

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

EDINA DA LUZ ABREU

**Hidrolisado de clara de ovo como estratégia
protetora dos danos vasculares na
hipertensão DOCA-sal**

Uruguaiana-RS

2023

EDINA DA LUZ ABREU

**Hidrolisado de clara de ovo como estratégia
protetora dos danos vasculares na
hipertensão DOCA-sal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, campus Uruguaiana, como requisito para obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Giulia A. Wiggers

Coorientadora: Dr^a. Marta Miguel-Castro

Uruguaiana-RS

2023

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

A162h Abreu, Edina da Luz
Hidrolisado de clara de ovo como estratégia protetora dos
danos vasculares na hipertensão DOCA-sal / Edina da Luz Abreu.
148 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM CIÊNCIA ANIMAL, 2023.
"Orientação: Giulia Alessandra Wiggers".

1. Fisiologia de Órgãos e Sistemas. 2. Fisiologia
Cardiovascular. 3. Bioquímica. 4. Alimentos Funcionais. 5.
Proteínas Alimentares. I. Título.

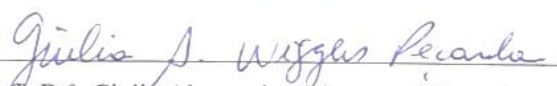
EDINA DA LUZ ABREU


**Hidrolisado de clara de ovo como estratégia protetora dos
danos vasculares na hipertensão DOCA-sal**

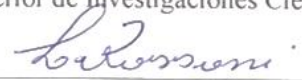
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Pampa, campus Uruguaiana, como requisito para
obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

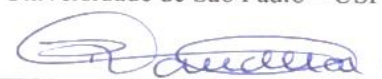
Tese defendida e aprovada em: 14/11/2023


Banca examinadora:


Prof. Dr.ª Giulia Alessandra Wiggers - Orientadora
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA


Dr.ª Marta Miguel-Castro - Coorientadora
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)


Prof. Dr.ª Luciana Venturini Rossoni
Universidade de São Paulo – USP


Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES


Prof. Dr. Jose Antonio Uranga-Ocio
Universidad Rey Juan Carlos - URJC

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edson e Antôninha

Aos meus irmãos, Andrelise, Edson Filho e Victor Matheus

Ao meu parceiro de vida, Theo Frederico

A minha segunda família, Eloi e Silvia Beatriz

AGRADECIMENTOS

Aqui está se encerrando uma jornada longa, desafiadora e difícil, que jamais imaginei que seria possível, mas que desde que a Universidade Federal do Pampa, nessa região se instalou, me permitiu sonhar e realizar. Nenhum caminho se trilha sozinho, embora, em alguns momentos possamos sentir-nos como “lobos solitários” lutando contra tudo e contra todos. Mas, a verdade é que essa jornada, embora dura, é linda e nos proporciona encontrar pessoas incríveis pelo caminho. E eu, sem a menor dúvida tive o privilégio de ter tido pelo meu caminho pessoas muito especiais que me ajudaram a chegar até aqui. Não sou, religiosa, mas tenho a certeza, não sei bem de onde, que nada somos sem a força de Deus pai e o amor de Deus filho, assim agradeço por terem me guiado até aqui.

Seguindo, agradeço, a minha família, minha mãe Antoninha, meu pai Edson, meus irmãos Andrelise, Edson Filho e Victor Matheus e os meus sogros, Eloi e Silvia. Sem dúvida, a grande instituição de fomento de pesquisa no Brasil. Meus pais me deram amor, mas também a base de valores, me orientaram na construção de um caráter digno e honesto e a falta de “mimo” na adolescência, que eu achava tão ruim, hoje só agradeço, pois me fizeram ser uma pessoa forte, capaz de lutar pelos seus sonhos e resolver seus problemas. E, meus pais, embora não tenham concluído o ensino médio, sempre me incentivaram a estudar e fizeram todos os sacrifícios para que eu pudesse estudar, por isso eu só tenho a agradecer por tanto. Meus irmãos, que também não fizeram, uma faculdade, mestrado ou tão pouco um doutorado, muitas vezes, sem entender direito o que é a pesquisa, nos nossos almoços de domingos queriam saber sobre e, si essas pessoas conseguirem entender um pouquinho do que eu faço, então cumpro com a verdadeira missão da pesquisa. Aos meus sogros, sempre que precisei, eu pude contar, seja por uma passagem, um empréstimo de carro, uns debates (rsrsrsrrs) eternamente grata por tudo.

Não posso deixar de agradecer ao meu parceiro de vida, Theo, cúmplice de tantas loucuras ao longo desses anos, até um bate e volta de quase 1200 km (Uruguai-Pelotas, para buscar ratos para concluir essa pesquisa, lá foi) tão diferente de mim, em personalidade, tão sereno, calmo, mas tão parecido nos valores. Muito Obrigada por todo o amor, carinho e apoio!!! e por estar ao meu lado em tantos momentos difíceis e como já dizia os Engenheiros do Hawaii “somos suspeitos de um crime perfeito”.

Quero agradecer, a minha orientadora Prof^a Dr^a Giulia Alessandra Wiggers ou GAW para o mundo, uma parceria que se iniciou, oficialmente no final de 2019, eu já

com um ano de doutorado, quem assume um desafio desses, poucas pessoas, uma delas Prof^a Giulia, mas quando eu busquei uma nova orientação, eu recebi um belo “não”, mas junto venho as portas do laboratório estão abertas pode ir lá, ver, conhecer. E, quase início de 2020 venho a oficialização da orientação, mas isso foi o de menos, pois eu encontrei exatamente a definição, ao meu ver, de orientadora, ensina, corrige, mil vezes de precisar, cobra, mas fornece as melhores condições possíveis, corre atrás, fala com quem quer que seja para que tenham condições de realizar um excelente trabalho. E, eu sou testemunha ocular do quanto de tempo, saúde, privações aqui na fronteira oeste é preciso para que a pesquisa se faça, então, além de gratidão, eu sempre terei eterno respeito e admiração por essa grande mulher que eu encontrei no meu caminho, talvez de um início meio torto, mas que, ao menos para mim, no final muito certo!!!

Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial, ao professor Franck, com o qual eu convivi muito pouco, o homem é professor, pai de família, luta por um país mais justo e, ainda é poeta, talvez nem ele saiba, o quanto o respeito e admiro. Mas é a minha referência e meta sobre “síntese de resultados” e a forma de pensar a pesquisa. Embora, pouco, presencialmente me relacionei, muito presente está nos projetos/cooperação que essa pesquisa gerou.

Como mencionei, no início, não fazemos e não somos nada sozinhos, eu não construiria esse trabalho e tão pouco executaria o projeto DOCA-sal da maneira que foi, sem a ajuda, dos meus colegas de laboratório, Camila, Herrera, Pedro Henrique e Samia, guerreiros de uma jornada que parecia impossível, mas que graças a colaboração desses pequenos, gigantes e futuros pesquisadores, se assim quiserem, realizamos! Cada um de um lugar especial no meu coração e eterna gratidão, eu não sei fazer discurso, capricornianos, são péssimos nisso, nosso amor é traduzido em atitudes, e cada um sabe que sempre pode contar comigo e eu irei atender. Mas como uma parte de nossas vidas é currículo, está e estará lá no currículo de cada um, os frutos desse projeto.

Se a jornada de uma pessoa não se faz sozinha que dirá de um laboratório de pesquisa, e o GPFisCar, tem um anjo, um amigo, um apoiador, um incentivador, um revisor, que eu conheci em 2019, acho que não lembrará de mim, mas, fiquei admirada, sentado numa mesa em meio ao laboratório, um pedaço de papel e uma caneta, discutindo ciência. O então, doutorando do laboratório lhe disse seus resultados, e venho uma síntese e uma conclusão, e eu que tinha acabado de entrar no laboratório que mal sabia o que aquele povo fazia, consegui entender. Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo, sou sua fã.

Gostaria de deixar aqui registrado, meu eterno carinho e admiração pela Profª Drª Carla Pohl Sehn, minha antiga professora e orientadora na graduação, não sei ela sabe a importância que teve na minha trajetória até aqui, não só como aluna, mas como referência de trabalho e dedicação a um projeto. E, fomos parceiras de trabalho, Coordenação do Curso de Nutrição/ENFO/Extensão, na famosa era “sobrinha de Hitler”, e nem de longe, conheci o nazismo, e por obra do destino, mais uma vez nossos caminhos se cruzaram, prontamente abriu espaço nas suas aulas para eu cursar a docência orientada III, me fez dar entrevista na rádio, para falar da trajetória acadêmica, eu tremendo e depois um convite, muito especial, falar para crianças de um projeto social, a escola desses alunos, é a Escola Estadual Profª Odila Villordo de Moraes, onde em 2006 eu coleei grau do ensino médio.

Se hoje eu, faço pesquisa, tenho uma base muito forte de laboratório, fundamentais no meu doutorado e se faço análises de olho fechado, primeiro tenho que agradecer Profª Drª Simone Noremborg, minha eterna orientadora, minha iniciação nesse universo lindo da pesquisa, minha base de cálculo e preparo de soluções. Muito Obrigada por tantos ensinamentos da química, terrível, mas que a Simone Noremborg fazia ser suave e encantadora. Eu não poderia deixar de agradecer a Simone Pinton, minha orientadora no mestrado e no primeiro ano de doutorado, no Lab 501, eu tive a base para dar aulas de análises bioquímicas e base para fazer qualquer análise, embora, um hiato de deus, eu sou muito grata por tantos momentos e ensinamentos, foste muito importante na minha trajetória, não só acadêmica, mas também pessoal, aprendi e cresci muito. Muito Obrigada!!!

E aqui, no campus Uruguaiana, a Profª Drª Fracielli Weber Cibin, ou simplesmente Fran, que traduz em pessoa, uma das palavras que definem a pesquisa, generosidade. Sempre, prestativa, educada, disposta a ensinar, sem precisar humilhar, jamais ví sair fora do compasso e perder a classe e elegância, tão naturais de sua personalidade, encontre-a seja, com muitas pessoas ou sozinha num final de tarde. Ou, num dia de sufoco precisando rever um cálculo para preparar uma sonda com o único 10 microlitros existente, tendo que dar certo. Fran muito obrigada, eu desde de 2014, tempos de graduação ainda, “invadindo” teu laboratório e você ali sempre disposta a acolher e ajudar. Muito Obrigada!!! Espero, um dia te reencontrar nesta jornada tão linda que é a pesquisa.

Um agradecimento especial, a Universidad Rey Juan Carlos, minha segunda casa, não só pelo tempo que lá passei, mas principalmente, pelas pessoas que lá encontrei, querido y

aborrido, Antônio Marquez, tenho certeza jamais esquecerá arterias y grasa, por diós, no és del Diós (rsrsr) mas foi possível realizar as análises. Não tenho nem palavras para agradecer a Antonio. Raquel, la experta en immuno-histoquímica, grata pelas tuas dicas e orientações durante os experimentos, há e não posso esquecer, das sugestões de cidades, lugares que eu deveria conhecer na Espanha, miré la nieve por la primera vez em mi vida, en Ávila, muchas gracias por todo, mi amiga!!! Julio Paredes, la definición del uno espanhol original, primero, Buenos días, punto, nada más, mirava y yo sentía, Hun más una chica del estancia, el fin, muitísimas informaciones del comida, dónde turistar y hasta jurar en espanhol. Como esquecer de tantos desayunos. Seguramente no estuve sola por esas personas. E, por fim, a pessoa que nutro profunda admiração e respeito, Jose Antônio Uranga, me mostrou o mundo incrível da histologia e marcações que abriu as portas e colocou toda a estrutura do seu laboratório a disposição do nosso trabalho e taão pronto a nos responder. Que me fez repetir, ampliar, refazer quantas vezes fossem necessárias as análises para estar seguro do dado. “Edina necessita más” “no estás bién” el fundo, no deba estar así, puede mejorar. Eso no fue agradable, pero yo comprendo y agradezco hoy puedo ensinar histologia tengo la base.

Não poderia deixar de agradecer ao Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, onde me foi oportunizado um outro mundo, os dos alimentos, de outras análises e inovação. E, mesmo que por um curto espaço de tempo, lá conheci, Estefanía, una chica que se tornou uma grande amiga e apoio. Gracias guapa por todo! El tinto del Itaqui a ti será enviado!

Seguindo, um agradecimento muito, mas muito especial, a Dr.^a Marta Miguel-Castro, não só minha co-orientadora na tese e nesse projeto lindo, “mãe” da nossa estratégia terapêutica, eu sou eternamente grata pelas oportunidades que me proporcionou, realizei alguns dos meus sonhos de vida, graças a essa parceria, é uma das mulheres que mais admiro na vida, pela força, pela coragem, por dar conta de tantas coisas ao mesmo tempo. Espanhóis não são como nos latinos, cada motivo uma junção, mas sabia que se precisasse estaria lá e me atenderia. Gracias Marta!!!

Não poderia deixar de mencionar e agradecer a oportunidade de conhecer, a Prof.^a Dr.^a Mercedes Salaices, o currículo, o fato de ser catedrática de Farmacologia de la Universidad Autónoma de Madrid, já seriam motivos mais que suficientes, mas encontra-la em uma manhã de segunda-feira em mais uma reunião de resultados, de tantas que já teve ao longo de seus anos de carreira, e lá estava ela, com 70 anos, numa empolgação, energia, simplesmente admirável e se já nutria respeito pela grande cientista que já sabia

que é passei a admirá-la ainda mais, como mulher e ojala eu chegue os meus 70 anos, quem sabe com uns 1% da grandiosidade dessa “pequena” senhora. Dr.^a Ana Briones, gentileza e educação, eu só conhecia de ouvir falar, mas dizem que quando você chega sem avisar e quando você fica sabendo a verdade, Dr.^a Ana Briones no L4, numa mesa discutindo resultados e pessoas de vários lugares. Pude entender um pouquinho a importância desse espaço na vida de tantas pessoas, e embora rápido, também na minha. E a sensação de conhecer ao vivo as citações e a pessoa que você acha os trabalhos lindos e que te fizeram entender algo muito complexo, eu posso dizer tive essa experiência.

Por fim, um agradecimento especial aos professores componentes da banca examinadora deste trabalho Prof. Dr. Dalton V. Vassallo, Prof. Dr.^a Luciana Venturini Rossoni, Prof. Dr. José Antônio Uranga-Ocio, obrigada pelo aceite em avaliar esse trabalho, será uma grande honra tê-los na avaliação desse trabalho.

Também, gostaria de agradecer a Universidade Federal do Pampa, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, as agências de fomento do governo brasileiro Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [200482/2022-0], e ao governo da Espanha [iCOOP –02354] pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas de estudo que garantiram o sustento e possibilitaram a realização desta tese de Doutorado.

*"Tudo o que te desafia tem o
poder de te transformar,
não existe professor maior
do que o momento que dói
e dá trabalho, ele é duro,
mas te faz crescer."*

(Caio Carneiro)

RESUMO

A hipertensão arterial (HA) é complexa, multifatorial e com o envolvimento de processos oxidativos e inflamatórios assim como a ativação do sistema-renina-angiotensina (SRA) sistêmico e local promove disfunção dos vasos sanguíneos e do tecido adiposo perivascular (PVAT). Considerando os efeitos vasculares deletérios da HA estabelecida, hipotetizamos que a utilização de uma estratégia não-farmacológica, com o uso de um alimento funcional, o hidrolisado de clara de ovo (HCO) obtido pela hidrólise com pepsina por 8h, pode minimizar os danos vasculares promovidos pelo modelo DOCA-sal. Para tal, inicialmente, investigamos os efeitos do HCO sobre os danos causados pela HA DOCA-sal em artérias de condutância e de resistência e as vias vasculares envolvidas e demonstramos que a HA induzida pelo modelo DOCA-sal atingiu níveis pressóricos sistólicos médios de 194 mmHg que foi significativamente reduzido pelo co-tratamento com HCO. Como esperado, a HA reduziu o relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina nas artérias estudadas o que foi restaurado pelo co-tratamento com o HCO. A proteção vascular promovida pelo HCO envolveu a prevenção do aumento de ROS de origem celular (com a incubação da Superóxido Dismutase) e mitocondrial (com a incubação do MitoTEMPO) nas artérias de condutância e de resistência, respectivamente. O ânion superóxido foi a principal espécie reativa envolvida no prejuízo vascular induzido pelo modelo DOCA-sal e sua produção foi suprimida pelo co-tratamento com o HCO. O HCO restaurou os níveis de óxido nítrico nas artérias de condutância. Em ambas as artérias, o HCO reduziu a ativação de NF- κ B, de TNF- α e de receptores do tipo I para angiotensina aumentados pela indução da HA DOCA-sal. Além disso, evitou a peroxidação lipídica em ambos os leitos vasculares. No segundo estudo, investigamos se o HCO reverteria a disfunção do PVAT mesentérico (mPVAT) promovida pela HA DOCA-sal. Observamos que o HCO recuperou parcialmente o efeito anticontrátil do mPVAT reduzido pelo aumento maligno da pressão neste modelo. Esse efeito envolveu a participação da via da renina local e também inibição da ECA tecidual. Ainda, o HCO restaurou os níveis teciduais de ROS, TNF- α , IL-1 β e IL-6 no mPVAT aumentados pela HA DOCA-sal. Assim, o efeito protetor apresentado pelo HCO diante da disfunção do mPVAT na HA DOCA-sal foi mediado pelo SRA local, envolvendo a ação antioxidante e anti-inflamatória deste alimento funcional. O conjunto de resultados apresentados demonstra que HCO protege os vasos incluindo o mPVAT das alterações oxidativas, pró-inflamatórias induzidas pela HA no modelo DOCA-sal e pode constituir uma alternativa terapêutica dietética adjuvante no tratamento da hipertensão severa.

Palavras-chave: hipertensão secundária; estresse oxidativo; processo inflamatório, sistema renina-angiotensina; tecido adiposo perivascular.

