto bioativo de origem alimentar é a Quercetina que apresentou efeito anti-adipogênese ativando a via de sinal AMPK (139).

Nossos resultados levantam a necessidade de estudos complementares, por exemplo utilizando manipulação farmacológica com drogas que interfiram nos efeitos e vias recrutadas por tais hormônios para verificar se PV3 atua diretamente sobre estes alvos.

7.7 EFEITO DO PV3 NA HOMEOSTASE DE GLICOSE

Nos últimos anos vários estudos da área biofarmacêutica e alimentos nutracêuticos buscaram novos peptídeos antidiabéticos com alvo de melhora da glicemia em pacientes diabéticos e assim aliviar os problemas de saúde (49). Deste modo, este estudo buscou avaliar os efeitos do PV3 sobre a homeostase de glicose. Inicialmente avaliamos a capacidade do PV3 de reduzir a glicemia em animais que receberam o PV3 durante 10 semanas, nesta avaliação foram avaliados camundongos alimentados com dieta padrão e HFD. Foi feita uma avaliação da glicemia em jejum após 4 semanas, e nestes resultados não vimos diferença entre os grupos testados e os grupos controles, com 9 semanas avaliamos novamente a glicemia em jejum dos animais e notamos que o grupo que apenas recebeu a dieta HF teve a glicemia mais elevada do que os demais grupos, comprovando o nosso modelo experimental de resistência à insulina. O grupo experimental PV3+ HFD teve a glicemia reduzida por conta do tratamento de PV3. Experimentos feitos por Wang e colaboradores (2018), administraram oralmente peptídeos hidrolisados de *Juglans mandshurica Max* (500 e 800 mg/kg) em camundongos Kunming fêmea, já com a indução de diabetes por estreptozotocina (STZ), por um período de 4 semanas. Seus resultados foram semelhantes ao nosso estudo, pois eles obtiveram redução da glicemia nos grupos tratados com o peptídeo.

Sabe-se que animais suplementados por dieta hiperlipídica tendem a desenvolver resistência a insulina, deste modo investigamos se o PV3 melhorava a

sensibilidade à glicose e a insulina através do teste TTG e TTI. Em nossos estudos encontramos que o grupo HFD apresentou maior área sob a curva no teste de TTG comprovando que a HFD aumenta intolerância a glicose e no grupo PV3 e HFD+PV3 a área sob a curva foi menor, o que nos evidencia que o PV3 foi capaz de melhorar a sensibilidade à glicose, resultando na diminuição dos níveis glicêmicos. Testes feitos por Valencia-Mejía e colaboradores (2019) tiveram resultados semelhantes no teste TTG, onde os peptídeos da fração menor que 3 kDa de feijão comum endurecido na dose de 5 mg/kg tiveram a menor área sob a curva.

Em relação ao teste TTI foi observado que o grupo HFD também apresentou a área sob a curva maior do que os demais grupos, e ao fazer a taxa de decaimento de glicose observamos que o grupo PV3 apresentou a taxa maior, isso nos mostra que o PV3 em animais que recebem a dieta padrão aumenta a captação de glicose por melhorar a sensibilidade à insulina, levando o animal a ficar hipoglicêmico. Outros pesquisadores também encontraram o mesmo resultado utilizando compostos fenólicos de beterraba, onde obtiveram diminuição da área sob a curva no teste TTG e TTI (140). Foi feito ainda o teste de tolerância ao piruvato, que prediz o grau de sensibilidade hepática à insulina, neste teste não tivemos diferença estatística em nenhum grupo testado.

Pode-se dizer que os efeitos do PV3 na glicemia em animais suplementados com HFD e dieta padrão pode estar associado com a inibição de α -glucosidase e α -amilase, uma vez que o PV3 apresentou $86,8 \pm 0,1\%$ e $89,1 \pm 0,3\%$ de inibição de destas enzimas, respectivamente (133). Essas enzimas são responsáveis pela digestão de carboidratos, ao ser inibidas a digestão de carboidratos é atrasada no trato gastrointestinal (17,49). Wang e colaboradores (2020) relatam que os efeitos na glicemia estão associados com a sequência de aminoácidos dos peptídeos compostos essencialmente por aminoácidos hidrofóbicos, como Leu e Pro. Prolina na região C-terminal é conhecida por proteger os peptídeos da proteólise e também permite maior afinidade de ligação aos sítios ativos das enzimas α -glucosidase e α -amilase (141). No sequenciamento feito por nosso grupo de estudo (35), foi encontrada sequências peptídicas contendo aminoácidos hidrofóbicos como a sequência ELLER e LVRL; os efeitos de PV3 podem estar associados com essas sequências.

O fígado exerce efeito no controle da homeostase da glicose e na manutenção dos níveis glicêmicos, regulando o equilíbrio entre gliconeogênese, síntese de glicogênio e glicogenólise (46). Em um quadro de resistência à insulina, têm relatado que os hepatócitos exibem deficiência na utilização da glicose, associada à alteração do metabolismo da glicose (142). A regulação da gliconeogênese está associada pela via de sinalização IRS/ PI3K/ AKT, a qual a AKT é responsável pela translocação do GLUT4 para a membrana celular permitindo a entrada de glicose na célula, em consequência essa via inibe a gliconeogênese regulada pelas enzimas chave da glicose, G6PASE e PEPCK (140,142). Deste modo, buscamos avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na via da insulina que o PV3 possa estar atuando. Em ensaios de Western Blotting avaliamos a expressão das proteínas: IRS, PI3K, G6PASE, PEPCK em fígado, e as proteínas: pAKT, IRS, G6PASE e PEPCK em fígado estimulado com insulina. Nestes testes foi verificado que o PV3 aumentou a expressão de IRS nos dois tipos de dieta, melhorando a sinalização da insulina. No entanto no grupo PV3 a expressão de G6PASE e PEPCK estavam aumentados, este resultado pode ser em decorrência ao efeito hipoglicêmico do PV3, onde os níveis glicêmicos foram baixos o suficiente para ativar a via da gliconeogênese, com uma tentativa de aumentar os níveis de glicose no sangue, já que a sua taxa de decaimento de glicose foi a mais alta comprovada no teste TTI. Nos testes de WB de tecido hepático estimulado, não tivemos diferenças nos níveis de expressão entre os grupos tratados com PV3.

Avaliamos ainda a expressão gênica das enzimas envolvidas na via de sinalização da insulina e notamos que o PV3 aumentou os níveis de mRNA de PI3K e PTEN, que são genes importantes para ativar a via da gliconeogênese. A proteína/lipídio fosfatase PTEN é homólogo de fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10, e atenua a sinalização de PI3K desfosforilando o fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato gerado por PI3K (143). Em nossos achados foi encontrado aumento dos níveis de mRNA de PRKAA, um importante regulador dos níveis glicêmicos, uma vez ativado a via AMPK, há aumento da captação de glicose, o que explica os baixos níveis de glicose sanguínea no grupo PV3+ HFD quando comparado com o grupo HFD. Deste modo, o PV3 possivelmente atua na via IRS/ PI3K/ AMPK para a regulação dos níveis de glicose. Ainda nos testes de PCR no grupo PV3 e PV3+HFD os níveis de mRNA de pck1 em fígado sem estímulo e no fígado estimulado com insulina estavam

aumentados, e no grupo PV3 estava com os níveis de mRNA de G6PC em fígado estimulado com insulina, tais resultados podem ser em virtude do efeito hipoglicêmico do PV3 que possivelmente ativou a via da gliconeogênese.

Vários atores testaram diversos compostos bioativos, entre peptídeos e compostos fenólicos, de diferentes fontes alimentares e comprovaram a melhora da sinalização da insulina por ativar a via IRS/AKT/PI3K. Testes feitos por Wang e colaboradores (2018) com peptídeos de *Juglans mandshurica Maxim* em células HepG2 hepáticas, viram que o peptídeo LPLLR foi capaz de melhorar a sinalização através da via IRS/AKT/ PI3K e AMPK. O saponina isolado de *S. chinensis*, também aumentou a captação de glicose, e a via de sinalização envolvida foi a IRS/AKT/PI3K (145). E compostos fenólicos de beterraba também tiveram o aumento da expressão de IRS, promovendo os efeitos hipoglicêmico (140). Deste modo os efeitos do PV3 são similares com alguns atores que fizeram testes relacionados às vias moleculares que compreendem o entendimento de via de sinalização de insulina. Porém, há a necessidade de testes adicionais para o melhor entendimento das vias moleculares que envolvem a glicogênese e a gliconeogênese.

8. CONCLUSÃO

A partir dos achados desta pesquisa, concluímos que o PV3 é um extrato que apresenta múltiplos fragmentos peptídicos com atividade anti-hipertensiva e que apresentam homologia com peptídeos já descritos na literatura. A atividade anti-hipertensiva de PV3 está relacionada ao vasorelaxamento em anéis de artéria renal através de vias oxidonitrérgicas. Há também contribuições eletrolíticas (por aumentar a excreção de sódio e potássio) e de aumento na condutância vascular para o leito renal, o que culmina na diminuição da pressão arterial. Testes crônicos revelaram que PV3 tem efeito hipoglicemiante, por reduzir os níveis de glicose em roedores suplementados com HFD e dieta padrão, além de ser capaz de proteger os danos metabólicos acarretado pela suplementação de dieta hiperlipídica, como a resistência à insulina e a obesidade. Detectamos que o PV3 atua na via IRS/PI3K/AMPK para melhorar a sinalização da insulina. Tais achados são relevantes para o estudo molecular e fisiológico de peptídeos bioativos de origem alimentar, visto que a literatura é escassa acerca de mecanismos fisiológicos e moleculares subjacentes aos efeitos desses peptídeos. Outro aspecto importante é que estes resultados reforçam a necessidade de aproveitamento de feijões endurecidos, que são considerados resíduos da agroindústria, mas que podem ser compostos nutracêuticos direcionados ao tratamento de doenças crônicas de alta incidência e prevalência, como hipertensão, diabetes e obesidade.

REFERÊNCIAS

1. Coêlho JD. FEIJÃO: PRODUÇÃO E MERCADO. 2020;7.
2. Coêlho JD. PRODUÇÃO DE GRÃOS – FEIJÃO, MILHO E SOJA. 2018;12.
3. Ribeiro JVV. Estudo das atividades biológicas de frações proteicas do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cultivar pérola. Study of the biological activities of protein fractions of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivar pérola [Internet]. 30 de junho de 2017 [citado 3 de agosto de 2022]; Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/8234>
4. Batista K de A. Aplicações biotecnológicas de feijões endurecidos. Biotechnological applications of hardened beans [Internet]. 16 de setembro de 2014 [citado 3 de agosto de 2022]; Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/4072>
5. Batista KA, Prudêncio SH, Fernandes KF. Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard-to-cook common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). **J Food Sci.** abril de 2010;75(3):C286-290.
6. Siqueira BS, Fernandes KF, Brito PVA, Santos FCA. Histochemical and ultrastructural characterization of easy-to-cook and hard-to-cook carioca bean genotypes. **LWT.** 1º de novembro de 2018;97:117–23.
7. Diagnóstico socioeconômico da cultura do feijão no Brasil. - Portal Embrapa [Internet]. [citado 3 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/959522/diagnostico-socioeconomico-da-cultura-do-feijao-no-brasil>
8. de Almeida Costa GE, da Silva Queiroz-Monici K, Pissini Machado Reis SM, de Oliveira AC. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. **Food Chem.** 1º de fevereiro de 2006;94(3):327–30.

9. Durak A, Baraniak B, Jakubczyk A, Świeca M. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. **Food Chem.** 1º de dezembro de 2013;141(3):2177–83.
10. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review - ScienceDirect [Internet]. [citado 3 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914007261>
11. Gianfranceschi GL, Gianfranceschi G, Quassinti L, Bramucci M. Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy. **J Funct Foods.** 1º de agosto de 2018;47:252–63.
12. Nelson DL, Cox MM. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 6º ed. São Paulo: Artmed; 2014.
13. Möller NP, Scholz-Ahrens KE, Roos N, Schrezenmeir J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **Eur J Nutr.** junho de 2008;47(4):171–82.
14. Bioactive peptides: A review | Food Quality and Safety | Oxford Academic [Internet]. [citado 3 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://academic.oup.com/fqs/article/1/1/29/4791729>
15. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications - ScienceDirect [Internet]. [citado 3 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166907000146>
16. Unravelling the molecular mechanisms associated with the role of food-derived bioactive peptides in promoting cardiovascular health - ScienceDirect [Internet]. [citado 3 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464619305699>
17. Valencia-Mejía E, Batista KA, Fernández JJA, Fernandes KF. Antihyperglycemic and hypoglycemic activity of naturally occurring peptides and protein hydrolysates from easy-to-cook and hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Res Int Ott Ont.** julho de 2019;121:238–46.