ABSTRACT

Arterial hypertension (AH) is complex, multifactorial, and with the involvement of oxidative and inflammatory processes as well as the activation of the systemic and local renin-angiotensin system (RAS) promotes dysfunction of blood vessels and perivascular adipose tissue (PVAT). Considering the detrimental vascular effects of established AH, we hypothesized that the use of a non-pharmacological strategy involving the use of functional food, an egg white hydrolysate (EWH) obtained through 8-hour pepsin hydrolysis, could minimize the vascular damage promoted by the DOCA-salt model. To this end, we conducted two studies using the following experimental groups: Initially, we investigated the effects of EWH on the damage caused by DOCA-salt-induced AH in conductance and resistance mesenteric arteries, as well as the involved vascular pathways. We demonstrated that AH induced by the DOCA-salt model reached average systolic blood pressure levels of 194 mmHg and was significantly reduced by co-treatment with EWH. As expected, the model decreased endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in the conductance and resistance arteries, restored by co-treatment with EWH. The vascular protection promoted by EWH involved the prevention of increased cellular-origin ROS (incubation of superoxide dismutase) and mitochondrial-origin ROS (incubation of superoxide dismutase of MitoTEMPO) in conductance and resistance arteries, respectively. Superoxide anion was the main reactive species involved in the vascular damage induced by the DOCA-salt model, and its production was suppressed by co-treatment with EWH. Collectively, EWH restored nitric oxide levels in conductance arteries. In both artery types, EWH reduced the activation of NF- κ B, TNF- α , and angiotensin type I receptors, all increased by DOCA-salt induction. Furthermore, EWH prevented lipid peroxidation in both vascular beds. In the second study, we investigated whether EWH would reverse the dysfunction mesenteric PVAT (mPVAT) promoted by DOCA-salt-induced HA. EWH partially restored the anticontractile effect of mPVAT that was reduced due to malignant pressure increase. This effect involved the local renin pathway and tissue ACE inhibition. Additionally, EWH restored tissue levels of ROS, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 that were increased by DOCA-salt-induced HA. Thus, the protective effect presented by EWH against mPVAT dysfunction in DOCA-salt-induced HA was mediated by the local RAS, involving antioxidant and anti-inflammatory action of this functional food. The results presented demonstrate that EWH protects vessels, including mesenteric PVAT, from oxidative and pro-inflammatory changes induced by DOCA-salt model AH and may serve as an adjunct dietary therapeutic alternative in treating severe hypertension.

Keywords: secondary hypertension; oxidative stress; inflammatory process; renin-angiotensin system; perivascular adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 1: Gráfico representativo do aumento da pressão arterial sistólica em mmHg nas semanas de indução no Modelo DOCA-sal. A partir da 4 ^a /5 ^a semana habitualmente pressão estabiliza em níveis médios de 190 mmHg.....	34
Figura 2: Representação das diferentes camadas que compõem a parede arterial constituídas pelas túnica externa, média e íntima.....	35
Figura 3: Representação gráfica das diferenças entre os tipos de tecido adiposo perivascular – PVAT em artéria aorta na sua porção torácica (tPVAT), aorta abdominal (aPVAT) e em tecido mesentérico (mPVAT).....	40
Figura 4: Esquema representativo dos fatores vasodilatadores e vasoconstritores liberados pelo endotélio e pelo PVAT.....	42
Figura 5: Função e mediadores envolvidos nas diferentes camadas vasculares no estado fisiológico e no desenvolvimento da Hipertensão DOCA-sal. Representação do tipo de remodelamento encontrado na HA DOCA-sal.....	49
Figura 6: Etapas de produção do hidrolisado de clara de ovo utilizando a hidrólise com pepsina por 8 horas.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de referência para titulação de hipertensão e níveis de estadiamento/gravidade.....	30
Tabela 2: Moléculas biologicamente ativas derivadas do PVAT com efeitos vasculares.....	46
Tabela 3: Hidrolisado de Clara de Ovo obtidos com pepsina e seus efeitos em diferentes modelos experimentais.....	66

LISTA DE FIGURAS

PARTE II

MANUSCRITO I

Figure 1 - Schematic representation of experimental groups, DOCA-salt hypertension induction model and EWH treatment period..... 73

Figure 2 – Effect of EWH on SBP in DOCA-salt hypertensive rats. SBP values of SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups, measured before and after nephrectomy (–1 and 0 weeks), during DOCA-salt model induction (1 to 4th week), and during the maintenance of the DOCA-salt hypertensive model co-treated or not with EWH (5th to 8th week). The EWH treatment started on the 4th week after DOCA-salt or SHAM treatment (orange-marked line). Data are expressed as mean ± SEM. The number of rats is indicated in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. SHAM; # vs. DOCA..... 76

Figure 3 – Effect of EWH in endothelium-dependent and -independent relaxation of MRA and aorta segments from DOCA-salt rats. Concentration–response curves to ACh (A, B) and SNP (C, D) in MRA and aorta segments from SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups. The results are expressed (mean ± SEM) as the percentage of relaxation responses in norepinephrine or phenylephrine precontracted rings. The number of rats is indicated in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. SHAM; # vs. DOCA..... 77

Figure 4 – The role of endothelium on the effect of EWH in ACh-induced relaxation of MRA and aorta segments from DOCA-salt rats. Concentration–response curve to ACh in the presence (E+) and absence of endothelium (E–) in MRA (Upper graphics) and aorta (Bottom graphics) segments from rats SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH. The results are expressed (mean ± SEM) as the percentage of relaxation responses in norepinephrine or phenylephrine precontracted rings. The number of rats is indicated in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. E+ 78

Figure 5 – The role of EWH in ROS-mediated ACh-induced relaxation in MRA and aorta of DOCA-salt rats. Concentration–response curves to ACh were obtained in MRA (Upper graphics) and aorta (Bottom graphics) segments from rats from SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups before (E+) and after incubation with scavenger reactive oxygen species, the superoxide dismutase (SOD, 750/mL). The results are expressed (mean ± SEM) as the percentage of relaxation responses in norepinephrine or phenylephrine precontracted rings. The number of

animals in each group is in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05^*$ vs. E+..... 79

Figure 6 – The role of EWH on mitochondrial ROS-mediated, ACh-induced relaxation in MRA and aorta of DOCA-salt rats. Concentration–response curves to ACh were obtained in MRA (Upper graphics) and aorta (Bottom graphics) segments from rats from SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups before (E+) and after incubation with specific scavenger of mitochondrial superoxide, Mito-TEMPO (0.5 $\mu\text{mol/L}$). The results are expressed (mean \pm SEM) as the percentage of relaxation responses in norepinephrine or phenylephrine precontracted rings. The number of animals in each group is in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05^*$ vs. E+..... 80

Figure 7 – The role of EWH on O₂⁻ production in MRA and aorta section of DOCA-salt rats. Typical images of sensitive fluorescent dye Dihydroethidium (DHE) in the absence or presence of Mito-TEMPO (0.5 $\mu\text{mol/L}$ —third line panel A) or MnTMPyP (25 μM —third line panel B) in MRA and aorta sections of SHAM, SHAM+EWH, DOCA, or DOCA+EWH rats. The basal images are the negative control pictures without DHE. The histogram (a—MRA and b—Aorta) shows in white bars the DHE fluorescence and in black bars the DHE fluorescence after Mito-TEMPO or MnTMPyP incubation. The results are expressed as representative fluorescence intensity in arbitrary units. The results are expressed as mean \pm SEM (n = 6). Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05^*$ vs. SHAM; $^\#$ vs. DOCA 81

Figure 8 – The role of EWH on NOX1 expression in MRA and aorta section of DOCA-salt rats. Representative photomicrographs ($\times 40$ magnification) and histogram of NOX1 immunofluorescence in MRA and aortic sections of SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH arteries. Data are expressed as mean \pm SEM, n = 8. The images correspond to the merge of the marking of the colors by the DAPI in blue and the NOX-1 in green. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05^*$ vs. SHAM; $^\#$ vs. DOCA. 82

Figure 9 – The role of EWH on NF- κB and TNF α expression in MRA and aorta section of DOCA-salt rats. Representative photomicrographs ($\times 40$ magnification) and histogram of NF- κB (left) and TNF α (HT) immunofluorescence of MRA and aorta sections of SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH arteries. Data are expressed as mean \pm SEM, n = 8. The images correspond to the merge of the marking of the colors by the DAPI in blue and the NF- κB and TNF α in green. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05^*$ vs. SHAM; $^\#$ vs. DOCA. 83

Figure 10 – Effects of EWH on the oxidative stress (ROS and TBARS) and antioxidant (FRAP) capacity in plasma, MRA, and aorta of DOCA-salt rats. ROS, TBARS, and FRAP values were assessed in plasma, MRA, and aorta of SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH rats. The results are expressed as mean ± SEM, and the number of animals is indicated as dots in the bars. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. SHAM; # vs. DOCA..... 84

Figure 11 – The role of EWH on endothelial NO synthase (eNOS) expression in MRA and aorta section of DOCA-salt rats. Representative photomicrographs (×40 magnification) and histogram of eNOS immunofluorescence of MRA (left panels) and aortic (HT panels) sections of SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH arteries. Data are expressed as mean ± SEM, $n = 8$. The images correspond to the merge of the marking of the colors by the DAPI in blue and the eNOS in green. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. SHAM; # vs. DOCA. 85

Figure S1: The role of EWH in NF-κB-induced impairment on acetylcholine (ACh) relaxation in MRA of DOCA-salt rats. Concentration-response curves to ACh were obtained in MRA from rats from SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups before (E+) and after incubation with NF-κB inhibitor (BAY 117082, 5 μM). The results are expressed (mean ± SEM) as the percentage of relaxation responses to norepinephrine precontracted rings. The number of animals in each group is in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $P < 0.05$ *vs. E+. 93

Figure S2: The role of EWH in NO-mediated acetylcholine (ACh)-induced relaxation in the aorta of DOCA-salt rats. Concentration-response curves to ACh were obtained in the aorta of rats from SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups before (E+) and after incubation with a non-selective inhibitor of NOS (L-NAME, 100 μM). The results are expressed (mean ± SEM) as the percentage of relaxation responses to phenylephrine precontracted rings. The number of animals in each group is in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $P < 0.05$ *vs. E+..... 94

Figure S3: NO production is recovered by EWH treatment in aortic sections of DOCA-salt rats. Representative fluorographs of transverse sections of aorta loaded with DAF-2 in the absence (Basal, left panel) and presence of ACh (100 μmol/L, right panel) in SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups. Bar graphs show the quantified NO production measured as DAF-2 fluorescence in sections of the aorta in basal condition (white bar) and after ACh stimulation (black bar). The values are presented as the mean ± SEM. $N=4$. Significance was assessed with a two-way ANOVA: $p < 0.05$ *vs. basal condition, # vs. SHAM. 95

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO II

Figure 1 – Concentration-response curves to norepinephrine (NE) in mesenteric resistance artery (MRA) ring in the presence (PVAT+) and absence (PVAT-) of perivascular adipose tissue from animals SHAM and SHAM/EWH (A) and DOCA and DOCA/EWH (B). The bar graph in C represents the comparison of the maximal response of the curves (E_{max}) of all groups in the absence (PVAT –) and presence (PVAT+) of PVAT. The sensibility of the concentration-response curve of NE (Log EC_{50}) is represented in graph D in the same conditions. Data are presented as mean \pm SEM. The number of animals per group is indicated in parentheses in the figure. The statistical analysis was assessed by three-way ANOVA followed by the Bonferroni test; # $p < 0.05$ vs. PVAT-; & $p < 0.05$ vs. DOCA; * $p < 0.05$ vs. SHAM.....

118

Figure 2 – Effect of Aliskiren (1 μ M) on concentration-response curves to norepinephrine (NE) in mesenteric resistance artery (MRA) ring with functional endothelium in the presence of perivascular adipose tissue (PVAT+) from animals SHAM (A), SHAM/EWH (B), DOCA (C) and DOCA/EWH (D). Data are presented as mean \pm SEM. The number of animals per group is indicated in parentheses in the figure. The statistical analysis was assessed by three-way ANOVA followed by the Bonferroni test; @ $p < 0.05$ vs. without ALISQ.....

119

Figure 3 – Effects of treatment with Egg Hydrolysate White (EWH) on components of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) in SHAM, SHAM/EWH, DOCA and DOCA/EWH PVAT of MRA. The presence of Renin (A), ATR1 receptor (B) and ATR2 receptor (C) were indicated in photomicrographs positively are indicated with arrows on the panels. Digital images were captured using the 20 \times objective. The scale bar represents 50 μ m. The bar graph in figure D represents the Angiotensin I converting enzyme (ACE) activity in the perivascular adipose tissue (PVAT) in all experimental groups. Data are presented as mean \pm SEM. The number of animals per group is indicated in symbol of the figure. The statistical analysis was assessed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test; * $p < 0.05$ vs. SHAM; # $p < 0.05$ vs. DOCA.....

120

Figure 4 – Effects of treatment with Egg Hydrolysate White (EWH) on the NADP(H) oxidase enzyme complex (NOX-1), the number of macrophages (CD163⁺), TNF- α production, and IL-6 and IL-1 β levels in PVAT of MRA. The presence of NOX-1, CD163⁺ and TNF- α were assessed using immunohistochemical represented by photomicrographs positive are indicated with arrows on the panels A, B and C respectively. Digital images were captured using the 20 \times objective. The scale bar represents 50 μ m. The bar graph in figures (D) and (E) represent IL-6 and IL-1 β levels in the PVAT of MRA. Data are presented as mean \pm SEM. The number

of animals per group is indicated in symbols of the figure. The statistical analysis was assessed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test; * p<0.05 vs. SHAM; # p<0.05 vs. DOCA. 121

Figure 5 – Effects of treatment with Egg Hydrolysate White (EWH) on PVAT of MRA in the levels of MDA (A), ROS (B), Total Antioxidant Capacity (C) in rats from SHAM, SHAM/EWH, DOCA, and DOCA/EWH groups. Data are presented as mean ± SEM. The number of rats is indicated in the bars. The statistical analysis was assessed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test; * p<0.05 vs. SHAM; # p<0.05 vs. DOCA..... 122

Supplementary Figure 1 - Systolic blood pressure (SBP) values in SHAM, SHAM/EWH, DOCA, and DOCA/EWH rats were measured weekly. Baseline SBP was considered before nephrectomy (-1 week); induction of hypertension with deoxycorticosterone (DOCA-salt) started at week 0 to 8 and treatment with EWH lasted from week 4 to 8. The number of animals per group is indicated in the figure. The statistical analysis was assessed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test; * p<0.05 vs. SHAM; # p<0.05 vs. DOCA. 123

S Table 1 – Contractile response to the mesenteric arteries with (PVAT+) or without (PVAT) in perivascular adipose tissue (PVAT) and vascular internal diameter. Data are mean ± SEM. The number of animals per group is indicated in the parentheses. The statistical analysis was assessed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test; * p<0.05 vs. SHAM; # p<0.05 vs. DOCA. 124

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3-MST - 3 mercaptopiruvato sulfurtransferase
- AA - ácido araquidônico
- AC - adenilato ciclase
- ACC - American College of Cardiology
- ACE - enzima conversora de angiotensina I
- AHA - American Heart Association
- ANG-1-7 - angiotensina tipo 1-7
- ANG-I - angiotensina tipo 1
- ANG-II - angiotensina tipo II
- ANG-III - angiotensina tipo III
- ANOVA - análise de variância
- AO - aorta
- aPVAT – tecido adiposo perivascular aórtico abdominal
- AT1R - receptor de angiotensina tipo I
- AT2R - receptor de angiotensina tipo II
- ATP - o trifosfato de adenosina (ATP)
- BK - bradicinina
- Ca²⁺- cálcio
- cAMP - 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
- CCL2 - ligante de quimiocina 2
- CD163⁺ - células marcadoras de macrófagos
- cGMP - guanosina monofosfatase cíclica
- COX - ciclooxigenase
- COX-1 - ciclooxigenase 1
- COX-2 - ciclooxigenase 2
- Cu/Zn/SOD - Cu, Zn superóxido dismutase
- DAF - diaminofluoresceína
- DAG - diacilglicerol
- DCNT's - doenças crônicas não transmissíveis
- DCV – doenças cardiovasculares
- DHE - dihidroetidina
- DOCA - desoxicorticosterona

EC's - células endoteliais
EDHF - fator hiperpolarizante derivado do endotélio⁴
EET - ácidos epoxieicosatrienoicos
eNOS - sintase de óxido nítrico endotelial
ET-1 - endotelina 1
ET-2 - endotelina 2
ET-3 - endotelina 3
FRAP - ensaio da potência antioxidante redutora férrica
GC - guanilato ciclase
GPx – glutathiona peroxidase
GTP - trifosfato de guanosina
H₂S - sulfeto de hidrogênio
HCO - Hidrolisado de Clara de Ovo
HS - hipertensão secundária
HA – Hipertensão Arterial
IL-6 - Interleucina 6
IL-β - Interleucina 1-beta
iNOS - sintase de óxido nítrico induzível
K⁺ - íon potássio
KCl - cloreto de potássio
Kir - canais para K⁺ retificadores de entrada
Kv - canais de K⁺ sensíveis à voltagem
L-NAME - Éster metílico de N(ω)-nitro-L-arginina
MAPK's - proteínas quinases ativadas por mitógeno
MCP-1 - proteína quimioatraente de monócitos-1
MDA – malondialdeído
MLC's - cadeias leves regulatórias de miosina
MnSOD - superóxido dismutase manganês
mPVAT – tecido adiposo perivascular mesentérico
MRA - artéria mesentérica de resistência
NaCl - cloreto de sódio
NaOH - hidróxido de sódio
NF-κB fator de transcrição nuclear kappa B
NICE - National Institute for Health and Care Excellence

nNOS - sintase de óxido nítrico neuronal
NO - óxido nítrico
NOS – sintase de óxido nítrico
NOX-1 - subunidade da NAD(P)H oxidase
NPS - nitroprussiato de sódio
O₂⁻ - ânion superóxido
OCT - meio para congelamento de tecido
ODS - objetivos de desenvolvimento sustentável
OH⁻ - radical hidroxil
ONOO⁻ - peroxinitrito
PA - pressão arterial
PAD - pressão arterial diastólica
PAI-1 - inibidor do ativador do plasminogênio-1
PAS - pressão arterial sistólica
PDE^{'5} - fosfodiesterase 5
PDRF - fator relaxante derivado do PVAT
PGH₂ - prostaglandina H₂
PGI₂ – prostaciclina
PKG - proteína quinase G
PLA₂ - fosfolipase A₂
PMCA - Ca²⁺ATPase da membrana plasmática
PPAR_γ - receptor ativado por proliferador de peroxissoma-γ
PVAT - tecido adiposo perivascular
RANTES - regulado após ativação, células T normais expressas e secretadas
ROS - espécies reativas de oxigênio
RS - retículo endoplasmático
SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia
SDS - dodecil sulfato de sódio
SERCA - Ca²⁺ATPase do retículo endoplasmático
SHR - ratos espontaneamente hipertensos
SIM - sistema de informação sobre mortalidade
SNA - sistema nervoso autônomo
SOD – superóxido dismutase
SRAA - sistema renina-angiotensina-aldosterona

TBARS - substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

tPVAT – tecido adiposo perivascular aórtico torácico

TXA2 - tromboxano

UCP-1 - proteína de desacoplamento 1

VEGF - fator de crescimento do endotélio vascular

VSMC's - células musculares lisas vascular

SUMÁRIO

PARTE I

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1 APRESENTAÇÃO	27
2 REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1 Hipertensão Arterial.....	29
2.2 Modelos Experimentais de HA - Modelo DOCA-sal	32
2.3 Função do Sistema Arterial	35
2.3.1 Fatores Reguladores do Tônus Vascular	41
2.3.1.1 Óxido Nítrico (NO)	41
2.3.1.2 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDRF)	42
2.3.1.3 Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S)	43
2.3.1.4 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	43
2.3.1.8 Angiotensina II (ANG-II)	44
2.3.2 Fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do PVAT	45
2.4 Alterações vasculares na HA	46
2.4.1 Estresse oxidativo e inflamação na HA.....	49
2.4.2 Sistema renina-angiotensina (SRA) sistêmico e local na HA	51
2.5 Tratamento da HA	54
2.6 Uso de peptídeos bioativos derivados de proteínas alimentares na HA ...	55
2.7 Peptídeos bioativos de hidrolisado de clara de ovo (HCO)	58
3 HIPÓTESE	69
4 OBJETIVOS	69
4.1 Objetivo Geral	69
4.2 Objetivos Específicos	69

PARTE II

5 RESULTADOS	70
Manuscrito I - “ROS Suppression by Egg White Hydrolysate in DOCA-Salt Rats – An Alternative Tool against Vascular Dysfunction in Severe Hypertension”	71
Manuscrito II – “Egg White Hydrolysate modulates the renin-angiotensin system in mesenteric perivascular adipose tissue in DOCA-salt hypertensive rats and restores its anticontractile ability”	98

PARTE III

6 CONCLUSÕES	127
7 PERSPECTIVAS	128
8 REFERÊNCIAS	129
ANEXO I	142

1 APRESENTAÇÃO

Esta tese está escrita em formato de artigos, segundo as regras do PPG em Bioquímica da UNIPAMPA. O documento é composto inicialmente por uma revisão da literatura que contempla aspectos etiológicos, dados epidemiológicos e classificação da hipertensão arterial (HA), modelos experimentais de avaliação da HA, estrutura, função dos vasos sanguíneos bem como as alterações vasculares promovidas pela HA, tratamento padrão da HA, e estratégias terapêuticas advindas da dieta. Por fim, discorro sobre o uso de proteínas da clara do ovo contextualizando e apresentando os principais achados utilizando este tipo de proteína. A revisão foi baseada, em grande parte, em artigos científicos relativos ao tema obtidos na base de dados PubMed, sem recorte de ano de publicação, considerando o idioma inglês, a partir de buscas com palavras-chave como: “*Hypertension*”; “*Secondary Hypertension*”; “*DOCA-salt*”; “*Perivascular Adipose Tissue*” ou “*PVAT*” associadas às palavras “*Oxidative Stress*” ou “*Inflammation*” ou “*Tissue Adipose*”, “*Vessels*” ou “*Cardiovascular System*”. E, ainda as palavras: “*Egg Hydrolysis*”; “*Egg Hydrolysate*”; “*Egg White Hydrolysate*” “*Bioactive Peptides*”; “*Egg Protein*”. A seguir, são apresentados a hipótese, o objetivo geral e os objetivos específicos (PARTE I). Na sequência, os resultados são apresentados divididos em dois manuscritos (PARTE II). No primeiro manuscrito, avaliamos o efeito da suplementação dietética diária de um hidrolisado de clara de ovo (HCO) sobre os danos promovidos pela hipertensão DOCA-sal em vasos de condutância (aorta) e de resistência (MRA) e as vias implicadas no efeito vascular do HCO. Estes resultados foram publicados em 2022, no periódico “*Antioxidants*” com fator de impacto de 7,675 (B1 – CBII) sob o título “*ROS Suppression by Egg White Hydrolysate in DOCA-Salt Rats - An Alternative Tool against Vascular Dysfunction in Severe Hypertension*” (doi:10.3390/antiox11091713). O segundo manuscrito, submetido ao periódico “*British Journal of Pharmacology*” cujo fator de impacto é de 9.473 (A1 – CBII) demonstramos os efeitos protetores do HCO sobre a disfunção induzida pela hipertensão DOCA-sal no tecido adiposo perivascular mesentérico (mPVAT) bem como os mecanismos envolvidos nesta proteção. Na sequência, apresento a conclusão e perspectivas futuras, seguidas das referências e anexos que encerram esta tese. Sabendo que a construção de um doutoramento implica, além da produção científica a formação humana e pessoal, registro que neste período tive duas oportunidades de realização de estágios no exterior pelo período de três e seis meses, respectivamente. Ambas no Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación

(CIAL-CSIC) em Madrid, sendo a primeira (12/2021 a 03/2022), com ajuda financeira obtida pela aprovação do projeto I-COOP+ 2020 (COOPA 20453) intitulado "Hidrolizado de clara de huevo y salud cardiovascular – estudio del efecto antihipertensivo y menismos de acción en ratas DOCA-sal" fruto da cooperação com a Dra. Marta Miguel-Castro do Grupo de Pesquisa Bioactive Gastronomy do CIAL/CSIC, coordenadora espanhola do projeto. E, na segunda (12/2022 a 06/2023), oportunizada pela bolsa CNPq Edital 26/2021, processo nº 200482/2022-0/SWE concedida a Prof^a. Dr^a. Giulia Wiggers e também com tutoria espanhola da co-orientadora de tese Dr^a. Marta Miguel-Castro, onde além de desenvolver atividades no CIAL-CSIC, também realizei experimentos em cooperação na Universidad Rey Juan Carlos III no Laboratório de Histologia e Patología Clínica do Grupo de Investigación de Alto Rendimiento en Fisiopatología y Farmacología del Sistema Digestivo com o Prof. Dr. Jose Antonio Uranga-Ocio, um colaborador dos projetos em comum entre as orientadoras.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial (HA) é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), como insuficiência cardíaca, doença renal crônica, doença arterial coronariana, doença arterial periférica, dentre outras (ESC/ESH, 2018). A pressão arterial (PA) é determinada pela interação entre o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica (RVP), sendo esses dois componentes cruciais no desenvolvimento, manutenção e regulação da hipertensão (HA).

Atualmente, no mundo um em cada três adultos são hipertensos e esse cenário se repete no Brasil (SBC, 2023). Dados do Ministério da Saúde demonstram que o número de adultos com diagnóstico médico de HA aumentou 3,7% nos últimos 15 anos (Brasil, 2022). De acordo com o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) de 2010-2020, foram registradas 551.262 mortes por doenças relacionadas diretamente com a HA. Que coloca essa doença como destaque do grupo das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT's), relacionadas a meta dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 que envolve a redução de um terço, da mortalidade prematura por DCNT's.

A atual normativa da HA publicada pela *American Heart Association* (AHA) e pelo *American College of Cardiology* (ACC) no ano de 2017, classifica os valores de PA sistólica (PAS) acima de 130 mmHg e/ou PA diastólica (PAD) maiores que 80 mmHg como HA (Tabela 1) (AHA/ACC, 2017).

No entanto, as diretrizes europeias estabelecem valores maiores que 140 / 90 mmHg para o diagnóstico de HA (ESC/ESH de 2018). Pontos de corte com valores maiores também são utilizados pelo *National Institute for Health and Care Excellence* do Reino Unido que utiliza como referência de HA a faixa de PA $\geq 140 / 90$ mmHg (NICE, 2016). Semelhante com a classificação atual utilizada pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) que define HA Estágio I quando os valores estão acima de 140 / 90 mmHg. Embora, valores acima de 130 / 80 mmHg sejam classificados como pré-HA (Tabela 1) (SBC, 2020).

Tabela 1: Valores de referência para hipertensão arterial e níveis de estadiamento/gravidade.

PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	AHA/ACC 2017	ESH/ESC 2018	NICE 2016	SBC 2020
<120 e	<80	Normal	Ótima	Normal	Ótima
120-129 e	<80	Elevada	Normal	Normal	Normal
130-139 ou	80-89	Grau I	Normal alta	Normal alta	Pré-HA
140-159 ou	90-99	Grau II	Grau I	Grau I (≥135/85 mmHg)	Estágio I
160-179 ou	100-109	Grau II	Grau II	Grau II (≥150/55 mmHg)	Estágio II
≥180 ou	≥110	Grau II	Grau III	Severa	Estágio III

American Heart Association (AHA) e American College of Cardiology (ACC); as definições da European Society of Cardiology (ESC) e European Society of Hypertension (ESH); o posicionamento do National Institute for Health and Care Excellence (NICE) do Reino Unido e da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC). PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica.

Etiologicamente, a HA pode ser dividida segundo sua origem em primária ou secundária. A HA primária é aquela sem causa identificável e representa cerca de 90% dos casos de pacientes diagnosticados com HA (SBC, 2020). Por outro lado, a HA secundária (HS) são formas de HA relacionadas a uma causa identificada e, portanto, poderia ser resolvida removendo a causa subjacente (Rossi *et al.*, 2020). Dentre as causas mais comuns da HS estão alterações endócrinas, como o aldosteronismo primário, a feocromocitoma, o hipercortisolismo e o hiperparatireodismo, alterações renais como na HA renovascular e do parênquima e outras causas, como a síndrome de Cushing e a apneia obstrutiva do sono (Rossi *et al.*, 2020; Sarathy *et al.*, 2022).

A HS corresponde em 5-10% dos pacientes diagnosticados com HA (Sarathy, 2022). No entanto, a grande maioria dos hipertensos não busca tratamento pela causa de sua HA, ou seja, pela forma “secundária”. Essa subdetecção explica por que uma pequena porcentagem de pacientes hipertensos acaba sendo diagnosticada com uma forma secundária de HA. A prevalência dessas formas é, portanto, acentuadamente subestimada, embora possam atingir até um terço dos casos entre os pacientes encaminhados ao ambulatório e até metade daqueles com HS sejam de difícil tratamento (Rossi *et al.*, 2020).

Fisiologicamente, os valores da PA permanecem dentro de uma faixa de normalidade devido a um fino equilíbrio mantido entre os fatores reguladores da PA, como fatores neurais, hormonais ou locais que mantêm os níveis pressóricos adequados (Touyz *et al.*, 2018; Lamirault *et al.*, 2020). No entanto, quando há um desequilíbrio, especialmente, nos vasos sanguíneos resulta em liberação excessiva de substâncias vasoconstritoras e ocasiona alterações tanto estruturais quanto funcionais que aumentam a RVP e levam a HA (Féléto *et al.*, 2009; Nguyen Dinh Cat e Touyz *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2014; Torjesen *et al.*, 2017).

Independentemente do tipo de HA há fatores de risco relacionados ao seu desenvolvimento e manutenção, que são divididos em dois eixos principais: os não modificáveis, que incluem, os fatores genéticos e a idade; e os modificáveis dentre eles estão a obesidade, o hábito de fumar, o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, estresse, consumo exagerado de sal, a hipercolesterolemia e o sedentarismo (Ghorani *et al.*, 2021; Gorostidi *et al.*, 2022). O controle destes fatores tem demonstrado, juntamente com a adoção de hábitos alimentares saudáveis, ser um potente aliado no controle da HA.

Cabe salientar que na HA tanto os vasos sanguíneos de condutância quanto os de resistência sofrem modificações desde a camada endotelial até o tecido adiposo perivascular (do inglês “*perivascular adipose tissue*” - PVAT) (Ruan *et al.*, 2015; Matin *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016; Nosalski *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022). Essas modificações serão detalhadas nos tópicos 2.3.1. e 2.3.2.

Nesse sentido, sabendo que a HA promove inúmeras alterações no sistema cardiovascular e, em especial nos vasos sanguíneos e modifica os mediadores liberados em todas as camadas arteriais, tem-se buscado cada vez mais a elucidação dos mecanismos que contribuam para a sua gênese e/ou manutenção bem como alternativas de tratamento.

2.2 Modelos Experimentais de HA – Modelo DOCA-sal

Experimentalmente, diversos modelos animais são utilizados para investigar a fisiopatologia da HA e buscar novas formas de tratamento. Dentre eles os modelos geneticamente modificados envolvem a manipulação de genes específicos relacionados à regulação da PA, que mimetizam a HA primária. Outros modelos como hipertensão induzida por angiotensina II (ANG-II), L-NAME, ou ainda modelos de hipertensão renovascular onde o aumento da pressão arterial se dá pela oclusão da artéria renal, são empregados para investigar HA secundária.

Para investigar a HA secundária um dos modelos utilizados é o DOCA-sal que atinge níveis severos de classificação e mimetiza algumas alterações que podem ser encontradas em humanos como, baixos níveis de renina circulante e sensibilidade ao sódio.

Esse modelo de HA induzida envolve a administração de um mineralocorticoide que pode ou não ser acompanhado por uninefrectomia (Zicha *et al.*, 1989; Grobe *et al.*, 2011, Pestana-Oliveira *et al.*, 2020). Na década de 30, a desoxicorticosterona (DOC) foi identificada e sintetizada, um hormônio produzido pelas glândulas adrenais que possui atividade mineralocorticoide (Selye & Stone, 1946; Vinson *et al.*, 2011). Na década de 40, Selye e colaboradores (1946) observaram que a administração de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) induzia HA em ratos.

Este modelo, conhecido como DOCA-sal tem sido utilizado e embora possua variações de protocolo é um modelo de desenvolvimento de HA dependente de volume. Baseia-se na administração de DOCA e sobrecarga se sal acompanhado ou não por uninefrectomia (Pestana-Oliveira *et al.*, 2020).

O excesso de DOCA leva a um desequilíbrio no manejo do sódio por aumentar a reabsorção de sódio e água nos túbulos renais distais, exacerbado pela ingestão excessiva de sal e pela redução da massa renal, levando a um aumento do líquido extracelular e do volume plasmático (Schiffrin & Louis, 1987; Brown *et al.*, 1999). A HA DOCA-sal ocorre em vários estágios. Na fase inicial (dias) de tratamento com DOCA, o sódio é retido nos túbulos distais do rim em detrimento ao aumento de excreção de K^+ pelas células renais. Na segunda fase (semanas) há o balanço de sódio e depleção crônica de K^+ com aumento abrupto de PA durante as primeiras 48 horas, seguido por um aumento gradual da PA nas semanas seguintes levando à HA sustentada que se estabelece entre 4^a a 7^a semana (Mohring *et al.*, 1977; Jacob *et al.*, 2005; Brooks *et al.*, 2006).

Além do componente renal, a HA DOCA-sal, possui um componente neurogênico substancial, relacionada a hiperatividade simpática, que pode ser resultante em parte do aumento da osmolaridade plasmática, e reflexo barorreceptor alterado que precedem o aumento na PA em ratos neste modelo (Takeda *et al.*, 1988a,b; O'donoghuy e Brooks, 2006). Essa hiperatividade simpática aumenta a vasoconstrição em ambas as arteríolas e na circulação venosa. A importância da regulação cerebral nesse modelo é evidenciada por estudos que mostraram que lesões em determinadas regiões do hipotálamo atenuaram o surgimento e/ou gravidade da HA DOCA-sal (Fink *et al.*, 1987; Osborn *et al.*, 2006; Collister *et al.*, 2018).

Ademais, mesmo que a HA DOCA-sal seja caracterizada por atividade de renina plasmática suprimida, as concentrações de ANG-II no encéfalo podem estar aumentadas, provavelmente contribuindo para a ativação simpática e retenção de sal e água por meio de efeitos nos receptores AT1R (Grobe *et al.*, 2011). Há também evidências do envolvimento do receptor de (pro)renina nesses processos pois, o bloqueio seletivo do receptor de (pro)renina no cérebro com o antagonista PRO20 reduziu a PA em ratos DOCA, bem como animais nocaute do receptor de (pró) renina específico de neurônios preveniu o desenvolvimento da HA em ratos DOCA-sal (Li *et al.*, 2014; Danser *et al.*, 2015).

Além da hipervolemia e das alterações neurogênicas, esse modelo promove modificações nos vasos sanguíneos tanto funcionais quanto estruturais, modificando a resposta vasoconstritora (Pérez-Rivera *et al.*, 2005) e/ou reduzindo a resposta vasodilatadora via prejuízo da síntese e/ou biodisponibilidade de NO (Wenceslau *et al.*, 2014; Gómez-Gusmán *et al.*, 2012; Matin *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016). Ainda, promove ativação da NADPH oxidase e COX (Glosh *et al.*, 2004; Callera *et al.*, 2006; Gómez-

Guzmán *et al.*, 2012; Wenceslau *et al.*, 2014; Marin *et al.*, 2016) o que pode levar consequentemente ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês – “*reactive oxygen species*”), especialmente ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e, ainda pode ativar a xantina oxidase e as mitocôndrias para produção de ROS (Callera *et al.*, 2006; Viel *et al.*, 2008; Wenceslau *et al.*, 2014) e ativação da endotelina-1 (Callera *et al.*, 2003, 2004; Montezano *et al.*, 2005). Somado este modelo pode levar a redução da atividade das isoformas da superóxido dismutase Cu/Zn/SOD e expressão de MnSOD, importantes detoxificantes celulares (Wu *et al.*, 2001, Callera *et al.*, 2006).

Na HA DOCA-sal há aumento de citocinas pro-inflamatórias, tais como IL-6 e IL-1 β ; do NF-kB e infiltração de macrófagos (Seifi *et al.*, 2010; Thang *et al.*, 2015; Krishan *et al.*, 2016) que contribuem para o remodelamento hipertrófico nas artérias de resistência e manutenção da HA (Ko *et al.*, 2007; Yemane *et al.*, 2010). Além disso, maior produção de células T que contribuem para o agravamento da HA (Guzik *et al.*, 2007).

Portanto, esse modelo é bastante interessante para ser utilizado na pesquisa tanto na investigação da fisiopatologia da HA quanto na busca de estratégias terapêuticas para o tratamento dessa doença. Pois existem componentes dependente de volume, neurogênico, vasculares e imunes que afetam os sistemas nervosos central e periférico (Basting e Lazartigues, 2017; Colliester *et al.*, 2018; Lerman *et al.*, 2019).

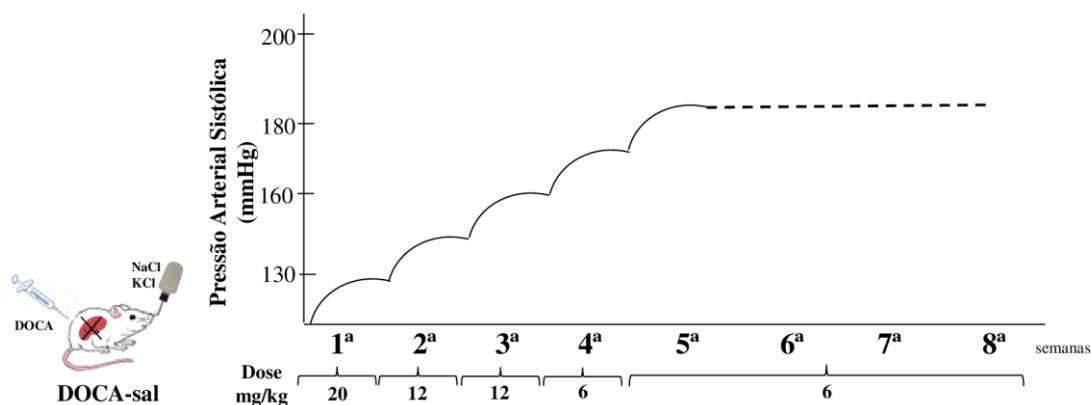


Figura 1: Gráfico representativo do aumento da pressão arterial sistólica em mmHg nas semanas de indução no Modelo DOCA-sal. A partir da 4ª/5ª semana habitualmente a PA estabiliza em níveis médios de 190 mmHg. (Fonte: desenho da própria autora com base nos estudos desenvolvidos por Tostes *et al.*, 2000; Callera *et al.*, 2003).