18. Enzymatic hydrolysis of Carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein as an alternative to commercially rejected grains - ScienceDirect [Internet]. [citado 3 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820301791>
19. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition - ScienceDirect [Internet]. [citado 3 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799317301923>
20. Conab - Histórico Mensal AgroConab [Internet]. CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. 2022 [citado 3 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-agroconab>
21. Demito A, Ziegler V, Goebel JTS, Konopatzki EA, Coelho SRM, Elias MC. Effects of refrigeration on biochemical, digestibility, and technological parameters of carioca beans during storage. **J Food Biochem**. 2019;43(7):e12900.
22. Njoroge DM, Kinyanjui PK, Christiaens S, Shpigelman A, Makokha Anselimo O, Sila DN, et al. Effect of storage conditions on pectic polysaccharides in common beans (*Phaseolus vulgaris*) in relation to the hard-to-cook defect. **Food Res Int**. 1º de outubro de 2015;76:105–13.
23. Batista K de A. Extrusão de farinha de feijão hard-to-cook: características bioquímicas e propriedades funcionais. Extruded bean flour hard-to-cook: biochemical characteristics and functional properties [Internet]. 26 de fevereiro de 2010 [citado 3 de agosto de 2022]; Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/1447>
24. Impact of cooking method on phenolic composition and antioxidant potential of four varieties of *Phaseolus vulgaris* L. and *Glycine max* L. - ScienceDirect [Internet]. [citado 3 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819300118>
25. Ribeiro JVV, Batista KA, Fernandes KF. Potential Iron and Copper Chelating Activity of Naturally Occurring Peptides and Protein Fractions from Common Bean (*Phaseolus Vulgaris*). **Int J Biochem Physiol** [Internet]. 2019 [citado 4 de agosto

- de 2022];4(3). Disponível em:
<https://medwinpublishers.com/IJBP/IJBP16000161.pdf>
26. Lemes AC, Sala L, Ores J da C, Braga ARC, Egea MB, Fernandes KF. A Review of the Latest Advances in Encrypted Bioactive Peptides from Protein-Rich Waste. **Int J Mol Sci**. 16 de junho de 2016;17(6):E950.
27. A novel bioactive peptide derived from enzymatic hydrolysis of *Ruditapes philippinarum*: Purification and investigation of its free-radical quenching potential - ScienceDirect [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511312003856>
28. Cruz JN da. Hidrolisado proteico da semente de cupuaçu como fonte de peptídeos inibidores da enzima conversora da angiotensina I [Internet] [text]. Universidade de São Paulo; 2015 [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-29042015-100916/>
29. Carmo SG. Prospecção de peptídeos bioativos com potencial modulatório sobre a atividade quimotripsina símile do proteossoma 20S [Internet] [Dissertação do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia]. [Ouro Preto, MG]: Universidade Federal de Ouro Preto; 2015. Disponível em: https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/6319/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Propec%C3%A7%C3%A3oPept%C3%ADdeosBioativos.pdf
30. Hayes M, Bleakley S. 21 - Peptides from plants and their applications. Em: Koutsopoulos S, organizador. Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering [Internet]. Woodhead Publishing; 2018 [citado 4 de agosto de 2022]. p. 603–22. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081007365000259>
31. Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis - ScienceDirect [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945208002768>
32. Rendina G. Experimental Methods in Modern Biochemistry. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1971. 333 p.

33. Enzyme and Bioactive Peptides—A Strategy for Discovery and Identification of Antihypertensive Peptides - ScienceDirect [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128132807000207>
34. Tamam B, Syah D, Suhartono MT, Kusuma WA, Tachibana S, Lioe HN. Proteomic study of bioactive peptides from tempe. **J Biosci Bioeng**. agosto de 2019;128(2):241–8.
35. Graziani D, Ribeiro J, Cruz V, Gomes RM, Araujo EG, Santos Junior AC, et al. Oxidant and antioxidant effects of a low molecular weight peptide fraction from hardened bean (*Phaseolus vulgaris*) on endothelium. **Braz J Med Biol Res** [Internet]. 2021 [citado 24 de julho de 2022];54(6). Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjmb/a/ZPctcgJHNpZsGHpQpfVNPkP/?lang=en>
36. García MC, Puchalska P, Esteve C, Marina ML. Vegetable foods: a cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. **Talanta**. 15 de março de 2013;106:328–49.
37. Antony P, Vijayan R. Bioactive Peptides as Potential Nutraceuticals for Diabetes Therapy: A Comprehensive Review. **Int J Mol Sci**. 22 de agosto de 2021;22(16):9059.
38. Rutherfurd-Markwick KJ, Moughan PJ. Bioactive peptides derived from food. **J AOAC Int**. junho de 2005;88(3):955–66.
39. Rutherfurd-Markwick KJ. Food proteins as a source of bioactive peptides with diverse functions. **Br J Nutr**. agosto de 2012;108 Suppl 2:S149-157.
40. OMS revela principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo entre 2000 e 2019 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde [Internet]. [citado 17 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/9-12-2020-oms-revela-principais-causas-morte-e-incapacidade-em-todo-mundo-entre-2000-e>
41. Research C for DE and. Novel Drug Approvals for 2015. FDA [Internet]. 25 de janeiro de 2021 [citado 16 de maio de 2022]; Disponível em:

- <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2015>
42. Research C for DE and. Novel Drug Approvals for 2021. FDA [Internet]. 21 de junho de 2022 [citado 4 de agosto de 2022]; Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2021>
 43. Yan J, Zhao J, Yang R, Zhao W. Bioactive peptides with antidiabetic properties: a review. **Int J Food Sci Technol**. 2019;54(6):1909–19.
 44. IJMS | Free Full-Text | Characteristics of Food Protein-Derived Antidiabetic Bioactive Peptides: A Literature Update [Internet]. [citado 16 de maio de 2022]. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/17/9508>
 45. Aires M. **Fisiologia**. 3º ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan;
 46. Guyton A, Hall. Tratado de Fisiologia Médica. 13º. São Paulo: Guanabara Koogan; 2017.
 47. Koeppen B, Stanton B. Berne & Levy, **Fisiologia** [Internet]. 6º. ELSEVIER HS - EDUCATION; 2009 [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.meulivro.biz/fisiologia/789/berne-levy-fisiologia-koeppen-stanton-6-ed-pdf/>
 48. GUYTON, A.C. e Hall J.E.– **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Elsevier. 13ª ed., 2017.
 49. Wang J, Wu T, Fang L, Liu C, Liu X, Li H, et al. Anti-diabetic effect by walnut (*Juglans mandshurica* Maxim.)-derived peptide LPLLR through inhibiting α -glucosidase and α -amylase, and alleviating insulin resistance of hepatic HepG2 cells. **J Funct Foods**. 1º de junho de 2020;69:103944.
 50. Zhang Y, Wang M, Dong H, Yu X, Zhang J. Anti-hypoglycemic and hepatocyte-protective effects of hyperoside from *Zanthoxylum bungeanum* leaves in mice with high-carbohydrate/high-fat diet and alloxan-induced diabetes. **Int J Mol Med**. janeiro de 2018;41(1):77–86.

51. Nongonierma AB, Dellafiora L, Paoletta S, Galaverna G, Cozzini P, FitzGerald RJ. In Silico Approaches Applied to the Study of Peptide Analogs of Ile-Pro-Ile in Relation to Their Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Properties. *Front Endocrinol [Internet]*. 2018 [citado 16 de maio de 2022];9. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00329>
52. Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides. *J Funct Foods*. 1º de outubro de 2013;5(4):1909–17.
53. Filho BM, Yugar-Toledo JC, Moreno Júnior H, Gus M, Rosito G, Et al. Posicionamento Brasileiro sobre Hipertensão Arterial Resistente – 2020. Departamento de Hipertensão Arterial (DHA) da Sociedade Brasileira de Cardiologia; 2020 p. 576–96. Report No.: 114 (3).
54. Yugar-Toledo JC, Moreno Júnior H, Gus M, Rosito GBA, Scala LCN, Muxfeldt ES, et al. Posicionamento Brasileiro sobre Hipertensão Arterial Resistente – 2020. *Arq Bras Cardiol [Internet]*. 2020 [citado 4 de agosto de 2022]; Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2020000300576
55. Alves B/ O/ OM. 26/6 – Dia Nacional do Diabetes | Biblioteca Virtual em Saúde MS [Internet]. [citado 12 de julho de 2022]. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/26-6-dia-nacional-do-diabetes-4/>
56. Description: Controle da pressão arterial e doença renal crônica [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFG_d58cf6d6fc75a88ac28008abde32fc39
57. Dia Nacional da Prevenção e Controle da Hipertensão Arterial - 26 de abril — UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB Centro de Referência em Atenção à Saúde - CRAS [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.ufpb.br/cras/contents/noticias/dia-nacional-da-prevencao-e-controle-da-hipertensao-arterial-26-de-abril>
58. Silva ES da. Papel da grelina e do receptor GHS-R1a no controle da função renal e hemodinâmica em animais normotensos e hipertensos. Role of ghrelin and

- GHR-S1a receptors in renal function and hemodynamic adjustments of normotensive and hypertensive rats [Internet]. 14 de março de 2019 [citado 4 de agosto de 2022]; Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/9482>
59. Palota L. Adesão ao tratamento da Hipertensão Arterial: estudo entre usuários cadastrados no Centro de Saúde de um município do interior paulista [Internet] [Mestrado em Enfermagem Fundamental]. [Ribeirão Preto]: Universidade de São Paulo; 2010 [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/22/22132/tde-27092010-161411/>
60. Massa KHC, Antunes JLF. Atividade física e uso de medicamentos anti-hipertensivos em idosos no Município de São Paulo. 2013 [citado 4 de agosto de 2022]; Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/002425550>
61. Tortora G, Derrickson B. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 14^o ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan;
62. Post EH, Vincent JL. Renal autoregulation and blood pressure management in circulatory shock. **Crit Care**. 22 de março de 2018;22:81.
63. Renal function and acute heart failure outcome - PubMed [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29884452/>
64. Renal physiology: blood flow, glomerular filtration and plasma clearance - ScienceDirect [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472029921001132>
65. Carlström M, Wilcox CS, Arendshorst WJ. Renal autoregulation in health and disease. **Physiol Rev**. abril de 2015;95(2):405–511.
66. Regulation of renal function and blood pressure control by P2 purinoceptors in the kidney. - Pesquisa Google [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: https://www.google.com/search?q=Regulation+of+renal+function+and+blood+pressure+control+by+P2+purinoceptors+in+the+kidney.&rlz=1C1FCXM_pt-PTBR992BR993&oq=Regulation+of+renal+function+and+blood+pressure+contr

ol+by+P2+purinoceptors+in+the+kidney.&aqs=chrome..69i57.897j0j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8

67. The role of the kidney in regulating arterial blood pressure - PubMed [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22926246/>
68. Brain and kidney GHS-R1a underexpression is associated with changes in renal function and hemodynamics during neurogenic hypertension - ScienceDirect [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720720302847>
69. Pérez Calvo JI, Josa Laorden C, Giménez López I. Renal function assessment in heart failure. **Rev Clin Esp.** julho de 2017;217(5):267–88.
70. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacol Rev.** setembro de 2007;59(3):251–87.
71. Neto F, Candido H. Papel dos rins na hipertensão arterial induzida pelo tratamento crônico com ouabaína em ratos. [Internet] [text]. Universidade de São Paulo; 2009 [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42137/tde-02022010-105527/>
72. Buzinari TC. Participação do óxido nítrico no efeito hipotensivo e vasodilatador induzido pela fotobiomodulação utilizando laser de 660 nm. [São Carlos, SP]: Universidade Federal de São Carlos; 2021.
73. Potje SR. Efeito vasorelaxante do doador de óxido nítrico [Ru(terpy)(bdq)NO]₃₊ (TERPY) em artéria de resistência e sua interação com a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR). [Internet] [Tese]. [Araçatuba, SP]: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2016. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/148587/potje_sr_dr_araca.pdf?sequence=3&isAllowed=y

74. Senejoux F, Girard C, Aisa HA, Bakri M, Kerram P, Berthelot A, et al. Vasorelaxant and hypotensive effects of a hydroalcoholic extract from the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. (Nitrariaceae). **J Ethnopharmacol.** 1º de junho de 2012;141(2):629–34.
75. Gallo G, Volpe M, Savoia C. Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications. *Front Med* [Internet]. 2022 [citado 4 de agosto de 2022];8. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.798958>
76. Ben Slama-Ben Salem R, Ktari N, Bkhairia I, Nasri R, Mora L, Kallel R, et al. In vitro and in vivo anti-diabetic and anti-hyperlipidemic effects of protein hydrolysates from *Octopus vulgaris* in alloxanic rats. **Food Res Int Ott Ont.** abril de 2018;106:952–63.
77. Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf [Internet]. [citado 12 de julho de 2022]. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf>
78. Ueno M, Carvalheira JBC, Tambascia RC, Bezerra RMN, Amaral ME, Carneiro EM, et al. Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. **Diabetologia.** março de 2005;48(3):506–18.
79. Guo S. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **J Endocrinol.** 1º de fevereiro de 2014;220(2):T1–23.
80. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature.** dezembro de 2001;414(6865):799–806.
81. McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. **Front Endocrinol.** 2013;4:52.

82. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **World J Diabetes**. 15 de julho de 2010;1(3):68–75.
83. Central Insulin Signaling Is Attenuated by Long-Term Insulin Exposure via Insulin Receptor Substrate-1 Serine Phosphorylation, Proteasomal Degradation, and Lysosomal Insulin Receptor Degradation | Endocrinology | Oxford Academic [Internet]. [citado 13 de julho de 2022]. Disponível em: <https://academic.oup.com/endo/article/151/1/75/2456048>
84. Estudo mostra mudança de hábitos alimentares durante a pandemia [Internet]. Agência Brasil. 2020 [citado 11 de julho de 2022]. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2020-10/estudo-mostra-mudanca-de-habitos-alimentares-durante-pandemia>
85. Rutherford-Markwick KJ. Food proteins as a source of bioactive peptides with diverse functions. **Br J Nutr**. agosto de 2012;108 Suppl 2:S149-157.
86. Li S, Liu L, He G, Wu J. Molecular targets and mechanisms of bioactive peptides against metabolic syndromes. **Food Funct**. 24 de janeiro de 2018;9(1):42–52.
87. Mahatmanto T, Poth AG, Mylne JS, Craik DJ. A comparative study of extraction methods reveals preferred solvents for cystine knot peptide isolation from *Momordica cochinchinensis* seeds. **Fitoterapia**. junho de 2014;95:22–33.
88. Alves PH. Avaliação dos efeitos de peptídeos isolados de veneno de serpentes no sistema cardiovascular de ratos. Evaluation of the effects of peptides isolated from snakes venoms in cardiovascular system of rats [Internet]. 22 de março de 2016 [citado 4 de agosto de 2022]; Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/6233>
89. Evaluation of bamboo shoot peptide preparation with angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant abilities from byproducts of canned bamboo shoots - PubMed [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23647018/>
90. Peptide fragments from β -casein f(134–138), HLPLP, generated by the action of rat blood plasma peptidases show potent antihypertensive activity - ScienceDirect

- [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996915302775>
91. Ma MS, Bae IY, Lee HG, Yang CB. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Food Chem.** 1º de maio de 2006;96(1):36–42.
 92. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats - PubMed [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12358510/>
 93. Antihypertensive effect of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin in spontaneously hypertensive rats - ScienceDirect [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S175646461400036X>
 94. Identification of ACE-inhibitory peptides from *Phaseolus vulgaris* after in vitro gastrointestinal digestion - PubMed [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26398778/>
 95. Suetsuna K, Maekawa K, Chen JR. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **J Nutr Biochem.** maio de 2004;15(5):267–72.
 96. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides - ScienceDirect [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996901001314>
 97. Suetsuna K, Nakano T. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). **J Nutr Biochem.** setembro de 2000;11(9):450–4.
 98. Puchalska P, Marina ML, García MC. Development of a reversed-phase high-performance liquid chromatography analytical methodology for the determination

- of antihypertensive peptides in maize crops. **J Chromatogr A**. 20 de abril de 2012;1234:64–71.
99. Yang Y, Tao G, Liu P, Liu J. Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal. **J Agric Food Chem**. 19 de setembro de 2007;55(19):7891–5.
100. Nakahara T, Sano A, Yamaguchi H, Sugimoto K, Chikata H, Kinoshita E, et al. Antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-like seasoning and identification of its angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances. **J Agric Food Chem**. 27 de janeiro de 2010;58(2):821–7.
101. Zhu XL, Watanabe K, Shiraishi K, Ueki T, Noda Y, Matsui T, et al. Identification of ACE-inhibitory peptides in salt-free soy sauce that are transportable across caco-2 cell monolayers. **Peptides**. março de 2008;29(3):338–44.
102. Nogata Y, Nagamine T, Yanaka M, Ohta H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides produced by autolysis reactions from wheat bran. **J Agric Food Chem**. 12 de agosto de 2009;57(15):6618–22.
103. Vohra MS, Benchoula K, Serpell CJ, Hwa WE. AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. **Eur J Pharmacol**. 15 de janeiro de 2022;915:174611.
104. Tagliacruzchi D, Martini S, Bellesia A, Conte A. Identification of ACE-inhibitory peptides from *Phaseolus vulgaris* after in vitro gastrointestinal digestion. **Int J Food Sci Nutr**. 2015;66(7):774–82.
105. Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. **Biosci Biotechnol Biochem**. outubro de 1992;56(10):1541–5.
106. Wang W. Tolerability of hypertonic injectables. **Int J Pharm**. 25 de julho de 2015;490(1–2):308–15.
107. Wermeling DP, Rapp RP, DeLuca PP, Piccoro JJ. Osmolality of small-volume intravenous admixtures. **Am J Hosp Pharm**. agosto de 1985;42(8):1739–44.