2.3 Função do Sistema Arterial

O sistema arterial compreende os grandes vasos de condução, artérias musculares e pequenas artérias (Cao *et al.*, 2022). A vasculatura arterial é responsável pelo transporte de oxigênio e nutrientes para todos os tecidos do corpo (Marziano *et al.*, 2021).

A parede arterial é constituída, por diferentes camadas anatômicas identificadas como: a túnica íntima (endotélio), a túnica média (camada muscular) e a túnica externa (adventícia). A maior parte das artérias, exceto as cerebrais e pulmonares, ainda são envolvidas por um tecido adiposo perivascular ou túnica adiposa (PVAT) (Eelen *et al.*, 2020; Hillock-Watling e Gotlieb, 2022) (Figura 2).

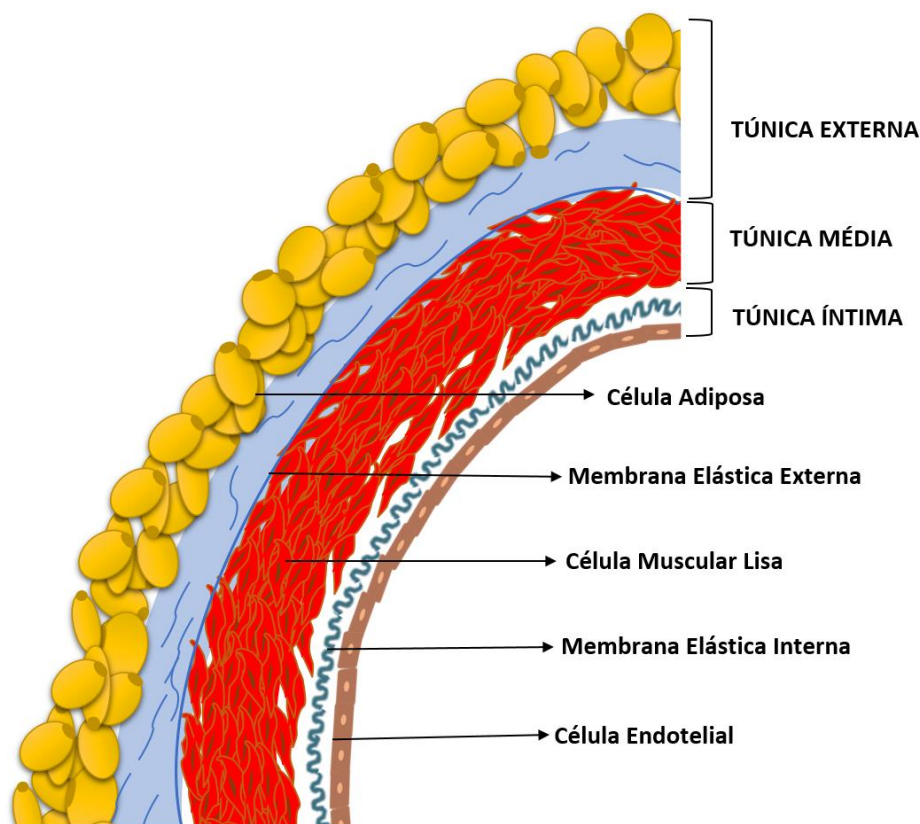


Figura 2: Representação das diferentes camadas que compõem a parede arterial de artéria de resistência constituídas pelas túnicas externa, média e íntima. (Fonte: desenho da autora baseado em Oiseth *et al.*, 2022).

As grandes artérias servem como condutos que transportam o sangue oxigenado para as artérias menores. Por outro lado, os vasos que, quando relaxados, medem menos de 300 μm de diâmetro do lúmen, atuam como o principal local de resistência vascular e incluem uma rede de artérias de resistência (diâmetro do lúmen $> 300 \mu\text{m}$) e arteríolas ($< 150 \mu\text{m}$).

As células musculares lisas vasculares contráteis (do inglês “vascular smooth muscle cells” – VSMC’s) são os elementos predominantes da camada média e são cruciais para o bom desempenho da vasculatura. Essa camada é inervada pelo sistema nervoso autônomo e seu estado contrátil é regulado por hormônios, peptídeos vasoativos e ROS. As VSMC’s possuem um complexo esqueleto de citoesqueleto, proteínas contráteis estruturais e funcionais e moléculas reguladoras associadas. Essas células se conectam a células vizinhas por meio de junções comunicantes, como as conexinas, que controlam a sincronização na concentração de íons e potencial de membrana entre as células vizinhas (Cao *et al.*, 2022). A elasticidade da artéria é creditada principalmente a presença de lâminas elásticas que permitem que o fluxo sanguíneo seja mais uniforme, reduzindo as variações de pressão durante a sístole e a diástole (Cao *et al.*, 2022).

Por outro lado, as VSMC’s em pequenas artérias de resistência são responsáveis por regular a distribuição do fluxo sanguíneo, reduzindo o diâmetro e apresentando resistência. Essas artérias são responsáveis pela distribuição regional do tônus vascular e do fluxo sanguíneo e desempenham um papel importante na regulação da PA por meio de efeitos na resistência vascular. Três parâmetros fundamentais determinam a resistência ao fluxo sanguíneo, incluindo diâmetro do vaso, comprimento arterial e viscosidade sanguínea. Destes, o diâmetro do vaso é o mais importante pois discretas variações no diâmetro vascular relacionadas a contração ou dilatação do mesmo refletem sobremaneira na resistência vascular. Isto porque com base na Lei de Poiseuille, a resistência do vaso é proporcional ao comprimento do vaso e inversamente proporcional ao raio elevado à quarta potência (r^4) (Aires, 2018).

As VSMC’s são células especializadas altamente plásticas e multifuncionais. Fisiologicamente apresentam baixa atividade metabólica e normalmente, expressam genes e proteínas importantes para a contração/dilatação, o que lhes permite controlar a pressão sistêmica e local por meio da regulação do tônus vascular. No entanto, em condições patológicas, as células contráteis altamente diferenciadas entram no ciclo celular assumindo um fenótipo proliferativo/migratório expressando proteínas contráteis e do citoesqueleto específicas como ciclinas, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK’s), fatores de transcrição pró-inflamatórios e metaloproteinases de matriz, etc (Sorokin *et al.*, 2020; Romvouts *et al.*, 2022).

As EC’s exercem vários efeitos sobre as VSMC’s por secretarem agentes vasoativos, tais como, óxido nítrico (NO), prostaciclina, prostaglandinas, tromboxano, ANG-II, endotelina-1 (ET-1) e ROS (detalhados no subitem 2.3.1) que modulam o

diâmetro do vaso influenciando a função vascular (Marín e Sánchez-Ferrer, 1990; Tostes *et al.*, 2000; Hernanz *et al.*, 2014; Incalza *et al.*, 2018).

A hiperreatividade vascular, o remodelamento e enrijecimento vascular envolvem alterações na organização do citoesqueleto, conexões célula a célula, crescimento celular, calcificação, inflamação e rearranjo das VSMC's. No nível extracelular, este remodelamento é influenciado por mudanças na composição das proteínas da matriz e reorganização de proteoglicanos, colágenos, fibronectina e elastina, alterando a elasticidade vascular (Tomazelli *et al.*, 2023). A ativação de adipócitos no PVAT secreta adipocinas vasoativas que também influenciam a reatividade, a contratilidade vascular e mudanças estruturais na camada adventícia (Dos Reis Costa *et al.*, 2021).

A regulação aguda do diâmetro vascular e, conseqüentemente, da resistência vascular depende do estado de ativação da maquinaria contrátil envolvendo a interação actina-miosina nas VSMC's. Alterações nas concentrações de Ca^{2+} , fluxos iônicos e potencial de membrana levam à fosforilação mediada por cálcio-calmodulina das cadeias leves regulatórias de miosina (MLCs) e ciclagem de ponte cruzada actina-miosina com conseqüente vasoconstrição rápida. Mecanismos independentes de cálcio associados com alteração da sensibilização ao cálcio e remodelamento dos filamentos de actina e aumento da biodisponibilidade de ROS (estresse oxidativo) também modulam a contração vascular (Cao *et al.*, 2022).

O evento-chave no acoplamento excitação-contração das VSMC's é um aumento na concentração de Ca^{2+} em resposta a estímulos mecânicos, humorais ou neurais e a essa sinalização de Ca^{2+} controlam as principais funções das VSMC's e são finamente sintonizadas pelos canais, trocadores e transportadores permeáveis ao cálcio da membrana plasmática e por fontes intracelulares, incluindo o retículo sarcoplasmático (RS), mitocôndrias e proteínas ligantes de cálcio. No entanto, na HA, esses processos são alterados levando ao aumento dos níveis Ca^{2+} e a um estado de hipercontrátil e conseqüente remodelamento vascular

Por outro lado, dada a importância do aumento da concentração de Ca^{2+} para a contração, o oposto, ou seja, redução dos níveis de Ca^{2+} causa vasodilatação (Langst *et al.*, 2021; Cao *et al.*, 2022).

Além disso, dois nucleotídeos cíclicos, o cAMP e cGMP (do inglês, “*adenosine monophosphate*” – cAMP e “*cyclic guanosine monophosphate*”- cGMP) são essenciais na vasodilatação e para manter os níveis pressóricos dentro da faixa de normalidade (Špiranec *et al.*, 2018). Seus níveis são limitados a atividade de um conjunto de enzimas

denominadas fosfodiesterases (do inglês, “*phosphodiesterase*”- PDEs). O cAMP é formado pela ação da adenilato ciclase (AC) sobre o ATP. O cGMP é sintetizado pela guanilato ciclase (GC). Os peptídios natriuréticos ativam a GC particulada (GCp), enquanto o NO ativa a forma solúvel (GCs). A ação vasodilatadora do cGMP é principalmente mediada pela atividade da proteinoquinase G (PKG), enquanto a do cAMP é principalmente mediada pela atividade da proteinoquinase A (PKA). Onde a PKA e a PKG são responsáveis por: reduzir da concentração de Ca^{2+} via (a) aumento da recaptação de Ca^{2+} pelo RS via ativação da Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA); (b) aumentar do efluxo de Ca^{2+} pela Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA); (c) reduzir o influxo de Ca^{2+} ; (d) reduzir a liberação de Ca^{2+} do RS pela inibição dos canais para Ca^{2+} sensíveis aos IP₃. Somados a hiperpolarização das VSMC's pela ativação de canais para K^+ de larga condutância, canais para K^+ sensíveis à voltagem (KV), canais para K^+ sensíveis a ATP, canais para K^+ retificadores de entrada (Kir) e/ou da Na^+/K^+ -ATPase (Vanhoutte *et al.*, 2017).

A regulação do tônus vascular envolve a liberação de mediadores da camada endotelial, assim como mudanças na camada média pela liberação de vasoativos expressos e/ou liberados pela túnica adiposa, que circunda a maioria dos vasos de mamíferos, com algumas exceções como as artérias cerebrais e pulmonares (Adachi *et al.*, 2023). A partir de estudos de Soltis e Cassis (1991), as funções fisiológicas do PVAT como importante papel endócrino, tanto autócrino quanto parácrino são descritas. A ação anti-contrátil apresentada pelo PVAT frente a estímulos constritores, secretam uma variedade de citocinas, hormônios, quimiocinas e ácidos graxos, adipocinas, leptina, adiponectina, óxido nítrico (NO), sulfeto de hidrogênio (H_2S (Tabela 2 – pág 46) (Gil-Ortega *et al.*, 2015; Victorio e Davel, 2020; Barp *et al.*, 2021).

Inicialmente, descrito somente como suporte mecânicos aos vasos sanguíneos, estudos demonstraram a sua importância na regulação da função vascular/endotelial tanto na fisiologia quanto na patologia (Araújo *et al.*, 2015; Victorio *et al.*, 2016; Ayala-Lopez *et al.*, 2017; Baltieri *et al.*, 2018).

Este tecido representa cerca de 3% da massa total de tecido adiposo corporal, e é composto majoritariamente por adipócitos, além de fibroblastos, EC's e imunes (macrófagos, linfócitos e eosinófilos), matriz extracelular e terminações nervosas adrenérgicas (Siegel-Axel e Haring, 2016; Gao *et al.*, 2017; Man *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021). Nos últimos anos seu papel ativo na produção de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras emergiu como um importante órgão endócrino (Galic *et al.*, 2010). E hoje

é sabido que esse tecido contribui para a regulação da homeostase vascular e afeta a patogênese das doenças cardiovasculares (DCV), dentre elas, a HA.

Estruturalmente, somente na década de 80, Hausman e Champion (1982) descreveram, pela primeira vez, evidências histoquímicas e ultra estruturais de pré-adipócitos localizados no PVAT. Em 1984, de Souza e colaboradores descreveram que as bainhas de lamelas dos vasos eram formadas por redes de fibras colágenas e elásticas. Porém, nos anos seguintes não há registros de trabalhos completos publicados sobre a função desse tecido até o início da década de 90, quando os estudos de Soltis e Cassis (1991) usando aorta de ratos *Sprague-Dawley* na presença e ausência de PVAT verificaram que a contração induzida por norepinefrina foi reduzida em tecidos com PVAT, indicando a participação desse tecido na regulação da função vascular.

Nos anos seguintes novamente houve um novo hiato onde nenhum um trabalho foi publicado sobre o papel do PVAT na regulação vascular, visto que o endotélio ainda era o grande objeto de estudo nos anos 90. Porém, no início dos anos 2000 o estudo da função ativa do PVAT no controle do tônus vascular ganhou novamente destaque e novas evidências foram publicadas.

As características do PVAT são semelhantes ao do tecido adiposo e é classificado segundo suas características morfológicas e funcionais em branco e marrom variando de acordo com a espécie animal e região anatômica (aorta, mesentério) (Szasz e Webb, 2012; GAO, et., 2014; Brown *et al.*, 2014; Gil-Ortega *et al.*, 2015). Nas artérias mesentéricas de roedores o PVAT (do inglês “*mesenteric perivascular adipose tissue*” - mPVAT) que as envolve é predominantemente do tipo branco, já a artéria aorta na sua porção torácica a característica do PVAT (do inglês “*thoracic aorta perivascular adipose tissue*” - tPVAT) é predominantemente do tipo marrom e se modifica para a aorta abdominal para o tipo branco e bege (do inglês “*abdominal aorta perivascular adipose tissue*” aPVAT), na artéria renal há uma mescla destes dois tipos de adipócitos, marrom e branco (Padilla *et al.*, 2013; Victório e Davel, 2020; Adachi *et al.*, 2023) (Figura 3).

Quanto a sua morfologia os adipócitos do tecido branco são compostos por uma única vesícula lipídica monocular com uma pequena quantidade de citoplasma. Já os adipócitos do tecido marrom contêm vesículas lipídicas multiloculares menores (Padilla *et al.*, 2013).

Ademais, um outro tipo de tecido adiposo, denominado como tecido adiposo bege, que pode apresentar populações de adipócitos brancos e marrons capazes de coexistir dentro de uma mesma estrutura, e modificar o estado metabólico global em situações

fisiológicas ou patológicas. Podendo ter dupla função: comporta-se como o branco, armazenando o excesso de energia ou, quando estimulado (exposição ao frio, estimulação simpática), tem seu programa termogênico ativado, elevando a expressão de UCP1 (*Uncoupling Protein-1*) a níveis semelhantes aos do tecido adiposo marrom e promovendo maior dissipação de energia (Frigolet e Guriérrez, 2020).

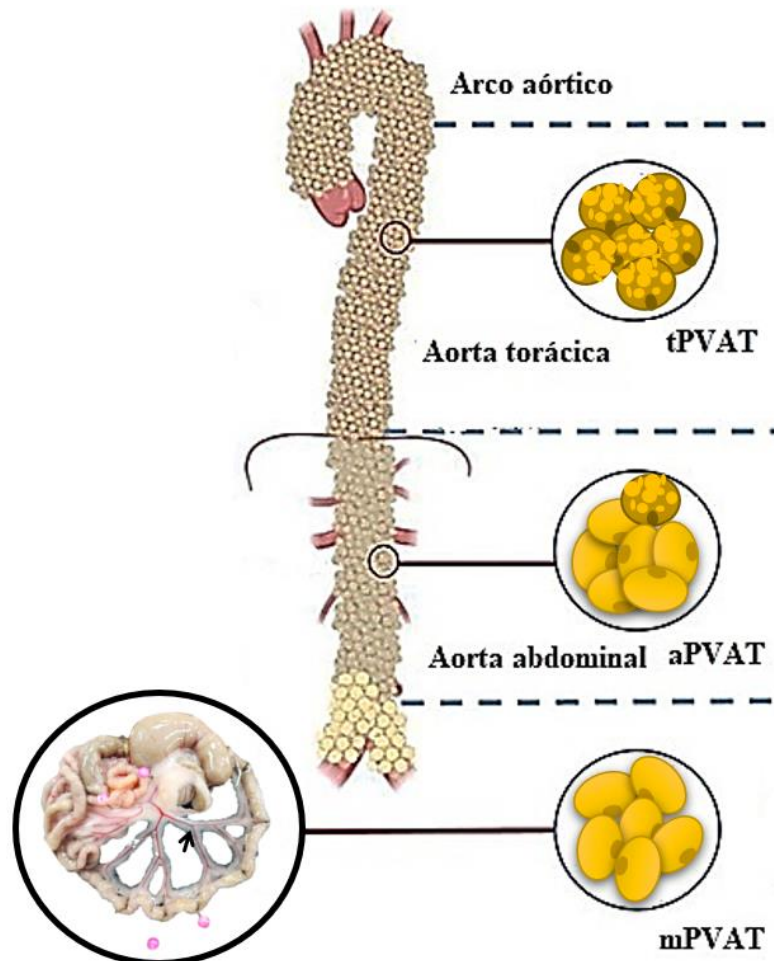


Figura 3: Representação gráfica das diferenças entre os tipos de tecido adiposo perivascular – PVAT em artéria aorta na sua porção torácica (tPVAT), aorta abdominal (aPVAT) e em tecido mesentérico (mPVAT). (Modificado de Li *et al.*, 2021).

Sob condições patológicas esse tecido torna-se disfuncional e secreta adipocinas pró-inflamatórias, como, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β) dentre outros que induzem disfunção no próprio tecido e nas demais camadas dos vasos sanguíneos, que será melhor abordado a seguir na condição da HA (Gao *et al.*, 2014; Man *et al.*, 2020).