108. Shobako N, Ishikado A, Ogawa Y, Sono Y, Kusakari T, Suwa M, et al. Vasorelaxant and Antihypertensive Effects That Are Dependent on the Endothelial NO System Exhibited by Rice Bran-Derived Tripeptide. **J Agric Food Chem.** 6 de fevereiro de 2019;67(5):1437–42.
109. Paula TDC de. Efeito relaxante do composto doador de óxido nítrico e inibidor de COX NCX2121 na aorta de ratos hipertensos renais [Internet] [text]. Universidade de São Paulo; 2014 [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-09042014-104224/>
110. Anishchenko AM, Aliev OI, Sidekhmenova AV, Shamanaev AY, Plotnikov MB. Dynamics of Blood Pressure Elevation and Endothelial Dysfunction in SHR Rats During the Development of Arterial Hypertension. **Bull Exp Biol Med.** setembro de 2015;159(5):591–3.
111. Changes in the stability and antioxidant activities of different molecular weight bioactive peptide extracts obtained from beef during in vitro human digestion by gut microbiota - ScienceDirect [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996921000132>
112. Konukoglu D, Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. **Adv Exp Med Biol.** 2017;956:511–40.
113. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats - PubMed [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9530190/>
114. Marczak ED, Ohinata K, Lipkowski AW, Yoshikawa M. Arg-Ile-Tyr (RIY) derived from rapeseed protein decreases food intake and gastric emptying after oral administration in mice. **Peptides.** setembro de 2006;27(9):2065–8.
115. Kaneko K, Iwasaki M, Yoshikawa M, Ohinata K. Orally administered soymorphins, soy-derived opioid peptides, suppress feeding and intestinal transit via gut μ 1-receptor coupled to 5-HT_{1A}, D₂, and GABAB systems. **Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol.** setembro de 2010;299(3):G799–805.

116. Samtiya M, Aluko RE, Dhewa T. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. **Food Prod Process Nutr.** 6 de março de 2020;2(1):6.
117. Wadei HM, Textor SC. The role of the kidney in regulating arterial blood pressure. **Nat Rev Nephrol.** outubro de 2012;8(10):602–9.
118. Ortiz PA, Garvin JL. Intrarenal transport and vasoactive substances in hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. setembro de 2001;38(3 Pt 2):621–4.
119. Hultström M. Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens.** junho de 2012;30(6):1087–91.
120. Tratado de análises clínicas - 1. ed. PDF | MeuLivro [Internet]. 2020 [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.meulivro.biz/hematologia/1825/tratado-de-analises-clinicas-1-ed-pdf/>
121. Sonklin C, Alashi MA, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O, Aluko RE. Identification of antihypertensive peptides from mung bean protein hydrolysate and their effects in spontaneously hypertensive rats. **J Funct Foods.** 1º de janeiro de 2020;64:103635.
122. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol.** março de 2018;14(3):140–62.
123. Lutz TA, Woods SC. Overview of Animal Models of Obesity. *Curr Protoc Pharmacol* Editor Board SJ Enna Ed--Chief AI. setembro de 2012;CHAPTER:Unit5.61.
124. de Lima SLS, Gomes MJC, da Silva BP, Alves NEG, Toledo RCL, Theodoro JMV, et al. Whole flour and protein hydrolysate from common beans reduce the inflammation in BALB/c mice fed with high fat high cholesterol diet. **Food Res Int.** 1º de agosto de 2019;122:330–9.

125. Silva MB de C e. Avaliação da capacidade de peptídeos oriundos da hidrólise da proteína β -vignina na modulação do metabolismo lipídico [Internet]. [Araraquara, SP]: Unesp; 2022 [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/235133>
126. Marques MR, Fontanari GG, Pimenta DC, Soares-Freitas RM, Arêas JAG. Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity. **Food Res Int.** 1º de novembro de 2015;77:43–8.
127. Ferreira ES, Amaral ALS, Demonte A, Zanelli CF, Capraro J, Duranti M, et al. Hypocholesterolaemic effect of rat-administered oral doses of the isolated 7S globulins from cowpeas and adzuki beans. **J Nutr Sci.** 16 de fevereiro de 2015;4:e7.
128. Kunz RI. Propriedades, potenciais aplicações biomédicas e efeitos da sericina de *Bombyx mori* sobre a morfofisiologia de camundongos obesos por dieta hiperlipídica. 2017 [citado 4 de agosto de 2022]; Disponível em: <http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/1872>
129. Cabeço LC, Akiba M, Calsa MS, Sartori DR da S, Vicentini-Paulino M de LM, Pinheiro DF. Dieta hiperlipídica com farinha de soja como fonte proteica: utilização na seleção de ratos propensos e resistentes à obesidade. **Rev Nutr.** junho de 2010;23(3):417–24.
130. Vohra MS, Benchoula K, Serpell CJ, Hwa WE. AgRP/NPY and POMC neurons in the arcuate nucleus and their potential role in treatment of obesity. **Eur J Pharmacol.** 15 de janeiro de 2022;915:174611.
131. Qi Y, Lee NJ, Ip CK, Enriquez R, Tasan R, Zhang L, et al. NPY derived from AGRP neurons controls feeding via Y1 and energy expenditure and food foraging behaviour via Y2 signalling. **Mol Metab.** 1º de maio de 2022;59:101455.
132. Targeting appetite and satiety in diabetes and obesity, via G protein-coupled receptors. **Biochem Pharmacol.** 1º de agosto de 2022;202:115115.
133. Dominguez G. The CART gene: structure and regulation. *Peptides.* agosto de 2006;27(8):1913–8.

134. Spencer-Jones NJ, Ge D, Snieder H, Perks U, Swaminathan R, Spector TD, et al. AMP-kinase $\alpha 2$ subunit gene PRKAA2 variants are associated with total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol and high-density lipoprotein-cholesterol in normal women. **J Med Genet.** dezembro de 2006;43(12):936–42.
135. de Oliveira KA, Moreira Gomes MD, Vasconcelos RP, de Abreu ES, Fortunato RS, Carneiro Loureiro AC, et al. Phytomodulatory proteins promote inhibition of hepatic glucose production and favor glycemic control via the AMPK pathway. **Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.** janeiro de 2019;109:2342–7.
136. Andreelli F, Foretz M, Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, et al. Liver adenosine monophosphate-activated kinase- $\alpha 2$ catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. **Endocrinology.** maio de 2006;147(5):2432–41.
137. DRAGANO NR. Avaliação do efeito da casca de jaboticaba liofilizada sobre o ganho de peso, perfil lipídico e resistência à insulina em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica / Nathalia Romanelli Vicente Dragano. [Campinas, SP]: Unicamp; 2011.
138. Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice - ScienceDirect [Internet]. [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464618303013>
139. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways - ScienceDirect [Internet]. [citado 28 de julho de 2022]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X08012187?via%3Dihub>
140. Micheletti Lorizola I, Érica Miyamoto J, Luiza Figueiredo Vieira A, Rocchetti Sumere B, Maria Neves Bezerra R, Alberto Torsoni M, et al. Beet (*Beta vulgaris* L.) stalk and leaf supplementation changes the glucose homeostasis and inflammatory markers in the liver of mice exposed to a high-fat diet. **Food Chem Mol Sci.** 30 de julho de 2021;2:100018.

141. Meisel H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. **BioFactors Oxf Engl.** 2004;21(1–4):55–61.
142. Song JJ, Wang Q, Du M, Li TG, Chen B, Mao XY. Casein glycomacropeptide-derived peptide IPPKKNQDKTE ameliorates high glucose-induced insulin resistance in HepG2 cells via activation of AMPK signaling. **Mol Nutr Food Res.** fevereiro de 2017;61(2).
143. Capuano ACT. Estudo da expressão das proteínas PTEN e Akt em células derivadas de carcinoma epidermóide bucal em câmara de invasão [Internet] [text]. Universidade de São Paulo; 2006 [citado 4 de agosto de 2022]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23141/tde-08032006-175120/>
144. Wang J, Du K, Fang L, Liu C, Min W, Liu J. Evaluation of the antidiabetic activity of hydrolyzed peptides derived from *Juglans mandshurica* Maxim. fruits in insulin-resistant HepG2 cells and type 2 diabetic mice. **J Food Biochem.** 2018;42(3):e12518.
145. Hu X, Wang S, Xu J, Wang DB, Chen Y, Yang GZ. Triterpenoid Saponins from *Stauntonia chinensis* Ameliorate Insulin Resistance via the AMP-Activated Protein Kinase and IR/IRS-1/PI3K/Akt Pathways in Insulin-Resistant HepG2 Cells. **Int J Mol Sci.** junho de 2014;15(6):10446–58.

ANEXO 1



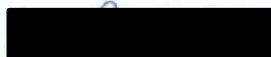
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos centrais ecardiovasculares de peptídeos bioativos de feijão (*Phaseolus vulgaris*) em ratos”, registrada com o protocolo nº 084/18, sob a responsabilidade de **Carlos Henrique Xavier** e **Daniel Graziani** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de 11/03/2019.

- Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 11/03/2019 a 31/12/2021
- Espécie/linhagem/raça: *Rattus norvegicus* Wistar e SHR
- Nº de animais autorizados: 190 *Rattus norvegicus* Wistar e 66 SHR.
- Peso/Idade: 250-300g.
- Sexo: machos.



Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com

ANEXO 2

CERTIFICADO CEUA nº 230/2021



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **EFETOS DA FRAÇÃO PEPTÍDICA DE FEIJÃO COMUM HARD-TO-COOK (PHASEOLUS VULGARIS) SOBRE A RESISTÊNCIA À INSULINA HEPÁTICA E METABOLISMO**, registrada com o nº **5857-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni e Caroline Lobo Costa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **16/09/2021**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/10/2021 a 30/08/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	16/09/2021 a 30/08/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6j
No. de animais:	10
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6j
No. de animais:	10
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6j
No. de animais:	10
Idade/Peso:	8.00 Semanas / 30.00 Gramas
Sexo:	10 Machos
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas, FCA/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **20 de outubro de 2021**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

NOTAS: Preste atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área de pesquisadores responsáveis. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impede que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por WAGNER JOSE FAVARO, COORDENADOR CEUA/UNICAMP, em 21/10/2021, às 13:44 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP, em 21/10/2021, às 14:10 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
A6B52A45 3D884F55 85F22A91 34342E05





A peptide fraction from hardened common beans (*Phaseolus vulgaris*) induces endothelium-dependent antihypertensive and renal effects in rats

Juliana Vila Verde Ribeiro^a, Daniel Graziani^a, Jhulle Horraine Moreira Carvalho^a, Michelle Mendanha Mendonça^a, Lara Marques Naves^b, Helton Freires Oliveira^c, Hericles Mesquita Campos^d, Maria Clorinda Soares Fioravanti^c, Lillian Fernanda Pacheco^g, Patricia Maria Ferreira^a, Gustavo Rodrigues Pedrino^b, Paulo César Ghedini^d, Kátia Flávia Fernandes^{e,1}, Karla de Aleluia Batista^{f,1}, Carlos Henrique Xavier^{a,1,*}

^a Systems Neurobiology Laboratory, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Brazil

^b Center of Neuroscience and Cardiovascular Research, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Brazil

^c Molecule, Cell and Tissue Analysis Laboratory, School of Veterinary and Animal Science, Federal University of Goiás, Brazil

^d Biochemical and Molecular Pharmacology Laboratory, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Brazil

^e Polymer Chemistry Laboratory, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Brazil

^f Federal Institute for Education, Science and Technology of Goiás, Goiania Oeste Campus, Brazil

^g State University of Goiás, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Hypertension
Renal function
Hydroelectrolytic balance
Bioactive peptides
Hard-to-cook
Common beans
Phaseolus vulgaris

ABSTRACT

Beans reached the research spotlight as a source of bioactive compounds capable of modulating different functions. Recently, we reported antioxidant and oxidonitrergic effect of a low molecular weight peptide fraction (<3 kDa) from hardened bean (*Phaseolus vulgaris*) *in vitro* and *ex vivo*, which necessitate further *in vivo* assessments. This work aimed to evaluate the hypotensive effect and the involved physiological mechanisms of the hardened common bean peptide (*Phaseolus vulgaris*) in normotensive (Wistar) and hypertensive (SHR) animals. Bean flour was combined with a solution containing acetonitrile, water and formic acid (25: 24: 1). Protein extract (PV3) was fractionated (3 kDa membrane). We assessed PV3 effects on renal function and hemodynamics of wistar (WT–normotensive) and spontaneously hypertensive rats (SHR) and measured systemic arterial pressure and flow in aortic and renal beds. The potential endothelial and oxidonitrergic involvements were tested in isolated renal artery rings. As results, we found that PV3: I) decreased food consumption in SHR, increased water intake and urinary volume in WT, increased glomerular filtration rate in WT and SHR, caused natriuresis in SHR; II) caused NO- and endothelium-dependent vasorelaxation in renal artery rings; III) reduced arterial pressure and resistance in aortic and renal vascular beds; IV) caused antihypertensive effects in a dose-dependent manner. Current findings support PV3 as a source of bioactive peptides and raise the potential of composing nutraceutical formulations to treat renal and cardiovascular diseases.

1. Introduction

The common bean (*Phaseolus vulgaris*) is a legume widely consumed and cultivated throughout the world. The largest producers are India, Myanmar and Brazil (Coelho, 2019; Ribeiro, 2017). The high consumption

of beans occurs mainly in underdeveloped countries as it is considered a low-cost protein when compared to animal sources (Batista et al., 2010). The nutritional facts show high contents of proteins, minerals, vitamins, phenolic compounds, tannins, carbohydrates and fibers (Batista, 2014; Ribeiro, 2017; Ribeiro et al., 2019; Valencia-Mejía et al.,

Abbreviations: HTC, Hard-to-Cook effects; PV3, *Phaseolus vulgaris* extract with peptides smaller than 3 kDa; NO, Nitric oxide; WT, Wistar rat; SHR, Spontaneously hypertensive rat; ABE, Aortic blood flow; RBF, Renal blood flow; RVR, Renal vascular resistance; AVR, Aortic vascular resistance; L-NAME, nitroarginine methyl ester; GFR, Glomerular filtration rate

* Corresponding author. Systems Neurobiology Laboratory. Department of Physiological Sciences, room 203, Institute of Biological Sciences. Federal University of Goiás, Esperança Avenue, Campus II, Goiania, GO, 74690-900, Brazil.

E-mail address: carlosxavier@ufg.br (C.H. Xavier).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.crf.2022.100410>

Received 7 August 2022; Received in revised form 31 October 2022; Accepted 3 December 2022

2665-9271/© 20XX

2019). However, beans are susceptible to hardening due to inadequate storage, likely resulting from exposure to high temperature and humidity that change physicochemical features and nutrient availability, thus turning the bean more resistant to cooking: the well-known Hard-to-Cook effect (HTC) (Siqueira et al., 2018). Considering the high protein content of hardened beans, it is feasible proposing this legume as a source of bioactive peptides, since the hardening process may rely on protease activation that hydrolyzes many proteins in smaller fragments capable of displaying biological activities (Costa et al., 2006; Luna-Vital et al., 2015; Rodrigues et al., 2022). Many peptides are found in their encrypted form and need to undergo hydrolysis processes to perform their functions (Lemes et al., 2016; Rodrigues et al., 2022; Valencia-Mejía et al., 2019). The possibility that peptides from HTC beans promote beneficial effects to health is supported by recent evidence obtained in different experimental models (Graziani et al., 2021; Ribeiro et al., 2019; Rodrigues et al., 2022).

Several sources of compounds that may have biological activities are considered health-promoting foods; such effects are likely reached by the bioactions of proteins and peptides on molecular targets expressed in different physiological systems (Durak et al., 2013; Gianfranceschi et al., 2018; Martínez-Sánchez et al., 2020). The biological activities of each peptide are settled by the amino acid composition, sequence, size, structure, type of amino acid found in the C and N terminal region, hydrophobicity and charge (Gianfranceschi et al., 2018; Lemes et al., 2016; Martínez-Sánchez et al., 2020). Due to their rich composition, peptides with anti-hypertensive potential are among the most studied molecules in the functional foods field (Martínez-Sánchez et al., 2020). Recently, we reported that a low molecular weight peptide fraction (<3 kDa) from *Phaseolus Vulgaris* beans (PV3) is antioxidant and is able to induce nitric oxide (NO) release in endothelial cells, thus evoking vasorelaxation in isolated aortic rings (Graziani et al., 2021). This necessitates further assessments using *in vivo* experimental models of hypertension and renal dysfunctions. Therefore, this study was aimed at evaluating the PV3 effects on renal and cardiovascular functions, and the mechanisms potentially involved in the hemodynamic effects of this pool of peptides extracted from hardened common bean. We also tested whether endothelial NO release contributes to the renal and antihypertensive effects of PV3.

2. Material and methods

2.1. Material

The material used in this study was supplied by the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) Rice and Beans, Santo Antônio de Goiás, Goiás. The beans supplied belong to the species *Phaseolus vulgaris*, cultivar Pontal, from the carioca commercial group. The methods described by Ribeiro et al. (2019) were of choice to harden the beans. From these HTC beans, the flours were produced with manually dehulled beans, passed in a knife mill and later sieved (500 µm). The flours were stored in sealed plastic bags and placed in a refrigerator at -20 °C.

2.2. Extraction of proteins and peptides

To extract the protein fractions, the methodology described by Ribeiro et al. (2019) was used. The material obtained, called extract 1 (E1), was lyophilized and stored at room temperature. Protein extracts were subjected to ultrafiltration in porous membrane ("cut-off" 3 kDa) (Amico Bioseparations). The ultrafiltration was conducted under nitrogen gas pressure (50 kgf/cm²). The filtrate with molecular weight below 3 kDa will be identified by the acronym PV3, as referred to the peptide fraction smaller than 3 kDa obtained from *Phaseolus vulgaris* hardened beans.

2.3. Systematic review

In order to check for a possible homology among the PV3 sequences recently reported by our group (Graziani et al., 2021) with other peptide sequences already reported in the literature, a comparative systematic review was performed. A data search was done using the principal indexing sources in the field: PubMed and ScienceDirect. The retrieving articles containing identifications or purifications of food-borne peptides with antihypertensive activity by using the keywords: "bioactive peptides", "food peptides", "bean peptides", "antihypertensive peptides" and "peptides sequencing" were selected. Following, we performed a comparison among sequences and amino acid fragments that were homologous to those reported by Graziani et al. (2021). As inclusion criteria, the motifs bigger than 5 amino acids were considered for peptide homology comparisons.

2.4. PV3 osmolarity

To perform the assay, 50 µl of PV3 in the concentration range (50–1000 µg mL⁻¹) and 150 µl of deionized water were used, and then the solution was placed in the equipment to take the reading. The osmolarity of the PV3 solution was determined after its freezing, by the micro-osmometer equipment (Precision Systems).

2.5. Determination of ions in protein extract

To determine the amount of sodium and potassium ions, enzymatic analysis sets (BioClin) were used, and the reaction was carried out in an automated biochemical analysis equipment (Wiener Lab Group-CM200).

2.6. Experimental design - *in vivo* and *ex vivo* assays

2.6.1. Animals

The experimental protocols were performed in accordance with the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) Experimental procedures involving animals were approved by the local Ethics Committee on Animal Use (Protocol CEUA/UFG 84/2018). We made all efforts to minimize the number of animals used. All experiments were performed in adult male Wistar (WT) and in spontaneously hypertensive rats (SHR) with 250–350 g and with the age group from 12th to 15th week, bred at the Central Animal Facility of the Federal University of Goiás.

2.6.2. Drugs

The drugs used were Sodium Heparin (Liquemine, 5000U.I mL⁻¹ – Roche Laboratories, Brazil); Sodium thiopental (THIOPENTAX®) (2.5%) (Cristália Ltda); Krebs-Henseleit nutrient solution (pH 7.4; composition in mM: NaCl - 130; NaHCO₃ - 14.9; KCl - 4.7; KH₂PO₄ - 1.18; MgSO₄ 7H₂O - 1.17; CaCl₂ 2H₂O - 1.6; glucose - 5.5); Sodium nitroprusside (1 µM); Phenylephrine (1 µM); Acetylcholine (10 µM), *N*_ω-nitro-L-arginine methyl ester (100 µM); Halothane (2% in 100% O₂; Cristália, Ltda).

2.6.3. Non-invasive systolic arterial pressure measurement

Tail plethysmography technique was used to assess the systolic arterial pressure (SBP) daily, during 3 days before starting treatments, in order check for the hypertensive and normotensive states of SHR and WT, respectively. Samplings were as follows. Animals were housed in a warming box at a temperature of approximately 36 °C for 15 min for caudal artery dilatation. The animal was placed in an individual box and a rubber cuff was placed at the base of the tail along with a pulse receiver, both coupled to a transducer and connected to the data acquisi-

tion system (Powerlab 4/25, ML0380/AD Instruments, Bella Vista, Australia). From the inflation and deflation of the cuff at regular intervals, the SBP was determined by the arithmetic mean of triplicate values from the same record. An average of these triplicates was considered the daily SBP value. Mean SBP resulted from the 3 days outcomes.

2.6.4. Experiment 1: PV3 effects on renal function, hydroelectrolytic balance and ingestive behaviors

WT and SHR (250g–350g) were distributed into 4 groups (n = 8 animals per group, according to their treatments) and housed in individual metabolic cages, with water and food *ad libitum*, similar to the used in our previous studies (Rodrigues et al., 2022; Sales da Silva et al., 2020). After 24 h of adaptation, water and food were replaced for experimental analysis. Following, animals received intraperitoneal injection with vehicle (NaCl 0.9%) or PV3 at doses of 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 2.5 and 5 mg kg^{-1} that were an extrapolation of those from Valencia-Mejía et al. (2019). In the next day after treatments, urine volumes were measured at the end of the stage and stored for biochemical tests, feces and food were weighed, followed by water volume measurement. Animals were then euthanized through an overdose of anesthesia (40 mg kg^{-1} , i.p) with sodium thiopental (2.5%), followed by blood sampling (5 mL) with heparinized syringes and transferred to heparinized microtubes (0.1 mL heparin - 5000 I.U. mL^{-1}). The collected blood was centrifuged at 5000 rpm and the plasma was taken for biochemical analysis.

The uric acid, creatinine, urea, sodium, and potassium were analyzed in plasma and urine samples using a commercial kit (Bioclin) and chemical reactions were performed in an automated clinical analysis equipment (Wiener Lab - CM 200). The following calculations were performed: Creatinine Clearance (mL min^{-1}) = [Urinary Creatinine (mg dL^{-1}) x *DF x Urinary Volume/min/Plasma Creatinine (mg dL^{-1})]; *DF = Dilution factor. Glomerular filtration rate (mL min kg^{-1}) = [Creatinine clearance (mL/min)/Weight (Kg)].

2.6.5. Experiment 2: PV3 effects on vascular reactivity

This experimental series aimed to assess the PV3 effects on vasomotion of renal arteries. Renovascular reactivity was determined in an organ bath setting, as previously described by Machado et al. (2021). Animals were euthanized by decapitation using a guillotine. Then the renal arteries were carefully dissected, quickly removed, and placed in ice-cold modified Krebs-Henseleit solution (4 °C) [composition (in mM): 130 NaCl, 14.9 NaHCO_3 , 4.7 KCl, 1, 18 KH_2PO_4 , 1.17 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.5 glucose, 1.56 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.026 EDTA], gassed with 5% CO_2 /95% O_2 to maintain a pH of 7.4. Arteries were cleared of adherent fat and connective tissue and were mounted on a force transducer placed in an organ bath with modified Krebs-Henseleit solution at temperature adjusted to 37 °C. Rings were initially loaded with 1.5 g of tension (basal tension) by incremental application over 30 min and then equilibrated for a further 30–40 min before the start of the studies. The Krebs-Henseleit solution was changed every 15 min. Changes in basal tension were recorded by isometric transducers connected to an AQCAD data acquisition system (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brazil).

To verify the contractile status of the renal artery, endothelial function was evaluated by testing the relaxing effect of acetylcholine (ACh, 10 μM) in vessels contracted with phenylephrine (Phe, 1 μM). Renal arteries with a vasodilator response to ACh greater than 90% were considered vessels with intact endothelium. In another set of experiments, renal arteries were subjected to intimal surface friction and a maximum of 10% relaxation to ACh in the vessel rings were considered endothelium denuded.

After 30 min of equilibration, cumulative concentration-response curves for PV3 were made (0.0001–10 mg mL^{-1}) and preparation was performed with intact endothelium (E +) and endothelium - denuded (E -). To assess the endothelial pathway of nitric oxide synthases (eNOS), renal arteries were pretreated with the NOS inhibitor nitroarginine methyl ester (L-NAME, 100 μM) for 30 min. After incubation, con-

centration-response curves were tested for PV3 (0.0001–10 mg mL^{-1}), when the contractile response reached a plateau, the CCE curve for PV3 was constructed.

2.6.6. Experiment 3: PV3 effects on hemodynamics

WT and SHR were anesthetized initially with halothane (2% in O_2 100%; Tanohalo; Cristalia, Itapira, SP, Brazil). The right femoral vein was cannulated for infusion of urethane (1.2 g kg^{-1} , iv., Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The right femoral artery was catheterized to record pulsatile arterial pressure, from which mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were calculated. After trichotomy of the left lateral flank, the retroperitoneal region was surgically accessed to expose the abdominal aorta, left kidney and renal artery. Miniature probes (T206 Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, USA) were set around aorta (2.0 R B) and left renal artery (1.5 R B) to record aortic (ABF) and renal blood flow (RBF), respectively. Throughout the experiment, the body temperature was maintained between 36 and 37 °C with the aid of a heating pad.

The RBF and ABF were recorded by transit time flowmetry as described by Pedrino et al. (2006). Miniature probes were connected to a T206 flowmeter (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, USA), which allows determining the flow in absolute values (mL.min^{-1}). The signals obtained were sent to the MP150 data acquisition and analysis system (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, USA). To calculate vascular resistance (RV), mean arterial pressure (MAP) and blood flow (BF) values were considered for the aorta and renal arteries. The RV calculation equation is shown below:

$$\text{VR} = \text{MAP}/\text{BF} \quad (\text{Eq.1})$$

Initially doses of 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 2.5 mg kg^{-1} and 5 mg kg^{-1} of PV3 were injected i.v, and the parameters MAP, HR, renal vascular resistance (RVR) and aortic vascular resistance (AVR) were sampled for 5 min. After PV3 i.v injection, these hemodynamic parameters were recorded for the subsequent 30 min. Points for analyses were from segments collected every 10 s.