2.3.1 Fatores reguladores do tônus vascular

Tanto o endotélio como o PVAT são tecidos funcionais que liberam mediadores vasodilatadores e vasoconstritores que afetam o tônus vascular. No endotélio são liberados os seguintes vasoativos:

2.3.1.1 Óxido Nítrico (NO)

O NO é um gás instável com uma meia-vida muito curta e de fácil difusão através das membranas biológicas. Pode ser produzido por três isoformas da enzima sintase de NO (NOS), sendo elas: NOS neuronal (nNOS), NOS induzível (iNOS) e NOS endotelial (eNOS). É o principal fator vasodilatador produzido pelo endotélio, que com o aumento da concentração de cálcio no citosol aumentará a formação de complexos cálcio-calmodulina, que ativarão o domínio de ligação da calmodulina da eNOS e levará a produção de NO (Moncada *et al.*, 1991). Além disso, o aumento do estresse de cisalhamento hemodinâmico, proteína quinase A (PKA) e proteína quinase B (Akt) no vaso sanguíneo irão induzir a fosforilação da eNOS no sítio Ser¹¹⁷⁹ (Quillon e Fromy, 2015; Zhao *et al.*, 2015). Uma vez ativada a eNOS, ela irá catalisar a quebra de L-arginina em NO. Posteriormente, o NO se difundirá para VSMC's adjacentes para estimular a atividade dos componentes abaixo de sua cascata de sinalização, como guanilil ciclase solúvel (sGC), monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) e proteína quinase G (PKG), resultando em vasodilatação (Marín & Rodrigues-Martinez *et al.*, 1991; Jakala *et al.*, 2009).

A produção do NO pode estimular ainda mais os canais de K⁺ ativados por cálcio (KCa) (Chadha *et al.*, 2011) e os canais de K⁺ ativados por voltagem (Kv) através da via independente de sGC (Stoclet *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 1996). A eNOS e nNOS são expressas constitutivamente e são dependentes de Ca²⁺/CaM, aumentando a síntese de NO paralelamente ao aumento da concentração intracelular de Ca²⁺. A iNOS apresenta uma localização mais abrangente, e é induzível, pois para sua ativação requer que a célula seja estimulada por substâncias pró-inflamatórias como citocinas ou lipopolissacarídeos (LPS) (Figura 4).

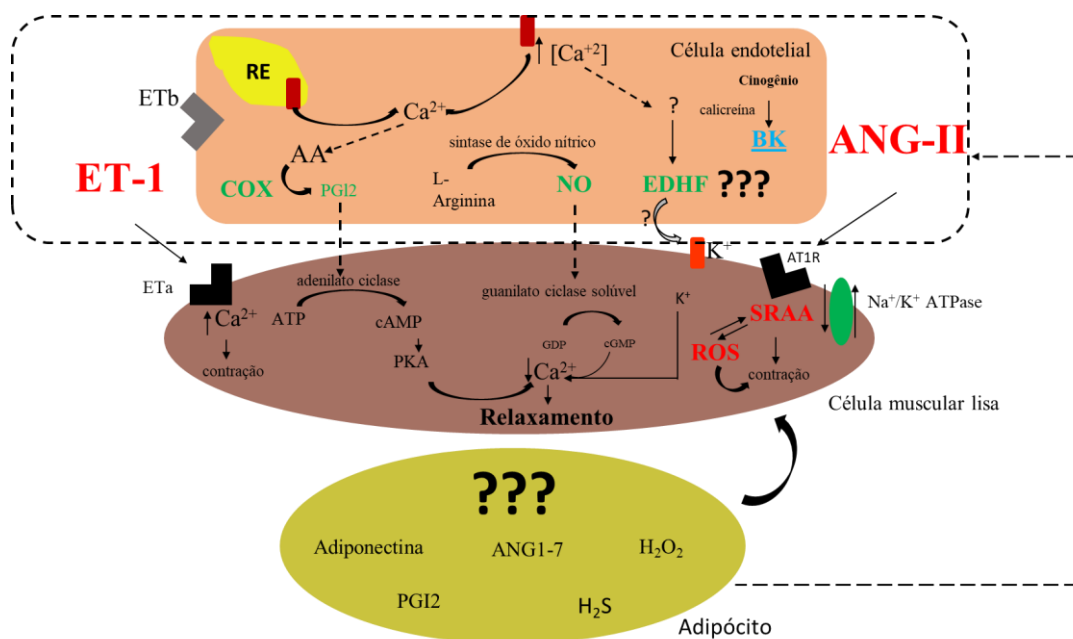


Figura 4: Esquema representativo dos fatores vasodilatadores e vasoconstritores liberados pelo endotélio e pelo PVAT. (Fonte: Própria)

2.3.1.2 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Os EDHF's foram descobertos quando havia resíduos de relaxamento dependente do endotélio observados mesmo após a depleção de NO e PGI₂ (Wang, 2002; Scotland *et al.*, 2005). A identidade química dos EDHF's ainda é desconhecida, e a possibilidade da existência de vários EDHF's é descrita (Tomioka *et al.*, 1999; Vanhoutte *et al.*, 2016). Em geral, as respostas mediadas pelos EDHF's envolvem aumento da concentração intracelular de Ca²⁺, abertura de canais Kca e hiperpolarização das EC's. Isso resulta em uma hiperpolarização dependente do endotélio das VSMCs, que pode ser evocada por acoplamento elétrico direto através das junções mioendoteliais e/ou pelo acúmulo de íons de K⁺ no espaço intercelular. Os íons K⁺ hiperpolarizam as VSMCs ativando os canais retificadores internos de K⁺ e/ou Na⁺/K⁺ATPase (Nelson e Quayle *et al.*, 1995). O endotélio libera metabólitos, como a PGI₂ e TXA₂ (García-Redondo *et al.*, 2009). Os ácidos epoxieicosatrienóicos (EET) gerados não são apenas mensageiros intracelulares, mas também podem difundir e hiperpolarizar as K⁺ ativando canais Kca. Adicionalmente, o endotélio pode produzir outros EDHF's de lipoxigenases.

2.3.1.3 Sulfeto de Hidrogênio (H₂S)

De maneira semelhante ao NO, o H₂S é gerado a partir de um aminoácido (L - cisteína) e as enzimas que o sintetizam são expressas na maioria dos órgãos e tecidos do corpo (Li *et al.*, 2012). Alternativamente, a L-cisteína pode ser convertida em 3-mercaptopiruvato pela cisteína aminotransferase (CAT) e depois em H₂S por meio da 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3-MST) (Li *et al.*, 2012). Evidências demonstram que a produção de H₂S poderia ser aumentada pelo menos duas vezes no endotélio quando desencadeada pela ativação do VEGF (do inglês “*Vascular endothelial growth factor*”) e do receptor muscarínico por meio da ativação dependente de Ca²⁺-calmodulina. Além disso, H₂S é difusível nos VSMC’s adjacentes para inibir o ATP de se ligar aos canais de K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), ativando assim os canais e subsequentemente permitindo o efluxo de K⁺ que resulta em hiperpolarização. O H₂S também pode inibir a ação da fosfodiesterase 5 (PDE5) na quebra do cGMP, resultando em um aumento dos efeitos vasodilatadores (Wang, 2009; Coletta *et al.*, 2012).

2.3.1.4 Espécies Reativas de Oxigênio

Em condições patológicas, como na HA, o endotélio produz grandes quantidades de ROS, como o O₂^{•-}, os radicais hidroxil (OH[•]), o peroxinitrito (ONOO⁻), dentre outros, associados a redução das defesas antioxidantes enzimáticas, como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e mieloperoxidases e defesas antioxidantes não-enzimáticas, como vitamina C e E, glutathionas (Dubois-Deruy *et al.*, 2020; Krezeminska *et al.*, 2022).

Em condições fisiológicas, a enzima superóxido dismutase (SOD) inibe a ação oxidante do O₂^{•-} reduzindo-o a H₂O₂ que posteriormente pode sofrer ação da glutathione peroxidase e/ou catalase e ser eliminado em forma de H₂O e pode também ser precursor de outros radicais como o OH[•] (Touyz *et al.*, 2020). O H₂O₂ pode atuar tanto como vasoconstritor como vasodilatador como observado nas artérias mesentéricas e intrarrenais (Muñoz *et al.*, 2018; Katunaric *et al.*, 2022). Entretanto, sob estresse oxidativo, contudo, quantidades exacerbadas de O₂^{•-} reagem com o NO para formar o peroxinitrito (ONOO⁻), que atua como radical livre, altamente oxidativo (Touyz *et al.*, 2020; Griendling *et al.*, 2021).

O íon OH^\cdot é a espécie reativa mais reativa e é formado a partir de H_2O_2 pela oxidação de Fe^{2+} ou Cu^{2+} e tem ação tanto constritora quanto vasodilatadora (Griendling *et al.*, 2021).

Nos vasos sanguíneos dentre todas as espécies reativas presentes, destaca-se o O_2^\cdot que é gerado pela adição de um elétron a molécula de oxigênio e pode ser produzido pela atividade da cadeia respiratória mitocondrial, pelas xantinas-oxidases, ciclooxigenases, lipoxigenase, pelo desacoplamento da e-NOS, mas principalmente ativação do complexo da NADP(H) oxidase (Griendling *et al.*, 2021; Vermot *et al.*, 2021).

O O_2^\cdot desempenha importante papel na indução de apoptose, angiogênese endotelial e expressão de fatores implicados na inflamação das VSMC's (Dubois-Deruy *et al.*, 2020; Krzeminska *et al.*, 2022). Além disso, o O_2^\cdot pode induzir contração vascular (Santillo *et al.*, 2015). Como também, reduzir a biodisponibilidade de NO endotelial e seu efeito vasodilatador por formar o ONOO^\cdot , bem como o O_2^\cdot e o ONOO^\cdot possuem efeitos vasoconstritores diretos (Guzik e Touyz, 2017; Touyz *et al.*, 2020; Vermot *et al.*, 2020).

2.3.1.5 Angiotensina II (ANG-II)

O octapeptídeo ($\text{NH}_2\text{-Asp}^1\text{-Arg}^2\text{-Val}^3\text{-Try}^4\text{-Lle}^5\text{-His}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-COOH}$), ANG-II, é resultante da transformação da ANG-I pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) no plasma e em vários tecidos, como rins, cérebro, adrenais, músculo liso vascular e, também, nas EC's e adiposas (Gao, 2009; Nguyen Dinh Cat *et al.*, 2013; Young & Davisson, 2015; Leite *et al.*, 2022; Pedreanez *et al.*, 2022). As funções biológicas da ANG-II são mediadas por dois receptores, principais, denominados receptor tipo 1 (AT1R) e receptor tipo 2 (AT2R) (Ichki, 2013). A maioria dos efeitos cardiovasculares da ANG-II são mediados pelo AT1R que é amplamente expresso no corpo. A expressão de AT1R é aumentada em lesões cardiovasculares e é regulada por muitas substâncias bioativas endógenas e drogas.

Considera-se geralmente que o AT2R antagoniza os efeitos do AT1R, mas sua função precisa ainda é controversa, particularmente em humanos, embora nos últimos anos o papel protetor do AT2R está sendo postulado (Obst *et al.*, 2004; Arendse *et al.*, 2019; Ranjit *et al.*, 2021). A expressão de AT2R é baixa em animais adultos normais, mas quando há lesões cardiovasculares e na HA a expressão de AT2R está aumentada (Ichki, 2013; Dai *et al.*, 2016). A regulação dinâmica da expressão de AT1R e AT2R sugere um

envolvimento ativo dos receptores de ANG-II no desenvolvimento de DCV, como HA, aterosclerose, insuficiência cardíaca, doenças renais crônicas e doenças cerebrovasculares. Entre as múltiplas ações da ANG-II incluem-se contração e proliferação de células musculares lisas vasculares, aumento da contratilidade e indução de hipertrofia cardíaca, estimulação da secreção de aldosterona e consequente formação de colágeno e outros elementos da matriz extracelular, liberação de vasopressina e estimulação do SNS (Arendse *et al.*, 2019).

2.3.2 Fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do PVAT

Desde o primeiro trabalho publicado por Soltis e Cassis (1991) até os dias atuais o PVAT vem se destacando no papel ativo na fisiologia e fisiopatologia vascular. Em condições fisiológicas, o PVAT libera mediadores essenciais para manter o tônus e modular a função dos vasos sanguíneos (Galvez *et al.*, 2006; Gao, 2007). Nestes, estão incluídos, o fator relaxante derivado do PVAT (PDRF) (Figura 5), que demonstrou afetar o tônus vasomotor e regular importantes funções homeostáticas dos leitos vasculares, embora, ainda permaneça desconhecida a totalidade de sua natureza, a adiponectina, o H_2O_2 , o H_2S , a PGI₂, ANG1-7 são candidatos apontados (Lohn *et al.*, 2002; Szasz *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2014) (Tabela 2).

Tabela 2: Moléculas biologicamente ativas derivadas do PVAT com efeitos vasculares.

PODEM SER LIBERADAS PELO PVAT	
Adipocinas	Leptina, adiponectina, resistina, visfatina, adrenomedulina, omentina, nesfatina, vaspina, chemerin
Citocinas	IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, PAI-1, TNF α , RANTES
Moléculas	Superóxido, peróxido de hidrogênio, NO, H ₂ S
PODEM SER EXPRESSAS PELO PVAT	
Moléculas de SRA	Angiotensinogênio, angiotensina I, angiotensina II, angiotensina (1-7), ECA1, ECA2, renina, receptor (pro)renina, receptores AT1R e AT2R
ROS/estresse oxidativo	NADPH oxidase, SODs, eNOS desacoplada, lipoxigenases
Adipocinas	Adipocinas, receptores de adipocinas, ácidos graxos livres, PPAR γ , UCP-1
Células inflamatórias	Citocinas, receptores de citocinas
Outros	Metaloproteases, hormônios esteróides, complemento 3

Fonte: Adaptado de Man et al., 2020.

Okamoto e colaboradores (2001) relataram o aumento de leucócitos no PVAT em resposta à lesão por angioplastia das artérias coronárias, sugerindo a produção de mediadores inflamatórios nesse tecido, relacionado ao desenvolvimento de DCV. Em doenças associadas à disfunção vascular, como na HA, a liberação de PDRF é diminuída, enquanto PVAT libera uma série de fatores parácrinos, como adipocinas (resistina, leptina e visfatina), citocinas (IL-6 e TNF- α), quimiocinas e proteína quimiotáticas de monócitos 1 (MCP-1, CCL2) as quais podem afetar diretamente VSMCs e CEs e que iniciam a inflamação vascular. Este desequilíbrio entre a produção e liberação de fatores protetores e moléculas pró-inflamatórias foi denominado, de forma semelhante à disfunção endotelial, de disfunção do PVAT (Guzi *et al.*, 2006, 2007; Almabrouk *et al.*, 2017).

2.4 Alterações vasculares na HA

A HA está associada a alterações vasculares significativas caracterizadas por disfunção endotelial, aumento da contração vascular e remodelamento arterial (Figura 4). As VSMC's estão criticamente envolvidas nesses processos por meio de suas características altamente plásticas e dinâmicas e capacidade de sofrer diferenciação fenotípica. Estímulos pró-hipertensivos, como ativação do sistema renina-angiotensina-

aldosterona (SRAA), estresse oxidativo, ativação do sistema nervoso simpático, alterações hemodinâmicas e forças mecânicas estimulam a sinalização dessas células, levando à vasoconstrição, hipertrofia vascular, fibrose, inflamação e calcificação, processos subjacentes às alterações vasculares funcionais, estruturais e mecânicas (Touyz *et al.*, 2018; Vermot *et al.*, 2020).

A disfunção endotelial é característica marcante na HA, caracterizada por vasoconstrição, proliferação celular e mudança para um estado pró-inflamatório e pró-trombótico (Gallo, *et al.*, 2022). Na HA, a disfunção endotelial pode estar envolvida no início e desenvolvimento da inflamação vascular, remodelamento vascular (Alexander *et al.*, 2021). Diferentes condições, como estresse de cisalhamento vascular prejudicado, inflamação e estresse oxidativo, ativação do SRA tem sido descritos como importantes mecanismos fisiopatológicos envolvidos (Dubois-Deruy *et al.*, 2020, Griendling *et al.*, 2021).

Dentre os mediadores gerados pelo PVAT está a ANG-II assim como o AGT (do inglês “angiotensinogen, AGT”), ECA (ACE do inglês “angiotensin-converting enzyme”, do receptor (pro)renina, receptores de ANG-II e do receptor mineralocorticoide (do inglês “mineralocorticoid receptor” - MR) (Gálvez-Prieto *et al.*, 2008).

Os mediadores do SRA diferem em presença e expressão do PVAT nos diversos leitos vasculares e se assemelham em relação a expressão de AGT, ECA1, ECA2 em aorta e mesentérica (Gálvez-Prieto *et al.*, 2008). No que tange, a expressão de (P)RR esta foi cinco vezes maior no PVAT aórtico em comparação com o PVAT mesentérico e da quimase e dos receptores AT1R e AT2R foram significativamente menores. Ainda, os níveis de ANG-I no PVAT foram semelhantes entre leitos vasculares, porém, os níveis de ANG-II foram maiores no PVAT da artéria mesentérica PVAT em comparação ao PVAT aórtico (Oliver & Sciacca, 1984).

Estudos realizados em PVAT de artérias, aorta e mesentéricas de ratos *Wistar Kyoto* mostraram a presença de AGT, ECA, ECA2, ANG-I E ANG-II (Gález-Pietro *et al.*, 2006). Além disso, também foram descritos a presença de (P)RR, quimase, AT1R e AT2R no PVAT (Gálvez-Pietro *et al.*, 2006). No entanto, a renina não foi detectável, tanto nos níveis de RNAm quanto nos níveis proteicos, e o receptor AT1Rb foi dificilmente detectável (Gálvez-Pietro *et al.*, 2006) no PVAT. Entretanto, a literatura carece de estudos de caracterização de todos os mediadores do SRAA presente no PVAT nos diferentes leitos vasculares.

Ainda, não está clara qual o significado funcional dessas diferenças, mas podem estar relacionadas como as respostas diferenciais entre os fatores derivados de adipócitos provenientes do tecido adiposo marrom versus o tecido adiposo branco. O tecido adiposo periaórtico tem sido identificado como tecido adiposo marrom expressando desacoplamento da proteína-1 (UCP-1), enquanto o tecido adiposo da artéria mesentérica é considerado tecido adiposo branco (Gálvez-Pietro *et al.*, 2006). Dentro do PVAT, a atividade do ECA-2 promove a produção de ANG-(1-7) a partir ANG-II, tanto nas artérias quanto nas veias (Lee *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2011). A ANG-(1-7) produzida pelo PVAT induz a produção de NO endotelial (Gao *et al.*, 2006; Nóbrega *et al.*, 2017).