2.7. Statistical analyses

Results were expressed as mean \pm error of the mean. We used two-way analysis of variance (Two-Way ANOVA) as appropriate (see legend of each figure), using the GraphPad Prism 8 software. Statistical significance was considered when * $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Comparison with database (Pre-molecular modeling)

Homologous sequences were considered for peptides with antihypertensive activities and composed by residues of up to 5 amino acids, with coincident motifs placed at either the end or within the chain. Descriptions on polarity were not a criterion. Literature search, as of 2021/December, brought up peptides that are considerably homologous to the PV3-containing amino acid primary sequences, as reported in our previous study (Graziani et al., 2021). These homologies were found in peptides from other food sources (Table 1).

3.2. PV3 osmolarity

Hyperosmotic fluids are known for changing tonicity and cell responses (Usach et al., 2019; Wang, 2015; Wermeling et al., 1985). Therefore, we assessed the osmolarity of crescent PV3 concentrations, ranging from that of choice for treatments, to 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The results showed that the PV3 extract has low osmolarity, with values lower than that of body fluids even at the highest concentration tested (Fig. 1).

Table 1
Comparison of amino acid sequences found by our study group with amino acid sequences found by other authors.

Peptide sequence present in PV3	Peptides found in the literature		
	Sequence	Food	Reference
DYGAELPPR	DY	Bamboo shoot	Liu et al. (2013)
DPLPDKNR	PLP	Milk	Sánchez-Rivera et al. (2016)
DFSETSGPPGSDK DPGPPPGETPR	GPP	Soybean	Ma et al. (2006b)
NKFYGWR	FY	wakame	Suetsuna et al. (2004)
QHAEGLPDQQR	GLP	Salmon skin	Lee et al. (2014)
TSLVGEEEEQDR	EEEEES	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
TVGEVSEEGQQRK EQEVSEEGKQRDK TVGEVSEEGQQRK	VSE	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
QPVKVSTPTLVEVSR	EV	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
EQEVSEEGKQRDK	EV	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
QDEVKEVQR	EV	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
QLAVTQVPTLVEVSR	EV	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
EQEVSEEGKQRDK	EV	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
EMEVR	EV	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
KEVESEETDPR	EV	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
QDEVKQVER	EV	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
TAFNAAEVNSK	EV	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
EYLTPDNK	EY	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
EYNKATGR	EY	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
QLAVTQVPTLVEVSR	AVT	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
DFDTEEEPVDK	DF	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
SSSTEDFFSK	DF	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
DFSETSGPPGSDK	DF	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
QKTALVELLK	ELL	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
ELLER	ELL	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
LHVFSFDHEQRR	SF	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
VAAFALVPVKGAAADR	AF	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
TAFNAAEVNSK	AF	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
WLGYYAVSVLLLR	VLL	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
MNGPLL	PLL	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
SYLQGF	GF	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
GFVLELR	GF	Common Bean	Tagliazucchi et al. (2015)
NKFYGWR	KY	Wakame seaweed	Suetsuna et al. (2004)
NKFYGWR	FY	Wakame	Suetsuna et al. (2004)
VLSPNRGGDLK	DG	Soybean	Wu and Ding (2002)
SSSEEPNVDGSK	DG	Soybean	Wu and Ding (2002)
NKFYGWR	KFYG	Wakame	Suetsuna and Nakano (2000)

Table 1 (continued)

Peptide sequence present in PV3	Peptides found in the literature		
	Sequence	Food	Reference
QDSSLSPPTPAGK	LSP	Corn	Puchalska et al. (2012)
VLSPNRGGDLK	LSP	Corn	Puchalska et al. (2012)
QAAYFGWR	AY	Corn flour	Yang et al. (2007)
NKFYGWR	GW	Soy sauce	Nakahara et al. (2010)
QAAYFGWR	AY/GW	Soy sauce	Nakahara et al. (2010)
SYLQGF	SY	Soy sauce	Nakahara et al. (2010)
WLGYYAVSVLLR	GY	Soy sauce	Nakahara et al. (2010)
RPMTVGYK	GY	Soy sauce	Nakahara et al. (2010)
VAAFALVPVKGAAADR	AF	Soy sauce	(Nakahara et al., 2010; Zhu et al., 2008)
TAFNAAEVNSK	AF	Soy sauce	(Nakahara et al., 2010; Zhu et al., 2008)
TSLVGEEEEQDR	VG	Soy sauce	Nakahara et al. (2010)
RPMTVGYK	VG	Soy sauce	Nakahara et al. (2010)
LVGELHDPVK	VG	Soy sauce	Nakahara et al. (2010)
NTFDEEEHSSR	TF	Wheat bran	Nogata et al. (2009)

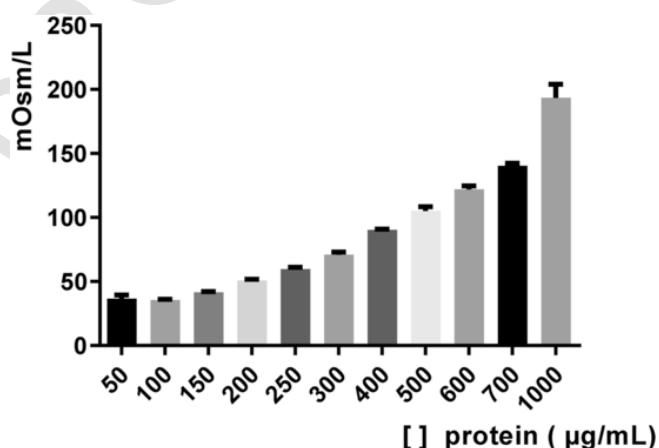


Fig. 1. Evaluation of PV3 osmolarity in the concentrations ranging from 50 to 1000 µg mL⁻¹ following dilution in deionized water. Values are expressed as mean ± standard error.

3.3. Quantification of sodium and potassium ions in PV3

PV3 at concentration of 313 µg mL⁻¹ was chosen to assess the amount of sodium and potassium in the solution. We found 251.9 mmol L⁻¹ of sodium ions and 69.6 mmol L⁻¹ of potassium ions within PV3 extract.

3.4. PV3 effects on kidney function

Tail plethysmography was attempted before starting experiments to confirm the hypertensive state of SHR, as an inclusion criterion. As expected, all SHR were indeed hypertensive, as shown by the mean values of their systolic pressure (192.5 ± 7.9 mmHg). These values significantly differ (*P* < 0.05) from those sampled in WT (117 ± 8 mmHg).

Fig. 2 shows the results obtained in WT and SHR treated with PV3 at different doses. PV3 (50 mg kg⁻¹) reduced food intake in SHR (Fig. 2A), which reflected in reduction in feces excretion in this same group (Fig. 2B). Water intake was increased in WT treated with PV3 (Fig. 2C) and this resulted in augmentations of urinary excretion (Fig. 2D). As expected, body weight was not changed by a single acute PV3 injection (Fig. 2E).

It was observed that PV3 reduced plasma creatinine at the doses tested in WT and SHR (Fig. 3A). Regarding urinary creatinine levels, it was observed that PV3 increased creatinine values at a dose of 5 mg kg⁻¹ in SHR. (Fig. 3B). Results from creatinine clearance evidenced that PV3 increased clearance at doses of 50 µg kg⁻¹, 2.5 and

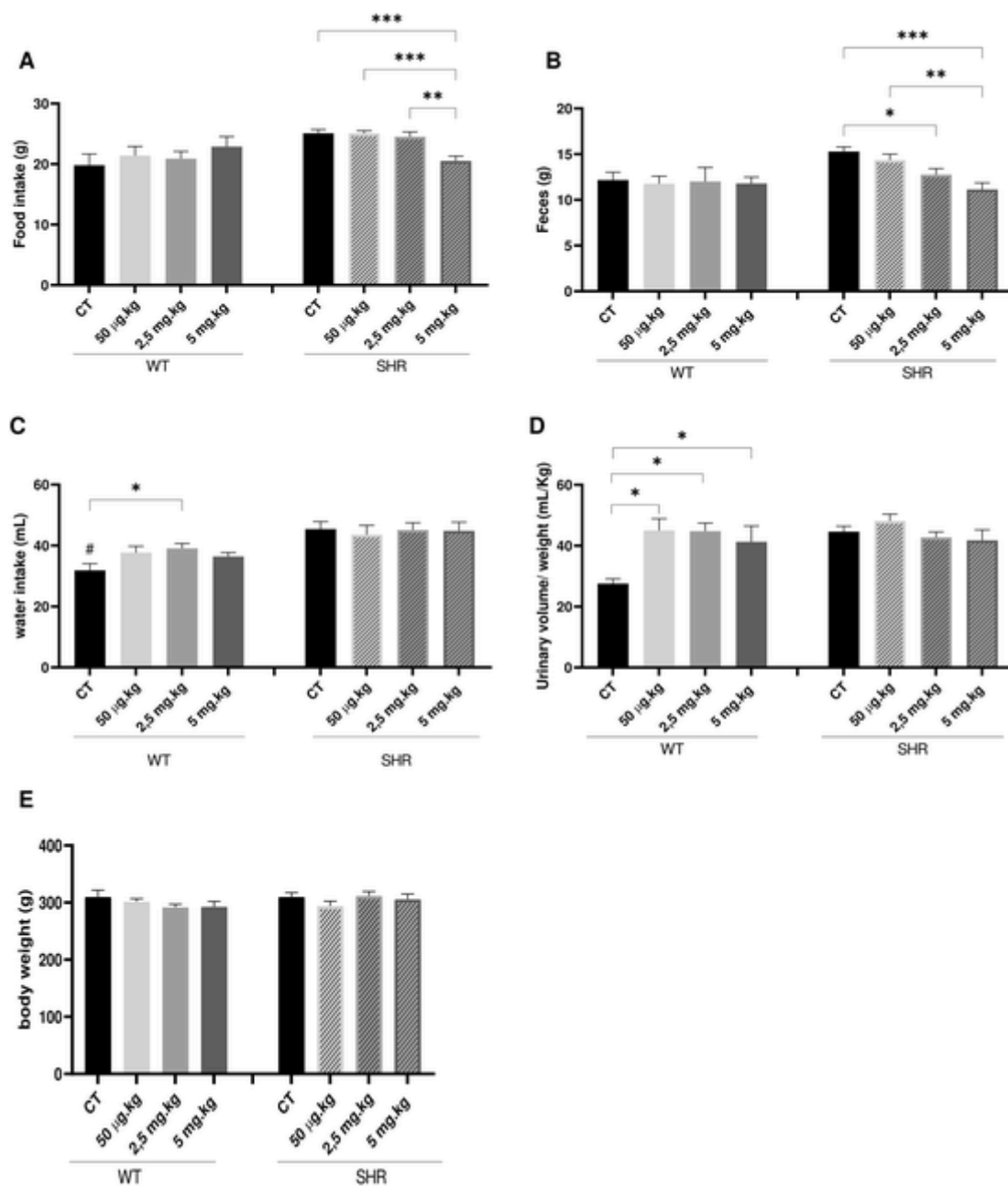


Fig. 2. Metabolic parameters measured 24 h after injections of vehicle (CT), PV3 at doses of 50 µg kg⁻¹, 2.5 mg kg⁻¹, 5 mg kg⁻¹ in WT and SHR. **A** – Food intake (g); **B** – Feces (g); **C** – Water intake (mL); **D** – Urinary volume (mL) **E** – Body weight (g). **P* < 0.05 indicates statistical difference between the bars indicated by the bracket extremities. **P* < 0.05 indicates statistical difference between the bars indicated by the bracket extremities. #*P* < 0.05 indicates that the bar of SHR with # symbol differs statistically from WT that underwent the same experimental condition. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

5 mg kg⁻¹ in the normotensive condition. PV3 increased creatinine clearance at a dose of 50 µg kg⁻¹ in the hypertensive condition (Fig. 3C).

Interestingly, PV3 reduced plasma sodium levels in SHR at doses of 2.5 and 5 mg kg⁻¹ (Fig. 4A), which was concomitant to an augmented sodium excretion in SHR (Fig. 4B). Plasma and urinary potassium levels were reduced by PV3 at doses of 2.5 and 5 mg kg⁻¹ in the hypertensive condition. PV3 increased SHR potassium excretion when compared to the effects in WT at a dose of 2.5 mg kg⁻¹ (Fig. 4D), indicating a natriuretic effect of PV3.

3.5. PV3 effects on arterial renovascular reactivity

The results show that PV3 dilated the isolated renal artery rings with preserved endothelium from WT (47.8 ± 2.5%) and SHR (41 ± 8.7%) (Fig. 5A and B). The results also show a significant difference when comparing the two animal models used, where renal artery rings from WT rats were more prone to vasorelaxation than those from SHR (Fig. 5A).

Following the assessment of PV3 vasorelaxant effects on renal artery rings, we investigated whether such effects would depend on constitutive pathways of the endothelium. Endothelium denuded rings from WT and SHR revealed a loss of PV3 effect (E.max: 3 ± 1.8% in WT and 6.6 ± 3.3% in SHR) (Fig. 6A and B), thus demonstrating that the PV3 actions depend on the endothelium. The next step was to test for the ox-

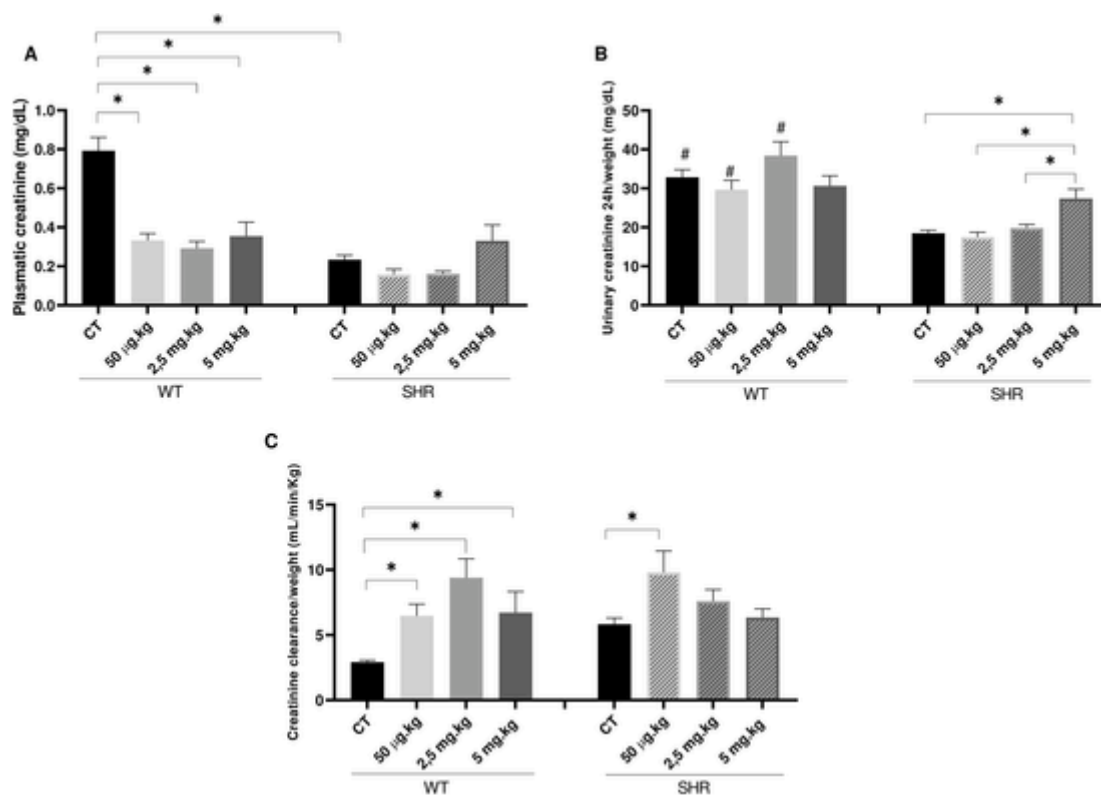


Fig. 3. Plasma and urinary creatinine levels measured 24 h after injections of control (CT), PV3 at doses of 50 µg kg⁻¹, 2.5 mg kg⁻¹, 5 mg kg⁻¹ in WT and SHR. **A** – Plasma creatinine (mg dL⁻¹); **B** – Urinary creatinine 24 h/weight (mg dL⁻¹); **C** – Creatinine clearance weight 24 h **P* < 0.05 indicates statistical difference between the bars indicated by the bracket extremities. #*P* < 0.05 indicates that the bar of SHR with # symbol differs statistically from WT that underwent the same experimental condition. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

idonitric pathways involvement. The incubation of renal artery rings with the NOS enzyme inhibitor (L-NAME, 100 µM) abolished the PV3-induced vasorelaxation (E max: 2.8 ± 1.2% in WT and 8.9 ± 4.66% in SHR) (Fig. 6C and D).

3.6. PV3 effects on hemodynamics

After a 10-min period of stabilization of cardiovascular parameters, MAP levels sampled in SHR were higher than WT, confirming the hypertensive state of this strain. Just after PV3 injection, a transient MAP reduction was observed in WT and SHR (Fig. 7A). In WT, the mean maximal reduction was 36.8 ± 9% for the dose 2.5 mg kg⁻¹ and 43.3 ± 4.5% for dose the 5 mg kg⁻¹, while for SHR the reduction was 14.5 ± 7.1% for the 2.5 mg kg⁻¹ dose and 22 ± 8.4% for the 5 mg kg⁻¹ dose (Fig. 7B). Converse, PV3 was unable to cause a significant difference in cardiac chronotropy of WT and SHR strains (Fig. 7C and D).

PV3 reduced vascular resistance in both renal artery and aorta of WT and SHR throughout the recording period (Fig. 8A and C). When evaluating the renal vascular resistance, a reduction of 18.6 ± 4.6% and 29.1 ± 2.5% was observed for the doses of 2.5 and 5 mg kg⁻¹ in WT, respectively. SHR, in turn, displayed reductions of 23.88 ± 2.9% and 36.8 ± 6.2% for the same aforesaid doses, respectively (Fig. 8B). In WT, the magnitude of aortic resistance reductions was 32.4 ± 4.7% and 40.5 ± 2.5% for the doses of 2.5 and 5 mg kg⁻¹, while in SHR the two doses caused reductions of 23.5 ± 3.6% and 30.3 ± 6.8% respectively (Fig. 8D).

4. Discussion

The World Health Organization (WHO) emphasizes the importance of consuming foods that are rich in bioactive molecules for the control

of cardiovascular diseases and comorbidities (WHO, 2020). These desired health promoting effects may be reached by consuming beans, which upkeeps the interest in the field (Hartmann and Meisel, 2007; Los et al., 2018). The main results of this study are: I) PV3 sequences are homologous to several amino acid sequences from food sources already known for their antihypertensive activities; II) PV3 is not hyperosmolar; III) PV3 caused a relaxant effect on renal artery that is dependent on the endothelium and relies on oxidonitric pathways; IV) PV3 caused a natriuretic effect in the hypertensive strain; V) PV3 increased creatinine clearance; VI) PV3 reduced the arterial pressure and this was concomitant to a reduction in vascular resistance in the aortic and renal vascular beds.

Proteins and peptides have a unique amino acid sequence that confers a three-dimensional structure that favors a binding for molecular targets, consequently exerting their biological functions (Rutherford-Markwick, 2012). According to Nelson and Cox (2014), the comparison of functionally similar proteins and peptides from different species may indicate the presence of motifs likely conserved throughout evolution. Thus, there is an intimate link between the protein's primary structure and its function, thus supporting the search for homologies in peptide from different sources. As reported by Nakahara et al. (2010), the dipeptides GW, AY, SY, GY and VG showed a hypotensive effect via ACE inhibition, with IC₅₀ values ranging between 30 µg ml⁻¹ (for GW peptide) and 1100 µg ml⁻¹ for VG. This varying effectiveness of ACE inhibition was related to the amino acid primary structure and is closely associated with the presence of amino acids with hydrophobic groups in their side chains (Aluko, 2015; Tagliazucchi et al., 2015; Yokoyama et al., 1992). Since the aforesaid dipeptide are within some of the bean-derived previously sequenced (NKFYGWR, QAAYFGWR, SYLQGFSK, WLGYAVSVLLR, RPMTVGYK, TSLVGEEESQDR, RPMTVGYK and LVGGELHDVPK) it is worth proposing an ACE inhibitory effect resulting in the depressor effect herein reported. From the PV3 sequencing

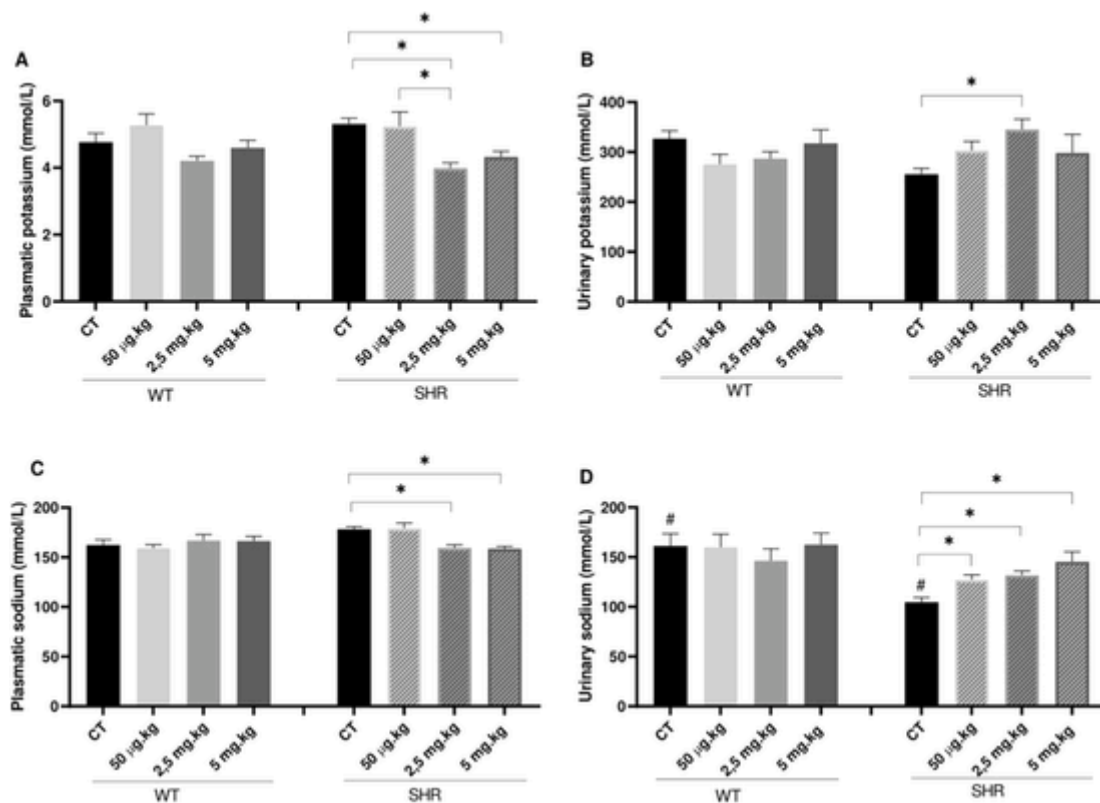


Fig. 4. Plasma and urinary levels of Na⁺ and K⁺ measured 24 h after injections of control (CT), PV3 at doses of 50 µg kg⁻¹, 2.5 mg kg⁻¹, 5 mg kg⁻¹ in WT and SHR. A – Plasma sodium (Na⁺) (mmol L⁻¹); B – Plasma potassium (K⁺) (mmol L⁻¹); C – Urinary sodium (Na⁺) (mmol L⁻¹); D – Urinary potassium (K⁺) (mmol L⁻¹). *P < 0.05 indicates statistical difference between the bars indicated by the bracket extremities. #P < 0.05 indicates that the bar of SHR with # symbol differs statistically from WT that underwent the same experimental condition. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

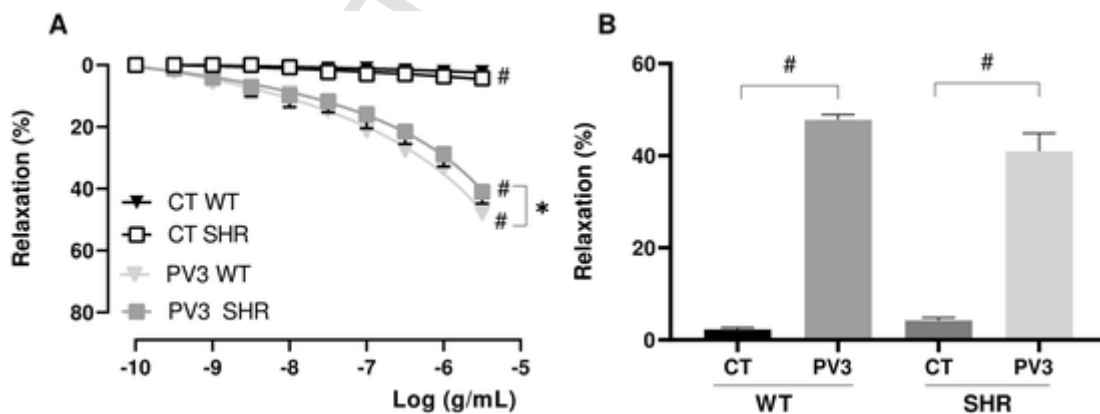


Fig. 5. Vasorelaxant effect of PV3 on renal artery rings of WT and SHR. A-vasorelaxant effect of PV3 on endothelium-preserved renal artery rings of WT and SHR (E+). B - maximum effect values. Values are expressed as mean ± SEM of 4–5 animals per group. Results were expressed as mean and standard error for 4–5 animals per group. Comparison of models used by Two-Way ANOVA analysis followed by Sidak post-test. *P < 0.05 WT vs. SHR. #P < 0.05 Control vs PV3.

made by Graziani et al. (2021), tripeptides and peptides homologous to other reports in the literature were obtained, such as the scrambled sequences GPP, LSP, KFYG, GLP and PLL present in the peptides DFSETS-GPPGSDK, DPGPPPGETPR, QDSSLSPETPAGK, VLSPNRGDGLK, NK-FYNGPLPDWRQ, MNGPLLR. These are also correlated to different mechanisms resulting in antihypertensive activity. Ma et al. (2006a) studied peptides from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and observed that the tripeptide GPP has an ACE inhibitory activity. Puchalska et al. (2012) reported that the LSP sequence reduced blood pressure. However, KFYG seem to be unrelated to cardiovascular effects (Suetsuna et al., 2004). The essential characteristics for a peptide to present antihy-

pertensive activity support the pool of peptides present in PV3 as good candidates for the control of this cardiovascular disease.