Os componentes derivados do SRAA fornecem uma interrelação importante entre as células adipócitas do PVAT e as células vasculares, exercendo efeitos autócrinos/parácrinos tanto nos adipócitos PVAT quanto nos tecidos vasculares adjacentes. Os efeitos da ANG-(1-7) derivados de PVAT são alterados em vasos de SHR contribuindo para a disfunção endotelial e vasodilatação prejudicada na HA e em tecido adiposo visceral de camundongos e humanos e o PVAT produz aldosterona de maneira dependente de ANG-II induzindo processos inflamatórios que afetam as respostas vasculares (Nguyen Dinh Cat *et al.*, 2011).

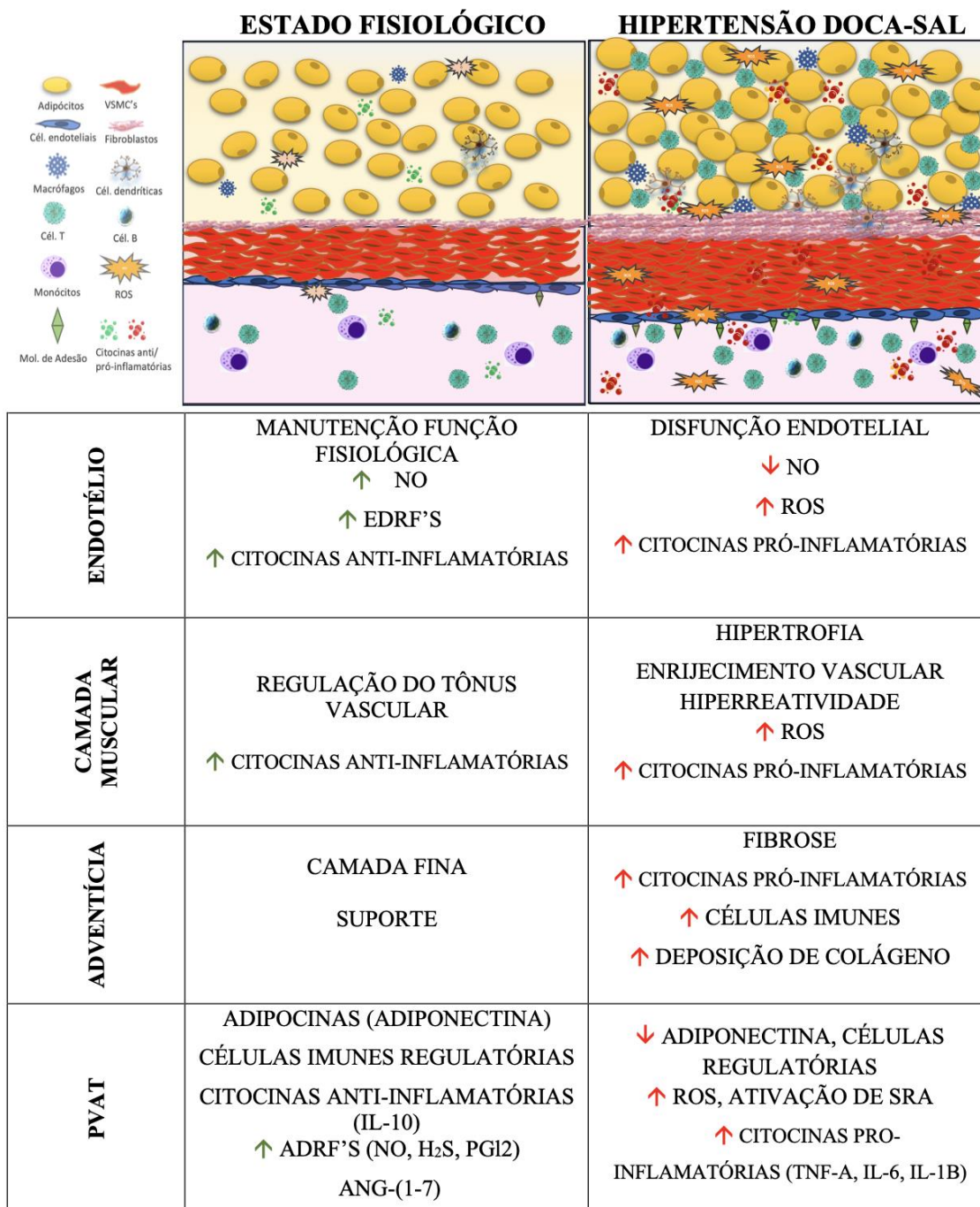


Figura 5: Função e mediadores envolvidos nas diferentes camadas vasculares no estado fisiológico e no desenvolvimento da Hipertensão DOCA-sal. (Fonte: Própria. Baseado em Nosalski e Guzik, 2017).

2.4.1 Estresse oxidativo e inflamação na HA

O equilíbrio entre a formação e eliminação de ROS é fundamental para a manutenção da homeostase vascular. Em condições fisiológicas, sua produção é

controlada por componentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Krzeminska *et al.*, 2022).

As ROS têm papéis fisiológicos importantes na sinalização e crescimento celular, no entanto, quando há um desequilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos de defesa antioxidantes resulta ao chamado estresse oxidativo (EO) (Touyz *et al.*, 2020; Gallo *et al.*, 2021).

O envolvimento do estresse oxidativo no contexto da HA relaciona-se ao papel fundamental das ROS e da sinalização redox em processos moleculares, celulares e sistêmicos que causam danos no endotélio, disfunção vascular, remodelamento cardiovascular, disfunção renal, excitação do SNS, ativação de células imunes e inflamação sistêmica e local (Dubois-Deruy *et al.*, 2020; Touyz *et al.*, 2020; Griendling *et al.*, 2021; Gallo *et al.*, 2021).

A sinalização redox é a modificação pós-translacional específica de oxidação-redução de moléculas de sinalização a jusante induzida por radicais livres, como $O_2^{\cdot-}$ e NO, e radicais não livres, como H_2O_2 , que acima de níveis normais resulta em desenvolvimento e/ou agravamento da HA (Griendling *et al.*, 2021; Krzeminska *et al.*, 2022).

A ativação do complexo enzimático da NADPH oxidase, uma família de proteínas transmembrana que transferem elétrons através das membranas é uma das principais fontes de ROS para os vasos. Sua ativação resulta em aumento da produção de ROS, especialmente, de $O_2^{\cdot-}$, promovendo injúrias oxidativas direta nos leitos vasculares e redução da síntese e/ou biodisponibilidade de NO (Touyz *et al.*, 2020; Vermot *et al.*, 2021). Ainda, as ROS vasculares podem ser oriundas da xantina oxidase, das mitocondriais e da eNOS desacoplada (Griendling *et al.*, 2021).

Além da oxidação, seja como causa ou consequência, o processo inflamatório faz parte da fisiopatologia da HA (Krzeminska *et al.*, 2022). Os principais mediadores da resposta inflamatória induzida são, TNF- α , NF- κ B, interleucinas e interferon- γ (INF- γ), etc. Esses mediadores podem interagir com várias células para amplificar a resposta inflamatória (Krzeminska *et al.*, 2022).

Os mecanismos oxidativos e inflamatórios na HA se relacionam diretamente. A geração de ROS dentro das células imunes e ativa respostas celulares mediadas por complexos enzimáticos como, por exemplo, o da NADPH oxidase (Guzik *et al.*, 2020; Vermot *et al.*, 2021).

Outro mecanismo envolve a peroxidação lipídica em células apresentadoras de antígenos em modelos animais de HA, gerando metabólitos que ativam células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias e ROS afetando órgãos alvo como os rins, vasos e o SNC contribuindo para a HA (Zewinger *et al.*, 2020; Griendling *et al.*, 2021). Além disso, quando há uma alta ingestão de sódio, maiores serão os níveis de inflamatórias nos rins, aumentando assim a disfunção renal que afeta diretamente o controle da PA (Zhao *et al.*, 2018; Valinsky *et al.*, 2018).

Pesquisas e evidências clínicas também sugerem o envolvimento de outros componentes do sistema imunológico desempenhando papéis críticos na fisiopatologia da HÁ, como níveis aumentados de infiltrados de macrófagos, que medeiam o dano nas EC's, remodelamento vascular, produção de ROS, bem como ativação de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β (Rudemiller & Crowley, 2016; Xião *et al.*, 2020, Panthiya *et al.*, 2023).

Krishnan e colaboradores (2016) avaliando o tecido renal de camundongos DOCA-sal verificaram aumento da área de superfície corporal (ASC), dos níveis de mRNA de inflamassoma NLRP3, pró-caspase 1 e de pró-interleucina 1 β . Ainda, os mesmos autores demonstraram que o uso do MCC0950, um inibidor da inflamassoma NLRP3, reduz a PA em animais DOCA-sal (Krishnan *et al.*, 2019). Somados, o aumento de células do sistema imune estimulou o aumento de PA ocasionando disfunção endotelial em artérias mesentéricas e aumentou a produção de ROS (Thang *et al.*, 2015).

Além do envolvimento do estresse oxidativo e da inflamação, a participação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) compõem a patogênese do desenvolvimento da HA e recentemente um sistema SRA local também passou a ser estudado. A seguir será discutido ambos os sistemas bem como a relação entre eles.

2.4.2 Sistema renina-angiotensina (SRA) sistêmico e local na HA

O SRA é o sistema endócrino que regula a PA. O SRA clássico ou sistêmico possui papel de destaque no controle hemodinâmico e equilíbrio hidroeletrólítico (Pahlavani *et al.*, 2020). O SRAA sistêmico, estudado há quase um século consiste em uma cascata proteolítica de peptídeos que agem sequencialmente para gerar ANG-II (Cantero-Navarro *et al.*, 2021). No entanto, nas últimas décadas, é descrito que tanto a ANG-II como os mediadores deste sistema podem ser produzidos localmente em órgãos como, rins, coração, cérebro, tecido adiposo e vasos sanguíneos (Pahlavani *et al.*, 2020).

De forma sistêmica, o angiotensinogênio (AGT), uma α -2-globulina inativa é sintetizada principalmente no fígado. O AGT produzido é liberado no sangue e clivado em ANG-I (pela clivagem amino-terminal da ligação entre o 10º e 11º resíduos de aminoácidos – leucina e valina) por ação da renina, sintetizada principalmente nas células justaglomerulares do rim, embora também possa ser sintetizada em outros tecidos. A secreção de renina é controlada por diferentes fatores, tais como: diminuição da pressão de perfusão renal, redução da carga renal de sódio, aumento do tônus simpático (estimulação β 1-adrenérgica) e aumento dos fatores locais como, PGs, dopamina, adenosina e NO (Pacurari *et al.*, 2014).

Historicamente a função da renina era considerada apenas como fator limitante de velocidade de ativação do SRAA, sem possuir atividade biológica própria, no entanto, evidências nos últimos anos descrevem seu papel funcional (Nguyen e Muller, 2010; Pacurari *et al.*, 2014).

Após, a clivagem a ANG-I é hidrolisada pela enzima conversora de ANG-I (ECA) liberada pelos capilares pulmonares, ECs e células epiteliais renais, a partir da retirada de dois aminoácidos (histidina e leucina) para formação da ANG-II. A ANG-II formada participa ativamente no controle da PA e na homeostase vascular. E por fim, este peptídeo gerado pode se ligar aos seus dois tipos de receptores principais, AT1R e AT2R, ativando todas as funções clássicas do sistema SRAA, tais como: contração do músculo liso; estimulação da secreção de aldosterona pelas glândulas adrenais, aumentando a reabsorção de sódio e a excreção de K^+ ; e estimulação da secreção do hormônio ADH (também chamada de vasopressina, ou hormônio antidiurético) que por sua vez estimula a reabsorção de água, resultando em níveis pressóricos elevados (Patel *et al.*, 2017).

Embora, a ANG-II seja há muitas décadas estudado como o principal peptídeo efetor do sistema SRAA, nos últimos anos foram descobertos uma série de outros peptídeos, formados por cadeias de aminoácidos mais curtas com importantes funções biológicas (Colafella *et al.*, 2019). Entre eles, a ANG-III, a ANG-IV, a ANG-(1-7), a ANG-(1-9), a ANG-A e Alamandina (Arendse *et al.*, 2019) (Figura 5).

A ANG-II por ação da glutamil aminopeptidase A (APA) é transforma-se em ANG-III, e possui afinidade por AT1R e AT2R, mas com meia-vida muito curta. Por sua vez, a ANG-III é transformada em ANG-IV por ação da alanil aminopeptidase N (APN). A ANG-IV também se comporta como um agonista de AT1R e de AT2R, mas tem uma afinidade específica para o AT4R (Pacurari *et al.*, 2014). Este receptor, está localizado no cérebro, participando de processos de memória, aprendizado e desenvolvimento neural e

ao rim e coração, onde participa de mecanismos que regulam a frequência cardíaca, o fluxo sanguíneo e excreção de sódio (Pacurari *et al.*, 2014). A ANG-(1-7) resulta a partir da ANG-I ou da ANG-II pela ação da ECA1 e ECA2 e peptidases (prolil-endopeptidase e prolil-carboxipeptidases). Foi descrito que o proto-oncogene *Mas* é um receptor para este peptídeo e que o eixo ECA-2-ANG-(1-7) -*Mas* pode compensar os efeitos cardiovasculares e renais do SRAA sistêmico.

A ANG-(1-7) exerce seu efeito pela estimulação do receptor *Mas* (Verano-Braga *et al.*, 2012). Essa ativação na célula endotelial induz as fosfatidilinositol 3-quinases ou via Akt, levando à ativação no endotélio da NOS e posterior liberação de NO, podendo induzir vasorelaxamento. Além, da liberação de NO, a estimulação do *Mas* regula os efeitos da ANG-II por inibir as vias intracelulares, como quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 e c-Src que são induzidas por estimulação AT1R (Verano-Braga *et al.*, 2012). Os efeitos de ANG-(1-7) são, portanto, ambíguos: induz vasodilatação mediada pelo NO, por um lado e inibe os efeitos vasoconstritores da ANG-II por outro lado. Desta forma, ANG-(1-7) é capaz de contrabalançar os efeitos da ANG-II, resultando em um equilíbrio dinâmico entre os níveis de ANG-(1-7) e ANG-II. Assim, deslocando esse equilíbrio para ANG-(1-7) resulta em vasodilatação, enquanto um equilíbrio voltado para ANG-II induz vasoconstrição.

Já, a ANG-(1-9) é formada a partir de ANG-I e ANG-(1-7) pela ação catalítica de um homólogo da ECA, a ECA-2. A ECA-2 é expressa no coração, pulmão, rim, cérebro e vasos sanguíneos e neutraliza os efeitos da ECA (Ocaranza *et al.*, 2010, 2014; Flores-Muñoz *et al.*, 2012). Por sua vez, ANG-(1-9) exerce seus efeitos por ligação direta sobre o AT2R e pode ser convertida em ANG-(1-7) pela ação da ECA (Fattah *et al.*, 2016). Ainda, a cascata ANG-A/alamandina-MrgD associa os ramos deletério e protetor do SRAA. A ANG-A está posicionada na intersecção desse sistema, uma vez que induz ações vasoconstritoras e pró-proliferativas diretas ou é posteriormente metabolizada em alamandina, desencadeando efeitos opostos. A alamandina, molécula central dessa cascata, pode ser gerada de duas formas, a partir da ANG-A ou vir da clivagem da ANG-(1-7), e a depender da quantidade gerada ou da origem da geração pode ter efeito regulador da PA e reduzir a remodelamento vascular ou ser indutora destes (Figura 5) (Hrenak *et al.*, 2016).

Vários estudos realizados tanto em humanos quanto em animais de experimentação revelaram a presença do SRAA localizado no tecido adiposo (Engeli *et al.*, 2003; Gorzelniak *et al.*, 2002; Achard *et al.*, 2007). Além disso, durante a aplicação

do bloqueador do SRAA, ocorre uma regulação positiva de múltiplos metabólitos da ANG, que podem exercer ações próprias e possivelmente até contribuir para os efeitos benéficos do bloqueio do SRAA. Destacando as vias protetoras (vasodilatadoras) do AT2R e a via do receptor ECA2-ANG-(1-7). ANG-(1-7) é produzida diretamente da ANG-I e posteriormente degradada em ANG (1-5) ou ANG-(1-4), que são provavelmente biologicamente ineficazes, pelo menos até agora (Lautner *et al.*, 2019).

2.5 Tratamento da HA

O tratamento da HA envolve o uso de estratégias farmacológicas e não-farmacológicas. No tratamento farmacológico são utilizados β e α bloqueadores, os DRI's (do inglês, “*direct renin inhibitors* – DRI's), os inibidores da ECA - iECA (do inglês, “*angiotensin converting enzyme inhibitor*” – iACE), antagonistas de receptores tipo 1 (AT1), diuréticos, bloqueadores dos canais de cálcio, antagonistas de receptores de mineralocorticóides (MR), dentre outros (Brasil, 2020).

No entanto, a aderência ao tratamento, os potenciais efeitos colaterais e a complexidade do controle da pressão arterial em casos de HS com níveis elevados de pressão sanguínea adicionam a necessidade de um conhecimento mais profundo sobre os mecanismos dessa doença. Isso, por sua vez, impulsiona o avanço na terapêutica farmacológica para torná-la mais precisa, bem como o desenvolvimento de terapias adjuvantes não farmacológicas derivadas de alimentos para auxiliar no controle da PA.

O tratamento não-farmacológico da HA envolve controle ponderal, medidas nutricionais, prática de atividades físicas, cessação do tabagismo e consumo de álcool e controle de estresse. Cuidados na alimentação envolvem o aumento do consumo de fibras, como frutas, legumes e verduras, introdução de alimentos ricos em potássio e de leguminosas, diminuição do consumo de gorduras, principalmente as saturadas, diminuição da ingestão de alimentos ultraprocessados e da ingestão de sódio (Krause e Mahan, 2018). Além disso, as recomendações oficiais para o controle da PA, como a dieta DASH (do inglês, “*Dietary Approach to Stop Hypertension*” - DASH), dieta mediterrânea e o último caderno do Ministério da Saúde do Brasil para uma alimentação cardioprotetora, recomendam o consumo regular de muitos alimentos que são considerados alimentos funcionais (Brasil, 2018).

Devido à grande complexidade da HA cada vez mais, têm se incentivado o uso combinado de estratégias farmacológicas e não-farmacológicas para a manutenção e controle da PA em níveis desejáveis.

2.6 Uso de peptídeos bioativos derivados de proteínas alimentares na HA

Os peptídeos bioativos foram relatados pela primeira vez na década de 50 por Mellander. Eles podem ser obtidos de proteínas de fontes alimentares animal ou vegetal (Jahandideh *et al.*, 2022). São definidos como fragmentos de proteínas específicas que os serem liberados apresentam propriedades benéficas para as atividades vitais dos organismos vivos ou têm efeitos fisiológicos além dos nutricionais (Bhat *et al.*, 2015).

O uso crescente desses peptídeos com propriedades bioativas têm sido cada vez maior, uma vez que a sua identificação, caracterização e descrição de suas propriedades funcionais podem ser utilizadas de maneira isolada, seja ela na forma hidrolisada ou individual ou ainda agregada a outros produtos alimentícios (Jia *et al.*, 2021; López-Martínez *et al.*, 2022; Patil *et al.*, 2022).

Os peptídeos gerados, geralmente apresentam sequências peptídicas compostas de 2 a 20 resíduos de aminoácidos, que só exibem atividade biológica após liberação bem-sucedida por hidrólise enzimática, processamento de alimentos, fermentação ou digestão gastrointestinal (Sun *et al.*, 2020). Os diferentes tipos de hidrolisados e/ou sequências peptídicas podem apresentar inúmeras propriedades, tais como: atividade antioxidante, anti-hipertensiva, antimicrobiana, imunorreguladora, hipolipidêmica, antitrombótica e antiobesogênica que variam conforme a sua composição, fonte proteica, tempo de processamento (Bhat *et al.*, 2015; Albenzio *et al.*, 2017, Jia *et al.*, 2021).

Dentre as propriedades buscadas nos estudos dos peptídeos bioativos a atividade anti-hipertensiva se destaca devido à sua grande importância na saúde pública. A maioria das sequências peptídicas identificadas com efeito anti-hipertensivo demonstrado em estudos *in vivo* estão relacionadas a capacidade de inibir a ECA (iECA), bem como seus efeitos antioxidante e/ou anti-inflamatório. Uma vez que as causas do desenvolvimento da HA são multifatoriais e os pontos chave para o tratamento desta doença são complexos, como a redução dos insultos oxidativos e inflamatórios, bem como a modulação do SRAA o uso de peptídeos bioativos com efeitos diversos pode ser uma alternativa interessante uma vez que compostos multialvos podem apresentar maior eficácia no tratamento da HA.

Os peptídeos com ação iECA já foram isolados de fontes variadas como, leite, ovos, carne, milho e até algas marinhas (Sánchez e Vázquez, 2017). Nas sequências identificadas, a maior parte, continham aminoácidos hidrofóbicos (tirosina, fenilalanina,

triptofano, alanina, isoleucina, valina e metionina) ou aminoácidos de carga positiva (arginina e lisina), bem como o prolina na posição C-terminal. Essas características foram relacionadas com o efeito iECA por possuírem melhor afinidade com o sítio ativo da enzima em vários dos peptídeos extraídos (He *et al.*, 2013, Rai *et al.*, 2015, Miguel *et al.*, 2020). Importante ressaltar que a ECA é uma enzima chave na regulação da PA e sua inibição promove menor ativação do SRAA sistêmico e degeneração da bradicinina, um potente vasodilatador (Smolinska *et al.*, 2023).

Em estudos utilizando modelos de HA em animais o uso de peptídeos (VPP e IPP) obtidos de proteínas do leite reduziu a PA e preveniu a HA (Moller *et al.*, 2008; TuomileHAo *et al.*, 2004). A utilização de um peptídeo de sequência Thr-Gln-Val-Tyr obtido de proteínas do arroz em um modelo de HA experimental reduziu os níveis pressóricos (Li *et al.*, 2007). Outros peptídeos obtidos de macroalgas também apresentaram efeitos funcionais (Kamthania e Kumar, 2014). Peptídeos iECA também foram obtidos usando enzimas microbianas (Yu *et al.*, 2012). Um estudo dose-dependente validou que o dipeptídeo Ile-Tyr foi capaz de reduzir significativamente PA em um modelo experimental de animais SHR (Tanaka *et al.*, 2006). A sequência Ile-Gln-Pro, mostrou efeito anti-hipertensivo por modulação do SRAA sistêmico em animais SHR (Lu *et al.*, 2011).

Embora, identificados nos anos 50 e desde então inúmeras pesquisas tenham sido desenvolvidas, foi somente no final da década de 90 que os peptídeos bioativos derivados da clara do ovo foram descritos. Fujita e colaboradores (1995) isolaram e caracterizaram o peptídeo de sequência Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu (FRADHPFL) a partir da ovalbumina. Na qual denominaram como “ovocinina” por apresentar semelhança estrutural com o peptídeo endógeno, bradicinina.

A ovocinina demonstrou efeito direto sobre o sistema cardiovascular por ser um agonista dos receptores de bradicinina, promovendo assim efeito vasodilatador. No final da década de 90, Matoba e colaboradores (1999) isolaram e identificaram um peptídeo análogo a ovocinina, com alto efeito anti-hipertensivo, a ovocinina (2-7) com sequência Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe, obtido da ovalbumina. Utilizando animais SHR a administração desse peptídeo promoveu efeitos hipotensivos na dose de 10 mg/kg após a administração oral. Posteriormente, foram realizadas modificações nas posições dos aminoácidos (Pro², Phe³)-ovocinina(2-7), o novo peptídeo obtido foi denominado como “Novocinina” com sequência Arg-Pro-Leu-Lys-Pro-Trp que evocou efeitos anti-hipertensivos na dose de 0,3 mg/kg, correspondendo a uma dose mais de 30 vezes menor

em comparação a novocinina(2-7) após a administração oral (Matoba *et al.*, 2001). Em animais SHR a administração da novocinina apresentou efeitos vasodilatadores dos quais em parte foram mediados por receptores AT2R (Yamada *et al.*, 2008).

Outros estudos também demonstraram que a clara do ovo é uma importante fonte de peptídeos bioativos. Usando a enzima alcalase, *in vitro* Liu e colaboradores (2010) obtiveram um hidrolisado de clara de ovo com 58% de efeito inibitório de ECA, com o isolamento da sequência RVPSL, derivado de ovotransferrina. Outra sequência, a RVPSLM, também obtida da clara demonstrou efeito inibitório da enzima α -glucosidase e assim, além de efeito anti-hipertensivo os peptídeos obtidos da clara também apresentam outras atividades, como por exemplo antibiabética (Yu *et al.*, 2011).

Miguel e colaboradores (2004) obtiveram um hidrolisado de clara de ovo com pepsina por 3 horas com atividade de iECA e atividade antioxidante *in vitro*. Deste hidrolisado, vários peptídeos que apresentavam atividade de iECA foram isolados e identificados (Miguel *et al.*, 2004) e/ou uma potente atividade antioxidante reconhecidas (Dávalos *et al.*, 2004). Dentre, as sequências identificadas foram descritas os peptídeos anti-hipertensivos como YAEERYPIL e RADHPFL, em estudos posteriores exerceram atividade vasodilatadora *ex vivo* (Miguel *et al.*, 2007). A eficácia anti-hipertensiva do hidrolisado de clara de ovo obtido por 3 horas com pepsina foi demonstrada em ratos SHR em administração oral aguda e crônica neste modelo (Miguel *et al.*, 2005; Miguel *et al.*, 2006; Miguel *et al.*, 2007). E ainda, esse hidrolisado demonstrou efeito sobre parâmetros de estresse oxidativo e redução dos níveis plasmáticos de colesterol total e triglicérides na aorta e no plasma de animais SHR (Manso *et al.*, 2008).

Mesmo que nos estudos voltados para o tratamento da HA utilizando peptídeos bioativos, a capacidade iECA seja um grande alvo, as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias também demonstraram destaque nos estudos desses hidrolisados e seus peptídeos (Majumber e Wu, 2014; Santos-Parker *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo desencadeado na HA cursa com a produção de radicais livres e redução da ação de enzimas protetoras, como SOD, catalase e GPx, levando a efeitos celulares como a apoptose, oxidação de proteínas celulares, lipídios de membrana, DNA e enzimas, comprometendo a função tecidual do sistema cardiovascular (Nita e Grzybowski, 2016; Touyz, 2020; Lisowski *et al.*, 2018).

Os hidrolisados de proteínas ou as frações peptídicas derivadas demonstraram ter ação antioxidantes significativas, tanto por inibição da peroxidação lipídica ou pela alta capacidade de eliminação de radicais livres, como também pela atividade quelante de

metais de transição, envolvidos no processo de oxidação das macromoléculas (Girgih *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013, Mora e Toldrá *et al.*, 2023). Em estudos com exposição de metais verifica-se que a administração de um hidrolisado obtidos de proteínas alimentares do ovo possui forte ação de inibição do complexo enzimático NADP(H) oxidase, importante fonte de ROS para os vasos sanguíneos (Rizzetti *et al.*, 2017; Martinez *et al.*, 2019; Escobar *et al.*, 2020; Moraes *et al.*, 2022; Piagette *et al.*, 2023).

O efeito anti-inflamatório, apresentado por muitos dos peptídeos bioativos presentes em hidrolisados de proteínas de origem animal e vegetal estão relacionados à capacidade de inibição do estresse oxidativo, que uma vez presente dispara cascatas inflamatórias. Por exemplo, as sequências QEPVL e QEPV, derivadas da caseína foram capazes de reduzir o aumento de IL-4, IL-10, gama-interferon, TNF-alpha e modular a liberação de NO (Jiehui *et al.*, 2014). Outros peptídeos (IPP e VPP) contidos também em hidrolisados obtidos a partir do leite demonstraram ação sobre a via do NF- κ B (Chakrabarti e Wu, 2015).

Além disso, hidrolisados de proteínas de grão de milho e seus peptídeos derivados, utilizando modelos de células Caco-2 reduziram significativamente a expressão de TNF-alpha (Liang *et al.*, 2018). Hidrolisados ou sequências peptídicas derivadas de proteínas da clara de ovo demonstram ter grande ação anti-inflamatória, como o peptídeo IRW que inibiu a disfunção da integridade da barreira induzida por LPS e a inflamação em células Caco-2 (Bao e Wu *et al.*, 2022), o hidrolisado obtido com alcalase a partir da hidrólise da ovomucina que inibiu a ativação da via do do NF- κ B mediada pelo TNF-alpha em fibroblastos de humanos (Sun *et al.*, 2016). Ainda, o hidrolisado obtido, especialmente da ovotransferrina utilizando a pepsina apresenta forte poder de inibição da via das ciclooxigenases (Rizzetti *et al.*, 2017; Martinez *et al.*, 2019; Escobar *et al.*, 2020; Moraes *et al.*, 2022; Piagette *et al.*, 2023).

2.7 Peptídeos bioativos de hidrolisado de clara de ovo (HCO)

A clara do ovo representa cerca de 58% do peso total do ovo e é composta por (88-90%) de água e de (10-12%) de proteínas de alto valor biológico. Dentre as proteínas, majoritariamente estão a ovalbumina, ovotransferrina e ovomucóide. Outras proteínas, como ovomucina, lisozima, globulina e vestígios de ovinibidor, ovoglicoproteína, ovomacroglobulina, cistatina também podem ser encontradas (Mine, 2007). No entanto, os afeitos anti-hipertensivos mais descritos na literatura estão relacionados

principalmente a hidrólise de proteínas como a ovoalbumina, ovotransferrina e lisozima por diferentes processos, tais como síntese química, fermentação, mas, especialmente, utilizando enzimas como tripsina, neutrase, alcalase, pepsina e aminopeptidase (Miguel e Aleixandre 2006; Garcés-Rimón *et al.*, 2016; Jovanović *et al.*, 2016).

A partir dos estudos de Fujita e colaboradores (1995) e Matoba e colaboradores (1999) a clara do ovo passou a ter destaque na pesquisa para obtenção de peptídeos bioativos, e que foram atribuídas propriedades anti-hipertensivas (Grotaert *et al.*, 2017; de Campos Zani *et al.*, 2018; Miguel *et al.*, 2020).

O hidrolisado de clara de ovo utilizado neste estudo foi obtido por Garcés-Rimón *et al.* (2016) com base em estudos anteriores de Miguel *et al.* (2004; 2005; 2006; 2007, a,b,c) (Tabela 3, Figura 6) que identificaram vários peptídeos bioativos e propriedades funcionais deste HCO derivado da hidrólise enzimática com pepsina durante 3 horas (Tabela 3). No estudo desenvolvido por Garcés-Rimón *et al.* (2016) foram avaliados diferentes tempos de hidrólises, de 0 a 48 horas), bem como empregadas vários tipos de enzimas (Alcalase, Peptidase, Flavourzyme, Pancreatina, Promod, Pepsina e Neutrase, e a maior atividade antioxidante foi encontrada no HCO obtido por 8 horas de hidrólise com pepsina que apresentou grande poder iECA. bem como importante capacidade de eliminação de radicais livres e atividade inibitória de ligação de ácidos biliares.

O HCO do presente estudo foi preparado por meio de hidrólise enzimática de claras de ovos crus, as claras de ovos pasteurizadas são hidrolisadas com pepsina BC 1:3000 (E:S: 2:100 w:w, pH 2,0, 38 °C, Cardiff, Reino Unido), durante 8 h. A inativação da enzima foi conseguida aumentando o pH para 7,0 com NaOH 5N. Após, o hidrolisado foi centrifugado a 5.000 x g durante 15 min e o sobrenadante foi congelado e liofilizado (Figura 6).

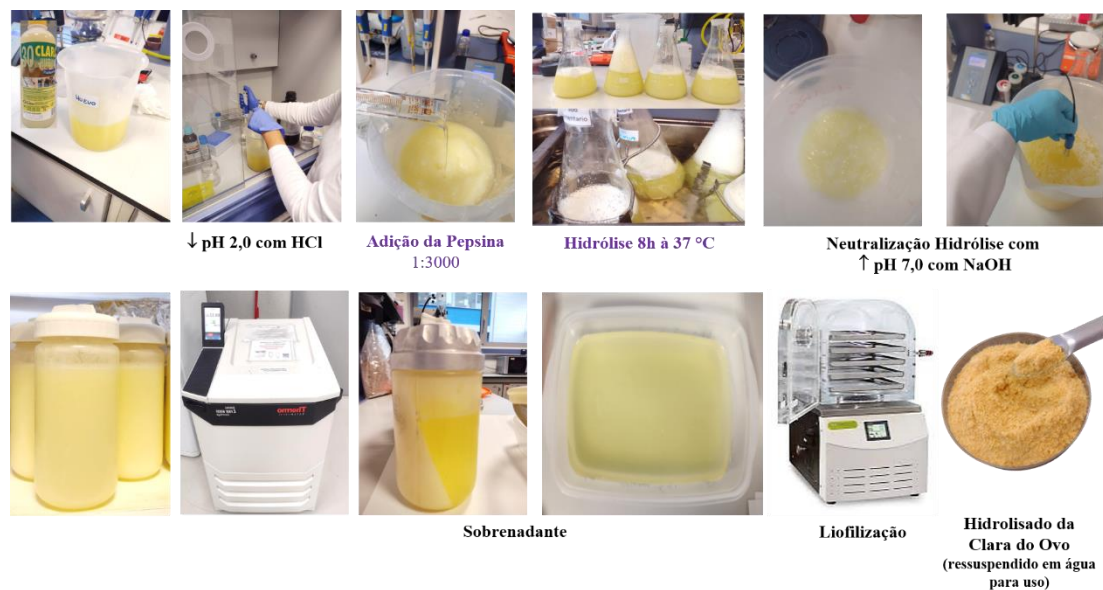


Figura 6: Etapas de produção do hidrolisado de clara de ovo utilizando a hidrólise com pepsina por 8 horas. (Fonte: fotos próprias)

Desde meados dos anos 2000 até a síntese e padronização do hidrolisado utilizado neste estudo, inúmeros trabalhos foram realizados (Tabela 3) Miguel *et al.* (2004) identificaram 14 sequências peptídicas obtidas pela hidrólise enzimática com pepsina durante 3 horas com base na proteína ovalbumina, das quais, três (RADHPFL, YAEERYPIL e IVF) apresentaram capacidade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ECA) e duas delas demonstraram ser potentes iECA, sendo elas: RADHPFL e YAEERYPIL, com IC₅₀ de 6,2 e 4,7 μ m, respectivamente.

Posteriormente, Dávalos *et al.* (2004) verificam que a sequência peptídica YAEERYPIL além de ser um potente inibidor da ECA (iECA) também apresentava alta capacidade antioxidante com um poder redutor de ROS e da peroxidação lipídica *in vitro*. No ano seguinte, utilizando modelo de HA genética (ratos SHR) e tratando por um curto período de tempo (2, 4, 6, 8 e 24 h pós administração das sequências) foi demonstrado que as sequências identificadas (YAEERYPIL, RADHPFL e IVF) tinham capacidade de redução da PA *in vivo* elas diminuíram a PA sistólica e PA diastólica, de forma dose-dependente. O mínimo as doses efetivas foram de cerca de 2 mg/kg YAEERYPIL e RADHPFL e 4 mg/kg de FIV. A redução máxima da PAS e da PAD foi observado 6 h após a sua administração e o efeito durou, pelo menos, 8h (Miguel *et al.*, 2005). Após, o HCO de 3h passou a ser utilizado na sua forma completa. Em 2006, Miguel e colaboradores verificaram que a administração a longo prazo promovia retardo no desenvolvimento da HA em animais SHR (Miguel *et al.*, 2006).

Embora, a capacidade iECA seja uma característica marcante tanto das sequências peptídicas quanto dos hidrolisados desenvolvidos por Miguel et al. (2007), demonstrou, que esse não é o único mecanismo mediador do efeito vasodilatador. O uso dos peptídeos identificados (YRGGCEPINF, RDILNQ e ESIINF) promoveram vasodilatação em aorta, no entanto, não apresentaram efeito sobre a ECA, demonstrando outras vias implicadas no efeito vasodilatador deste HCO.

Também foi demonstrado que a administração tanto a curto quanto a longo prazo do HCO de 3h promovia redução na elevação da PA em ratos SHR (Miguel *et al.*, 2007) e mesmo após a digestão simulada as sequências peptídicas isoladas mantinham o efeito vasodilatador e foi possível identificar que esse efeito foi mediado pela melhora dos níveis de NO e ação sobre receptores (B1) de bradicinina (Miguel *et al.*, 2007). E ainda esse hidrolisado demonstrou efeito sobre parâmetros de EO tecidual e redução plasmática de colesterol total e triglicerídeos em animais hipertensos (Manso *et al.*, 2008).

Em 2010, García-Redondo e colaboradores avaliando artérias mesentéricas verificaram que o efeito vasodilatador apresentado pelas sequências peptídicas contidas no HCO de 3h, além de ser mediado por NO, havia ação sobre a via da COX e eram parte dependente e/ou parcialmente dependente do endotélio (García-Redondo *et al.*, 2010). Ademais, a presença do aminoácido Arg ou Tyr e a posição N-terminal nas sequências peptídicas foi atribuído como fundamentais para o efeito vasodilatador (García-Redondo *et al.*, 2010).