Osmolarity was measured in order to exclude the possibility that hypertonicity would aid PV3 effects. We found that PV3 is hypoosmotic, thus knocking down the chances that a possible hyperosmotic fluid would underly the effects that indeed rely only on PV3 peptidergic content. Wang stated that the solutions to be injected in the intramuscular or subcutaneous routes must present an osmolarity below 600 mOsm kg⁻¹ and for intravenous injections, it must be below 1000 mOsm kg⁻¹ (Wang, 2015). In this regard, the PV3 doses and concentrations are within the recommended range, since 1 mg mL⁻¹ of PV3 contains 180 mOsm L⁻¹. Another factor regarding the PV3 tonicity was the sodium

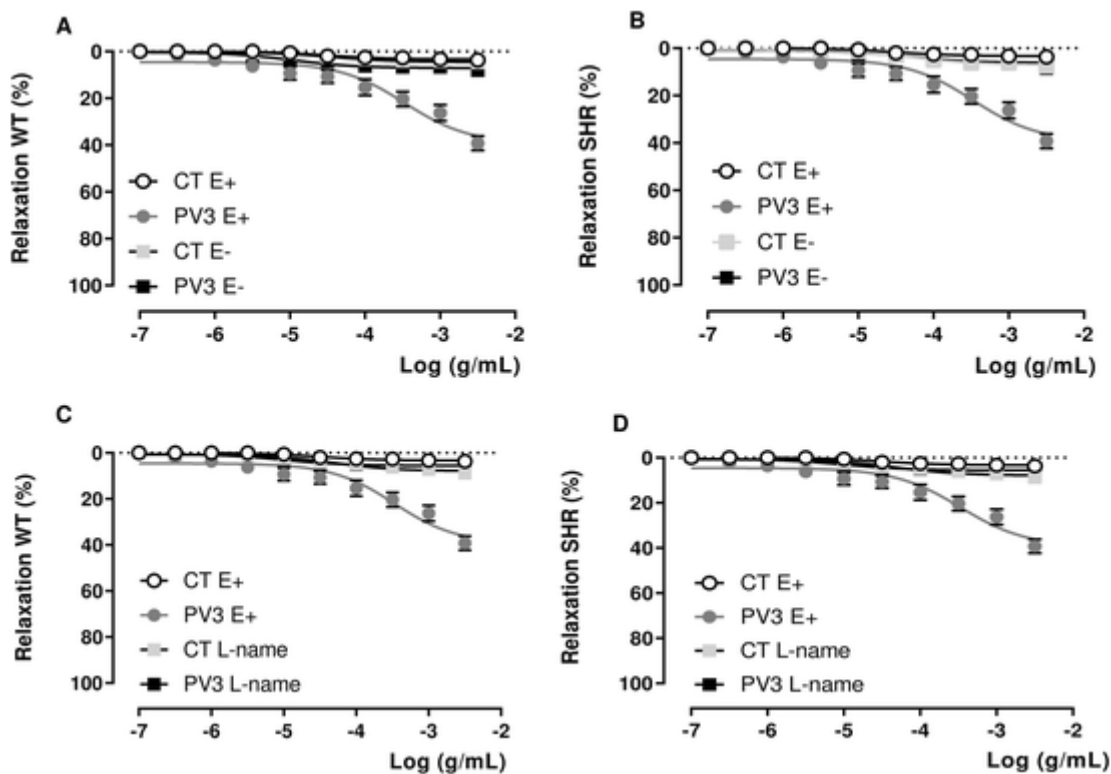


Fig. 6. Evaluation of endothelial involvement in the PV3 vasorelaxant effect in renal artery rings. **A** and **B**- evaluation of endothelial involvement in the PV3 vasorelaxant effect in renal artery rings extracted from WT and SHR. The abbreviations E+ represents the preservation of the endothelium and E- represents the preservation of the endothelium. **C** and **D**-assessment of NOS pathway involvement in endothelium-dependent vasorelaxant effects evoked by PV3 in renal artery rings extracted from WT and SHR. Values are expressed as mean \pm SEM of 4-5 animals per group. Results were expressed as mean and standard error for 4-5 animals per group. Comparison of models used by Two-Way ANOVA analysis followed by Sidak post-test. * $P < 0.05$ WT vs. SHR.

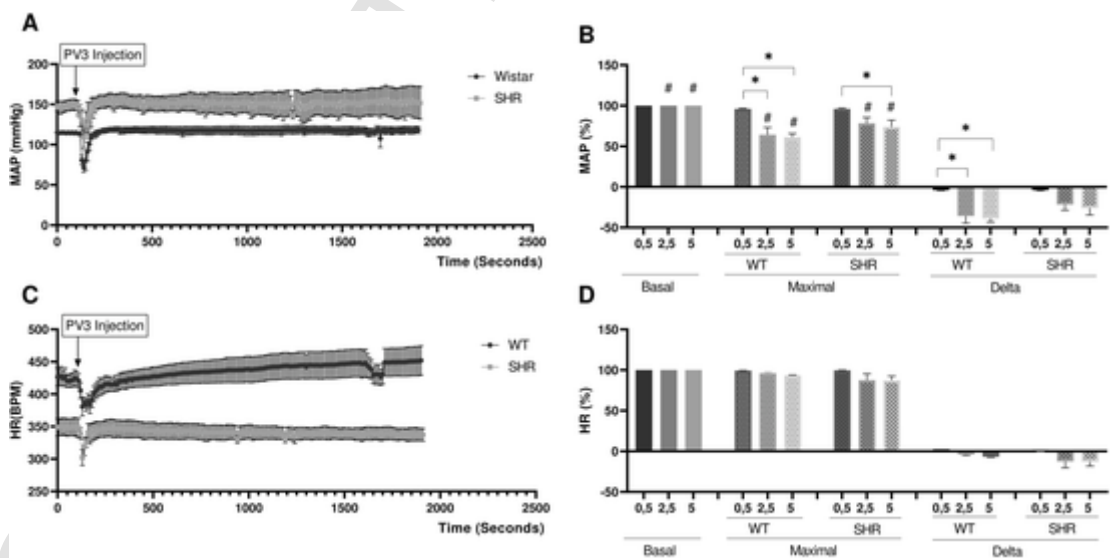


Fig. 7. Changes in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) changes caused by PV3 injection in WT and SHR. **A** - PV3 effects on the mean arterial pressure over the time of recording at a dose of 5 mg kg^{-1} in WT and SHR, and in **B**, the basal values, maximum responses, and deltas of the doses of 0.5 ; 2.5 and 5 mg kg^{-1} on blood pressure (%) of WT and SHR. In **C**, the effect of PV3 on heart rate over time of recording at a dose of 5 mg kg^{-1} in WT and SHR, and in **D**, the basal values, maximum responses, and deltas of PV3 0.5 ; 2.5 and 5 mg kg^{-1} on heart rate (%) of WT and SHR. Values are expressed as mean \pm standard error ($n = 5$). * $P < 0.05$ indicates statistical difference between the bars indicated by the bracket extremities. # $P < 0.05$ indicates that the bar of SHR with # symbol differs statistically from WT that underwent the same experimental condition. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

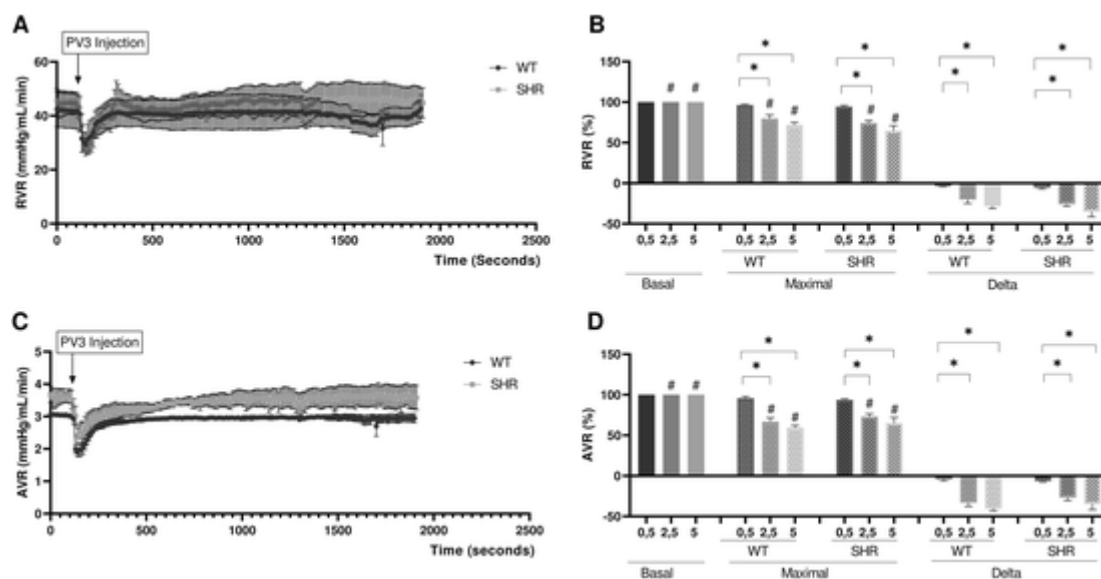


Fig. 8. Changes in vascular resistance in renal and aorta arteries following PV3 injection in WT and SHR. **A**– PV3 effects on the renal vascular resistance over the time of recording at a dose of 5 mg kg⁻¹ in WT and SHR, and in **B**, the basal values, maximum responses, and deltas of the doses of 0.5; 2.5 and 5 mg kg⁻¹ on renal vascular resistance (%) of WT and SHR. In **C**, the effect of PV3 on aorta vascular resistance over time of recording at a dose of 5 mg kg⁻¹ in WT and SHR, and in **D**, the basal values, maximum responses, and deltas of PV3 0.5; 2.5 and 5 mg kg⁻¹ on vascular resistance aorta (%) of WT and SHR. Values are expressed as mean ± standard error (n = 5). Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. **P* < 0.05 baseline vs. maximum responses.

and potassium contents: the values of sodium and potassium in PV3 (1 mg mL⁻¹) were 251.9 and 69.6 mmol L⁻¹, respectively, which are still considered within the isotonic range (Wermeling et al., 1985).

PV3 at dose of 5 mg kg⁻¹ affected the food intake of SHR. This finding is similar to that found by Marczak et al. (2006), which reported that orally given hydrolyzed canola peptides reduced food intake in mice through cholecystokinin (CCK) system mechanisms. Another report shows that soybean peptides display similar effects. These peptides are called soy morphine that display anxiolytic and anorexigenic activities probably by acting on μ -opioid receptors (Kaneko et al., 2010). The reduction in the ingestive behavior caused by PV3 can be also derived from the presence of peptides acting as enzyme inhibitors. Protease inhibitors (i.e., trypsin/chymotrypsin inhibitors) are likely to retard the digestion process and increase the satiety hormones (i.e., CCK), which reduces food intake (Samtiya et al., 2020). When analyzing the amount of feces of the animals, the same pattern was noticed: there was a decrease in feces excretion in SHR treated with PV3 at the doses of 2.5 and 5 mg kg⁻¹ and this coincided with a reduced ingestive behavior.

Interestingly, water intake was increased in PV3-treated WT and as expected, rats intaking more water had increases in urinary volume. This suggests that PV3 was unable to affect drinking behavior in the hypertensive condition, already known for being altered in the SHR (Sales da Silva et al., 2020) strain that is well reported as an experimental model with modifications in health status (Dickhout and Lee, 1998). On the other hand, it is worth suggesting that PV3 preserves the drinking capacity of normotensive animals, since the changes in arterial pressure linked to diminishments in blood volume and to augmentations in urinary excretion caused by PV3 are expected to produce the dipsogenic responses we found ().

Creatinine clearance virtually reflects the glomerular filtration rate (GFR) (). We observed that GFR was increased in WT and SHR treated with PV3. Our results also show that PV3 increased the vascular conductance in the renal artery. Altogether, these findings are consistent evidence that PV3 is able to increase filtration through renovascular dilatory mechanisms. This combination allows inferring that PV3 effects upon pressure results from reductions in intravascular volume and from direct effects on vasomotion. Again, these positive effects raise

PV3 as a potential nutraceutical capable of treating cardiovascular diseases in which nephropathies are present.

SHR strain develops hypertension and the consequent damages in target organs, mainly in kidneys (Hultström, 2012). They also present exaggerated retention of salt and water due to reductions in both GFR and urinary sodium excretion that can be caused by abnormalities in several transport mechanisms, especially those existing in the proximal tubule (Ortiz and Garvin, 2001). In this study, while the hypertensive strain injected with all PV3 doses exhibited increases in Na⁺ excretion, the potassium excretion was changed only in animals injected with PV3 at the dose of 2.5 mg kg⁻¹. This finding is positive for the treatment of hypertension since ion handling may contribute to fluid tonicity and intravascular volume; the latter is variable directly determining pressure. A possible mechanism determining PV3 effect is through an allosteric modulation of Na⁺/K⁺-ATPase pump. Besides, it is worth considering the inhibition of sodium channels and the resulting decreases in sodium reabsorption. Whether PV3 may interfere with the tubular mechanisms such as the activity of Na⁺/K⁺-ATPase pump remains to be confirmed in further studies.

The PV3 ability to promote a relaxing effect on the renal artery extends the knowledge reported by Graziani et al. (2021), which investigated similar features in aorta. It is known that increases in pressure and shear stress in the microvasculature lead to premature vascular aging and decreases the potential of relaxant molecules released from endothelium (Anishchenko et al., 2015; Konukoglu; Uzun., 2017). This same study of Graziani et al. (2021) showed PV3 oxidonitrergic effects in endothelial cells, which extends our current data showing that PV3 dilates renal beds. Such effect relies on endothelium-dependent NO pathways, thus revealing the vascular mechanism through which PV3 is reaching cardiovascular and renal effects. This oxidonitrergic recruitment may be related to ACE inhibition (Tagliazucchi et al., 2015) that, by implication, may reduce bradykinin degradation, thus boosting endothelial kininergic NO-related paths. Furthermore, it cannot be neglected the possibility that PV3 antioxidant effects may display a protection against the hypertension-related vascular aging (Graziani et al., 2021; Lee et al., 2021; Los et al., 2018). Nevertheless, additional studies attempting chronic treatments are necessary to unravel whether PV3 is angioprotective.

Following on from the premise that vasorelaxation may be an endothelium-dependent measure of vascular function, the vasoactive effect of PV3 on the renal artery with preserved endothelium was evaluated. The results showed that PV3 induced the dilation of renal artery in WT and SHR; however, the magnitude of this effect was significantly attenuated in SHR. It is necessary to keep in mind that SHR is an experimental model of endothelial dysfunction-related hypertension (Konukoglu and Uzun, 2017). The PV3-evoked vasorelaxation was confined to endothelial preserved arterial rings and this excludes the involvement of pathways other than those dependent on the endothelium and on primary targets expressed in subendothelial vascular smooth muscle layers. Therefore, these effects support the proposition that PV3 can be an alternative therapy to improve vascular function, with the positive circulatory effects that go far beyond those involving the dynamics of fluid handling and pressure.

In this work, the mechanisms involved in vascular tone (vasomotion) modulation and in medium and long-term circulatory regulation through renal function were evaluated. After observing vasorelaxant effects in renal artery (*ex vivo*), natriuretic effect and the GFR increases (*in vivo*), we conducted complementary experiments in WT and SHR to evaluate the PV3 effect on vascular conductance/resistance. The data show that PV3 reduced the MAP of WT and SHR at the doses tested (2.5 and 5 mg kg⁻¹) and did not change the HR at all doses tested. Literature have reported that other positively charged food-borne peptides that have hydrophobic amino acids display hypotensive effect (Martínez-Sánchez et al., 2020). These are some of the chemical features of PV3 peptides (Graziani et al., 2021). Although the PV3 antihypertensive effects coincide with those reported for homologous peptides extracted from other food sources, this study is the first to unravel the effects and the mechanisms underlying hemodynamic, renovascular and endothelial actions of peptides derived from hardened beans.

5. Conclusions

In conclusion, PV3 exerts an antihypertensive activity that is related to the vasorelaxation of renal arteries through endothelial and oxidonitric pathways. Furthermore, PV3 provokes natriuresis and increases glomerular filtration rate, which jointly culminate in pressure decreases. Such findings are relevant for the molecular and physiological study of bioactive food-borne peptides, since the literature is scarce about the mechanisms underlying the aforesaid effects. Current results further strength the use of hardened beans considered agro-industrial residues in nutraceutical formulations targeted to the control and management of diseases such as hypertension and associated nephropathies.

Submission declaration

The work has not been published previously, except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis. The submitted version of this manuscript is approved by all authors, is not under consideration for publication elsewhere and, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder.

Funding sources

Ongoing research from all authors are supported by CNPq, CAPES, FAPESP and FAPEG. Katia Flávia Fernandes – CNPq (317231/2019-9 and 426898/2018-4). Karla Batista – CNPq (426284/2016-0). Carlos Xavier – Chamada colaborativa FAPEG/FAPESP 2019 and CNPq (Universal Faixa B – 404079/2021-0).

Uncited references

CRediT authorship contribution statement

Juliana Vila Verde Ribeiro : Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Visualization. **Daniel Graziani** : Methodology, Formal analysis, Software, Writing – review & editing. **Jhulle Horrane Moreira Carvalho** : Methodology, Formal analysis, Investigation. **Michelle Mendanha Mendonça** : Methodology, Formal analysis. **Lara Marques Naves** : Methodology, Formal analysis. **Helton Freires Oliveira** : Methodology, Formal analysis. **Hericles Mesquita Campos** : Methodology, Formal analysis. **Maria Clorinda Soares Fioravanti** : Methodology, Formal analysis. **Lilian Fernanda Pacheco** : Resources. **Patricia Maria Ferreira** : Conceptualization, Formal analysis. **Gustavo Rodrigues Pedrino** : Resources, Methodology, Formal analysis. **Paulo César Ghedini** : Resources, Methodology, Formal analysis. **Kátia Flávia Fernandes** : Resources, Conceptualization, Writing – review & editing. **Karla de Aleluia Batista** : Conceptualization, Resources, Project administration, Writing – review & editing. **Carlos Henrique Xavier** : Conceptualization, Resources, Supervision, Project administration, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Aluko, R.E., 2015. Antihypertensive peptides from food proteins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 6, 235–262. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015520>.
- Anishchenko, A.M., Aliev, O.I., Sidekhenova, A.V., Shamanaev, A.Y., Plotnikov, M.B., 2015. Dynamics of blood pressure elevation and endothelial dysfunction in SHR rats during the development of arterial hypertension. *Bull. Exp. Biol. Med.* 159, 591–593. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-3020-8>.
- Batista, K.A., 2014. Aplicações biotecnológicas de feijões endurecidos. *Biotechnological applications of hardened beans*.
- Batista, K.A., Prudêncio, S.H., Fernandes, K.F., 2010. Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard-to-cook common beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *J. Food Sci.* 75, C286–C290. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01557.x>.
- Coêlho, J.D., 2019. PRODUÇÃO DE GRÃOS – FEIJÃO, MILHO E SOJA.
- Costa, G.E.A., da Silva Queiroz-Monici, K., Pissini Machado Reis, S.M., de Oliveira, A.C., 2006. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem.* 94, 327–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.020>.
- WHO, World Health Organization, 2020. Healthy Diet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>.
- Dickhout, J.G., Lee, R.M., 1998. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 274, H794–H800. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.3.H794>.
- Durak, A., Baraniak, B., Jakubczyk, A., Świeca, M., 2013. Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chem.* 141, 2177–2183. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.012>.
- Gianfranceschi, G.L., Gianfranceschi, G., Quassinti, L., Bramucci, M., 2018. Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy. *J. Funct. Foods* 47, 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.034>.
- Graziani, D., Ribeiro, J.V.V., Cruz, V.S., Gomes, R.M., Araújo, E.G., Santos Júnior, A.C.M., Tomaz, H.C.M., Castro, C.H., Fontes, W., Batista, K.A., Fernandes, K.F., Xavier, C.H., 2021. Oxidonitric and antioxidant effects of a low molecular weight peptide fraction from hardened bean (*Phaseolus vulgaris*) on endothelium. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 54, e10423. <https://doi.org/10.1590/1414-431X202010423>.
- Hartmann, R., Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>.
- Hultström, M., 2012. Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 30, 1087–1091. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328352b89a>.
- Kaneko, K., Iwasaki, M., Yoshikawa, M., Ohinata, K., 2010. Orally administered soy-morphins, soy-derived opioid peptides, suppress feeding and intestinal transit via gut μ1-receptor coupled to 5-HT1A, D2, and GABA_B systems. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299, G799–G805. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00081.2010>.
- Konukoglu, D., Uzun, H., 2017. Endothelial dysfunction and hypertension. *Adv. Exp. Med.*

- Biol. 956, 511–540. https://doi.org/10.1007/5584_2016_90.
- Lee, J.K., Jeon, J.-K., Byun, H.-G., 2014. Antihypertensive effect of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin in spontaneously hypertensive rats. *J. Funct. Foods* 7, 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.021>.
- Lee, S.Y., Lee, D.Y., Hur, S.J., 2021. Changes in the stability and antioxidant activities of different molecular weight bioactive peptide extracts obtained from beef during in vitro human digestion by gut microbiota. *Food Res. Int.* 141, 110116. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110116>.
- Lemes, A.C., Sala, L., Ores, J.D.C., Braga, A.R.C., Egea, M.B., Fernandes, K.F., 2016. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 950. <https://doi.org/10.3390/ijms17060950>.
- Liu, Lianliang, Liu, Lingyi, Lu, B., Chen, M., Zhang, Y., 2013. Evaluation of bamboo shoot peptide preparation with angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant abilities from byproducts of canned bamboo shoots. *J. Agric. Food Chem.* 61, 5526–5533. <https://doi.org/10.1021/jf305064h>.
- Los, F.G.B., Zielinski, A.A.F., Wojeicichowski, J.P., Nogueira, A., Demiate, I.M., 2018. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. Current Opinion in Food Science, Food Chemistry and Biochemistry * Food Bioprocessing 19, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.01.010>.
- Luna-Vital, D.A., Mojica, L., González de Mejía, E., Mendoza, S., Loarca-Piña, G., 2015. Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): a review. *Food Research International, Grain Legumes - Science, Technology and Impacts on Human Health* 76, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.024>.
- Ma, M.-S., Bae, I.Y., Lee, H.G., Yang, C.-B., 2006a. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Food Chem.* 96, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.052>.
- Ma, M.-S., Bae, I.Y., Lee, H.G., Yang, C.-B., 2006b. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Food Chem.* 96, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.052>.
- Machado, F.B., Lopes de Macêdo, I.Y., Campos, H.M., Gonçalves Moreno, E.K., Batista Silva, M.F., Raimundo de Oliveira Neto, J., Feitosa Ramalho, R.R., Nascimento, A.dos R., Vaz, B.G., Carlos da Cunha, L., Ghedin, P.C., Diculescu, V.C., de Souza Gil, E., 2021. Antioxidant activity of thirty-six peppers varieties and vasorelaxant of selected varieties. *Food Biosci.* 41, 100989. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100989>.
- Marczak, E.D., Ohinata, K., Lipkowski, A.W., Yoshikawa, M., 2006. Arg-Ile-Tyr (RIY) derived from rapeseed protein decreases food intake and gastric emptying after oral administration in mice. *Peptides* 27, 2065–2068. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.019>.
- Martínez-Sánchez, S.M., Gabaldón-Hernández, J.A., Montoro-García, S., 2020. Unravelling the molecular mechanisms associated with the role of food-derived bioactive peptides in promoting cardiovascular health. *J. Funct. Foods* 64, 103645. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103645>.
- Nakahara, T., Sano, A., Yamaguchi, H., Sugimoto, K., Chikata, H., Kinoshita, E., Uchida, R., 2010. Antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-like seasoning and identification of its angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances. *J. Agric. Food Chem.* 58, 821–827. <https://doi.org/10.1021/jf903261h>.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2014. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, 6.ª. Artmed, Porto Alegre.
- Nogata, Y., Nagamine, T., Yanaka, M., Ohta, H., 2009. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides produced by autolysis reactions from wheat bran. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6618–6622. <https://doi.org/10.1021/jf900857w>.
- Ortiz, P.A., Garvin, J.L., 2001. Intrarenal transport and vasoactive substances in hypertension. *Hypertension* 38, 621–624. <https://doi.org/10.1161/hy09t1.093361>.
- Pedrin, G.R., Maurino, I., De Almeida Colombari, D.S., Cravo, S.L., 2006. Role of catecholaminergic neurones of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular responses induced by acute changes in circulating volume in rats. *Exp. Physiol.* 91, 995–1005. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.034611>.
- Puchalska, P., Marina, M.L., García, M.C., 2012. Development of a reversed-phase high-performance liquid chromatography analytical methodology for the determination of antihypertensive peptides in maize crops. *J. Chromatogr. A* 1234, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.079>.
- Ribeiro, J.V.V., 2017. Estudo das atividades biológicas de frações proteicas do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cultivar pérola. Study of the biological activities of protein fractions of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivar pérola.
- Ribeiro, J.V.V., Batista, K. de A., Fernandes, K.F., 2019. Potential iron and copper chelating activity of naturally occurring peptides and protein fractions from common bean (*Phaseolus vulgaris*). *IJBP* 4. <https://doi.org/10.23880/IJBP-16000161>.
- Rodrigues, W.P.S., Ribeiro, J.V.V., da Silva, C.R.B., de Campos, I.T.N., Xavier, C.H., dos Santos, F.C.A., Cruz, M.V., Fernandes, K.F., 2022. In vivo effect of orally given polyvinyl alcohol/starch nanocomposites containing bioactive peptides from *Phaseolus vulgaris* beans. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 209, 112213. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112213>.
- Rutherford-Markwick, K.J., 2012. Food proteins as a source of bioactive peptides with diverse functions. *Br. J. Nutr.* 108 (Suppl. 2), S149–S157. <https://doi.org/10.1017/S000711451200253X>.
- Sales da Silva, E., Ferreira, P.M., Castro, C.H., Pacheco, L.F., Graziani, D., Pontes, C.N.R., Bessa, A.de S.M.de, Fernandes, E., Naves, L.M., Ribeiro, L.C., Mendonça, M.M., Gomes, R.M., Pedrino, G.R., Ferreira, R.N., Xavier, C.H., 2020. Brain and kidney GHS-R1a underexpression is associated with changes in renal function and hemodynamics during neurogenic hypertension. *Mol. Cell. Endocrinol.* 518, 110984. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110984>.
- Samtiya, M., Aluko, R.E., Dhewa, T., 2020. Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. *Food Production, Processing and Nutrition* 2, 6. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-0020-5>.
- Sánchez-Rivera, L., Santos, P.F., Miralles, B., Carrón, R., José Montero, M., Recio, I., 2016. Peptide fragments from β -casein f(134–138), HLPLP, generated by the action of rat blood plasma peptidases show potent antihypertensive activity. *Food Research International, The 4th International Conference on Food Digestion* 88, 348–353. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.007>.
- Sato, M., Hosokawa, T., Yamaguchi, T., Nakano, Toshiki, Muramoto, K., Kahara, T., Funayama, K., Kobayashi, A., Nakano, Takahisa, 2002. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6245–6252. <https://doi.org/10.1021/jf020482t>.
- Siqueira, B.S., Fernandes, K.F., Brito, P.V.A., Santos, F.C.A., 2018. Histochemical and ultrastructural characterization of easy-to-cook and hard-to-cook carioca bean genotypes. *Lebensm. Wiss. Technol.* 97, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.048>.
- Suetsuna, K., Maekawa, K., Chen, J.-R., 2004. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.* 15, 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2003.11.004>.
- Suetsuna, K., Nakano, T., 2000. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *J. Nutr. Biochem.* 11, 450–454. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(00\)00110-8](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(00)00110-8).
- Tagliacucchi, D., Martini, S., Bellesia, A., Conte, A., 2015. Identification of ACE-inhibitory peptides from *Phaseolus vulgaris* after in vitro gastrointestinal digestion. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66, 774–782. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1088940>.
- Usach, I., Martínez, R., Festini, T., Peris, J.-E., 2019. Subcutaneous injection of drugs: literature review of factors influencing pain sensation at the injection site. *Adv. Ther.* 36, 2986–2996. <https://doi.org/10.1007/s12325-019-01101-6>.
- Valencia-Mejía, E., Batista, K.A., Fernández, J.J.A., Fernandes, K.F., 2019. Antihyperglycemic and hypoglycemic activity of naturally occurring peptides and protein hydrolysates from easy-to-cook and hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Res. Int.* 121, 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.043>.
- Wang, W., 2015. Tolerability of hypertonic injectables. *Int. J. Pharm.* 490, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.069>.
- Wermeling, D.P., Rapp, R.P., DeLuca, P.P., Piccoro, J.J., 1985. Osmolality of small-volume intravenous admixtures. *Am. J. Hosp. Pharm.* 42, 1739–1744.
- Wu, J., Ding, X., 2002. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res. Int.* 35, 367–375. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00131-4](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00131-4).
- Yang, Y., Tao, G., Liu, P., Liu, J., 2007. Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7891–7895. <https://doi.org/10.1021/jf0705670>.
- Yokoyama, K., Chiba, H., Yoshikawa, M., 1992. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biochem. Biotechnol.* 56, 1541–1545. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.1541>.
- Zhu, X.-L., Watanabe, K., Shiraiishi, K., Ueki, T., Noda, Y., Matsui, T., Matsumoto, K., 2008. Identification of ACE-inhibitory peptides in salt-free soy sauce that are transportable across caco-2 cell monolayers. *Peptides* 29, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.11.006>.