Com base nesses achados, Garcés-Rimón et al. (2016) foi desenvolvido um HCO seguindo com a utilização de pepsina, porém, com o tempo de hidrólise maior, de 8h. É importante ressaltar que embora a base de proteína e a enzima utilizadas sejam as mesmas, o tempo de exposição a ela, faz com que outros peptídeos e diferentes propriedades sejam apresentadas. Nos experimentos *in vitro*, foram verificados que esse novo HCO, além ser um iECA e antioxidante, apresentava também ação sobre mediadores inflamatórios, como o TNF- α e sobre o aumento de ácidos biliares. Nesse sentido, o campo de aplicabilidade desse produto passou a ser muito maior.

Assim, utilizando o HCO de 8h foi demonstrado que a suplementação dietética reduzia os níveis de ROS, TNF- α , ácidos biliares e esteatose hepática induzida pela obesidade genética (animais Zucker) (Garcés-Rimón *et al.*, 2016). Ainda, avaliando a síndrome metabólica decorrente dessa obesidade observou-se efeito sobre o metabolismo glicêmico (Garcés-Rimón *et al.*, 2018). E em modelo de síndrome metabólica induzida pela dieta (gordura/dextrose) o efeito antiobesogênio foi encontrado e relacionado com

ao aumento de genes da dinâmica mitocondrial e do tecido adiposo marrom, com aumento da termogênese e redução dos danos no tecido adiposo branco disfuncional (Moreno-Fernandes *et al.*, 2018). Este mesmo HCO 8h revelou uma ação benéfica sobre o perfil microbiano intestinal em animais obesos Zucker (Requena *et al.*, 2017).

Em relação a ação sobre os vasos, este HCO revelou melhora na disfunção endotelial nas artérias de resistência e condutância e reduziu o estresse oxidativo vascular em animais expostos a metais, obesos e com síndrome metabólica (Rizzetti *et al.*, 2017; Martinez *et al.*, 2019; Garcés-Rimón *et al.*, 2019; Escobar *et al.*, 2020; Moraes *et al.*, 2022; Piagette *et al.*, 2023).

De forma aprofundada em modelos de exposição à diferentes metais como a baixas doses de mercúrio, a baixas e altas doses de alumínio e a doses equivalentes a desastres ambientais de cádmio, e nos diferentes sistemas afetados pela exposição aos metais, tais como, vascular (aorta e mesentérica), nervoso (memória, cognição e nocicepção), reprodutor e gastrointestinal (Rizzetti *et al.*, 2016,a,b;2017; Martinez *et al.*, 2019,a,b,c; 2022; Pinheiro Junior *et al.*, 2020; Escobar *et al.*, 2020; Moraes *et al.*, 2022; Piagette *et al.*, 2023).

Rizzetti *et al.* (2016a) demonstram que o HCO possuía efeito no sistema nervoso. O co-tratamento com o hidrolisado preveniu o comprometimento da memória induzido pela exposição ao Hg, reduzindo o conteúdo de Hg e a produção de ROS no hipocampo. Além disso, o HCO apresentou efeito remediativo diante de distúrbios neuropáticos ocasionados pela exposição ao mercúrio associado a redução dos níveis de MDA no cérebro e no número do complexo célula-neurite de Merkel na pele (Rizzetti *et al.*, (2016b). Martinez e colaboradores também comprovaram essa ação benéfica do HCO sobre o sistema cerebral diante dos danos neurotóxicos induzidos pelo alumínio, após 60 ou 42 dias de exposição, os animais tratados com o HCO não apresentaram prejuízo na memória ou disfunção cognitiva. Além disso o HCO evitou a catalepsia, EO no hipocampo, disfunção colinérgica e aumento do número de micróglia ativas e células positivas para COX-2 induzidas pela exposição ao metal (Martinez *et al.*, 2019).

Este mesmo HCO preveniu as alterações ocasionadas pela exposição ao mercúrio, alumínio e cádmio no sistema reprodutor de ratos machos, através da: 1) redução no dano de membrana dos espermatozoides e melhorando a motilidade espermática; 2) prevenção da diminuição da produção diária espermática absoluta e relativa, e do aumento do tempo de trânsito espermático em epidídimo e das anormalidades morfológicas induzidas pelos

metais e tais melhoras foram relacionadas com o capacidade antioxidante do HCO (Rizzetti *et al.*, 2017; Martinez *et al.*, 2019; Pinheiro Jr *et al.*, 2020).

Em relação aos vasos sanguíneos de condutância e de resistência, este HCO revelou ser um excelente agente para a indução de substâncias vasoativos e/ou inativação de vias deletérias induzidas pela exposição a metais. Foi verificado que em aorta de ratos o HCO apresentou efeito protetor por evitar o aumento nas respostas contráteis à fenilefrina e prevenindo a disfunção endotelial relacionada à diminuição da atividade da ECA e ativação de NOX afetando a produção de ROS e melhorando a biodisponibilidade de NO (Rizzetti *et al.*, 2017; Martinez *et al.*, 2022; Moraes *et al.*, 2022).

Nas artérias de resistência o HCO além de reduzir a resposta vasoconstritora e/ou aumentar a resposta vasodilatadora mediada pelo endotélio, reduziu os níveis de ROS, especialmente $O_2^{\cdot-}$, advindos da NADP(H) oxidase e aumentando a síntese de NO, e reduzindo a participação da COX nestas respostas (Martinez *et al.*, 2019; Escobar *et al.*, 2020; Moraes *et al.*, 2022).

Os efeitos vasculares foram diretamente repercutidos na redução da PA onde a administração tanto concomitante quanto prévia deste HCO reduziu os níveis pressóricos dos animais expostos ao alumínio e cádmio, mantendo-os na faixa de normalidade (Martinez *et al.*, 2019; Moraes *et al.*, 2022; Piagette *et al.*, 2023).

Adicionalmente ao efeito sobre a PA quando o HCO foi administrado previamente à exposição de cádmio, minimizou os danos nas artérias de resistência ocasionados pelo metal, pela normalização do aumento da resposta contrátil induzida pelo metal; dos níveis de ROS oriundos da NADP(H) oxidase, por meio da participação da subunidade NOX-1, e da peroxidação lipídica; bloqueio da ativação de processos inflamatórios, mediados por COX-2, NF-kB e TNF- α ; e revelou uma nova via de ação deste HCO com inibição de processos apoptóticos, via redução da ativação de caspase-3 (Piagette *et al.*, 2023).

Além, do efeito sobre o sistema cardiovascular foi demonstrado que nos modelos de exposição ao mercúrio e ao alumínio o HCO tem ação direta sobre o tecido adiposo branco, melhorando a expressão de mRNA de CHOP, PPAR α e leptina e aumentando os níveis de insulina (Rizzetti *et al.*, 2002) e no sistema gastrointestinal, melhorando a oxidação e as alterações morfológicas do intestino (Martinez *et al.*, 2022).

Embora se tenha uma vasta linha de investigação relacionada aos efeitos benéficos deste HCO, e seus efeitos anti-hipertensivos pareçam claros relacionados aos principais mecanismos desencadeadores e de manutenção da HA, estresse oxidativo e a inflamação, ainda não se tem informações na literatura acerca do efeito deste hidrolisado na HA

secundária mimetizada pelo modelo DOCA-sal bem como a ação deste na disfunção do tecido adiposo perivascular mesentérico.

Tabela 3: Hidrolisado de Clara de Ovo obtidos com pepsina e seus efeitos em diferentes modelos experimentais

TIPO DE HCO OU SEQUÊNCIA PEPTÍDICAS	MÉTODO/MODELO	DOSE	EFEITO	REFERÊNCIA
Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu - RADHPFL* Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu - YAEERYPIL**	<i>in vitro</i>	---	iECA IC50 6,2* e 4,7** µM	Miguel et al., 2004
Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu - YAEERYPIL	<i>in vitro</i>	---	antioxidante; iECA	Dávalos et al., 2004
Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu – YAEERYPIL Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu - RADHPFL Ile-Val-Phe – FIV EW HEW HEW <3000KDa	SHR Agudo	YAEERYPIL – 2mg/kg RADHPFL- 2mg/kg FIV - 4mg/kg EW – 400mg/kg HEW-400mg/kg HEW <3000KDa – 100mg/kg	↓PA 4-6h iECA	Miguel et al., 2005
HCO pepsina 3h	SHR	0,75 mg/kg e 1g/kg	↓PA retarda aparecimento da hipertensão em SHR iECA	Miguel et al., 2006
IVF, RADHPFL e YAEERYPIL. E após a digestão simulada: RADHP e YPI 3h	aorta	10 mg/kg	Vasodilatador (NO/bradicinina)	Miguel et al., 2007
YRGGLEPINE, RDILNQ e ESINF, sequências sintéticas identificadas no HCO de 3h	SHR dose única; aorta	10 mg/kg	↓PA Vasodilatador	Miguel et al., 2007
HCO pepsina 3h	SHR curto e longo prazo plasma, aorta, rim e pulmões	0,5 mg/kg e 1g/kg	↓PA iECA	Miguel et al., 2007

HCO pepsina 3h	SHR aorta, plasma	0,5 mg/kg e 1g/kg	Antioxidante anti-hiperlipidêmico	Manso et al., 2008
Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu; Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe; Arg-Ala-Asp-His-Pro; Tyr-Arg-Gly-Gly-Leu-Glu- Pro-Ile-Asn-Phe; Arg-Asp-Ile-Leu-Asn-Gln;	MRA	0,1 mmol L ⁻¹	Vasodilatador	García-Redondo et al., 2010
Val-Pro-Pro (e+); Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu				
HCO pepsina 8h	<i>in vitro</i>	IC50 ECA 46,70 ug/proteína/ mL; 574,20 umol/Trolox/proteína; 200 ug/mL/proteína redução dos níveis de citocinas pró- inflamatórias	iECA; antioxidante anti-inflamatória	Garcés-Rimón et al., 2016
HCO pepsina 8h	obesidade genética (ratos Zucker); tecido adiposo branco epididimal; fígado e plasma	750 mg/kg	anti-obesogênico	Garcés-Rimón et al., 2016
HCO pepsina 8h	baixas doses de HgCl ₂ ; cérebro (nocicepção)	1g/kg	protetor à distúrbios neuropáticos; antioxidante	Rizzetti et al., 2016
HCO pepsina 8h	baixas doses de HgCl ₂ ; sistema reprodutor	1g/kg	Proteção espermática (número e forma) Antioxidante	Rizzetti et al., 2017
HCO pepsina 8h	baixas doses de HgCl ₂ ; aorta	1g/kg	↓PA antioxidante; via NADPH oxidase ATR1 iECA	Rizzetti et al., 2017

HCO pepsina 8h	obesidade genética (ratos Zucker); microbiota intestinal		anti-obesogênico	Requena et al., 2017
HCO pepsina 8h	síndrome metabólica (ratos Zucker); sangue e pâncreas	750 mg/kg	anti-glicêmico; anti-obesogênico;	Garcés-Rimón et al., 2018
HCO pepsina 8h	síndrome metabólica dieta hiperlipídica/dextrose; adiposo branco; plasma e fígado	1g/kg	anti-obesogênico;	Moreno-Fernandez et al., 2018
HCO pepsina 8h	obesidade e síndrome metabólica (dieta hiperlipídica/dexrtrose); adiposo branco e marron	1g/kg	anti-obesogênico	Moreno-Fernandez et al., 2018
HCO pepsina 8h	obesidade genética (ratos Zucker); aorta e MRA	750 mg/kg	Antioxidante via NOX-1	Garcés-Rimón et al., 2019
HCO pepsina 8h	altas e baixas doses AlCl ₃ ; cérebro (memória; cognitivo)	1g/kg/dia	antioxidante; anti-inflamatório	Martinez et al., 2019
HCO pepsina 8h	altas e baixas doses AlCl ₃ ; reprodutor	1g/kg/dia	antioxidante; anti-inflamatório	Martinez et al., 2019
HCO pepsina 8h	altas e baixas doses AlCl ₃ ; aorta e MRA	1g/kg/dia	↓PA antioxidante; anti-inflamatório	Martinez et al., 2019
HCO pepsina 8h	baixas doses de HgCl ₂ ; MRA	1g/kg/dia	↓PA antioxidante; anti-inflamatório	Escobar et al., 2020
HCO pepsina 8h	altas doses de CdCl ₂ ; co-tratamento; sistema reprodutor	1g/kg/dia	recupera função espermática antioxidante;	Pinheiro Junior et al., 2020
HCO pepsina 8h	altas doses de CdCl ₂ pré-tratamento; MRA	1g/kg/dia	↓PA antioxidante	Moraes et al., 2022

HCO pepsina 8h	baixas doses de HgCl ₂ ; tecido adiposo	1g/kg/dia	anti-inflamatório antioxidante anti-apoptótico	Rizzetti et al., 2022
HCO pepsina 8h	altas e baixas doses AlCl ₃ ; intestino	1g/kg/dia	anti-inflamatório antioxidante ↓depósito de Al	Martinez et al., 2022
HCO pepsina 8h	altas e baixas doses AlCl ₃ ; sistema reprodutor (ratos)	1g/kg/dia	↓depósito Al antioxidante anti-inflamatório preserva células reprodutivas	Martinez et al., 2022
HCO pepsina 8h	Hipertensão (ratos DOCA-sal); aorta e MRA	1g/kg/dia	anti-hipertensivo; antioxidante	Da Luz Abreu et al., 2022
HCO pepsina 8h	altas doses de CdCl ₂ (pré-tratamento); MRA	1g/kg/dia	anti-hipertensivo; antioxidante; anti-inflamatório anti-apoptótico	Piagette et al., 2023

3. HIPÓTESE

A administração dietética diária com um hidrolisado de clara de ovo obtido por pepsina por 8h atenua os danos pressores e vasculares promovidos pela HA DOCA-sal.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Avaliar se o tratamento com um hidrolisado de clara de ovo previne os danos e repercussões pressóricas e disfunção endotelial e do tecido adiposo perivascular mesentérico induzidas pela HA DOCA-sal.







4.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito do tratamento com o HCO sobre os parâmetros pressóricos induzidos pelo modelo DOCA-sal;
- Investigar a papel protetor vascular do HCO em artérias de condutância e resistência em modelo DOCA-sal e as vias implicadas;
- Verificar se o HCO interfere na disfunção do PVAT induzida pela HA maligna e quais os mecanismos envolvidos;
- Averiguar o papel do HCO na proteção vascular sobre os mecanismos de mediadores disfuncionais de estresse oxidativo e inflamatórios na HA DOCA-sal;
- Explorar o envolvimento do sistema SRAA local nas alterações vasculares promovidas pela HA DOCA-sal.

PARTE II
MANUSCRITO I

Article

ROS Suppression by Egg White Hydrolysate in DOCA-Salt Rats—An Alternative Tool against Vascular Dysfunction in Severe Hypertension

Edina da Luz Abreu ¹, Camila Rodrigues Moro ¹, Samia Hassan Husein Kanaan ¹, Ricardo Bernardino de Paula ², Camila Teixeira Herrera ¹, Pedro Henrique Dorneles Costa ¹, Franck Maciel Peçanha ¹, Dalton Valentim Vassallo ³, Luciana Venturini Rossoni ², Marta Miguel-Castro ^{4,*}, and Giulia Alessandra Wiggers ^{1,*}

¹ Cardiovascular Physiology Laboratory, Universidade Federal do Pampa, BR 472, Km 592, Uruguaiana 97501-970, Brazil

² Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, n° 2415, São Paulo 05508-000, Brazil

³ Cardiac Electromechanical and Vascular Reactivity Laboratory, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Vitória 29040-090, Brazil

⁴ Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM.), C/Nicolás Cabrera, 9, Campus Universitario de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

* Correspondence: marta.miguel@csic.es (M.M.-C.); giuliapecanha@unipampa.edu.br (G.A.W.)



Citation: Abreu, E.d.L.; Rodrigues Moro, C.; Hassan Husein Kanaan, S.; de Paula, R.B.; Herrera, C.T.; Costa, P.H.D.; Peçanha, F.M.; Vassallo, D.V.; Rossoni, L.V.; Miguel-Castro, M.; et al. ROS Suppression by Egg White Hydrolysate in DOCA-Salt Rats—An Alternative Tool against Vascular Dysfunction in Severe Hypertension. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1713. <https://doi.org/10.3390/antiox11091713>

Academic Editor: Dong Uk Ahn

Received: 27 July 2022

Accepted: 27 August 2022

Published: 30 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: This study aimed to evaluate the potential for lowering blood pressure and beneficial effects on mesenteric resistance arteries (MRA) and conductance vessels (aorta) produced by dietary supplementation of an egg white hydrolysate (EWH) in rats with severe hypertension induced by deoxycorticosterone plus salt treatment (DOCA-salt), as well as the underlying mechanisms involved. The DOCA-salt model presented higher blood pressure, which was significantly reduced by EWH. The impaired acetylcholine-induced relaxation and eNOS expression observed in MRA and aorta from DOCA-salt rats was ameliorated by EWH. This effect on vessels (MRA and aorta) was related to the antioxidant effect of EWH, since hydrolysate intake prevented the NF- κ B/TNF α inflammatory pathway and NADPH oxidase-induced reactive oxygen species (ROS) generation, as well as the mitochondrial source of ROS in MRA. At the plasma level, EWH blocked the higher ROS and MDA generation by DOCA-salt treatment, without altering the antioxidant marker. In conclusion, EWH demonstrated an antihypertensive effect in a model of severe hypertension. This effect could be related to its endothelium-dependent vasodilator properties mediated by an ameliorated vessel's redox imbalance and inflammatory state.

Keywords: egg white hydrolysate; hypertension; deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt; oxidative stress; inflammation; mitochondria

1. Introduction

Hypertension is one of the most common chronic diseases worldwide. It is of multifactorial origin and results from a complex interaction between environmental (such as dietary) and genetic factors [1–3]. Although a larger number of pharmacological and non-pharmacological therapies are used, some patients are resistant to treatment, mainly those who present severe hypertension [2,4]. Thus, more studies are necessary to improve blood pressure control in hypertension. Interestingly, endothelial dysfunction is a hallmark of hypertension, and the resistance and conductance arteries are crucial for the regulation and maintenance of blood pressure [3]. In hypertension, oxidative stress is implicated in vascular injuries [5–7], and the main vascular sources of oxidative stress are the excessive production of superoxide anion (O_2^-) by NADPH oxidase, xanthine oxidase, mitochondria, cyclooxygenase-2, and/or uncoupled nitric oxide (NO) synthase [6–8]. As a result of this

oxidative stress, endothelium-dependent vasodilation is impaired, and vascular stiffness and peripheral vascular resistance are increased, contributing to the development and maintenance of arterial hypertension, leading to damage to end-organs [5,6,9].

Considering its complexity, hypertension is studied in different models of experimental rodents, including deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension, a volume-dependent hypertension model that combines DOCA treatment, and high salt intake with uninephrectomy. This model induces severe hypertension and impacts blood volume, cardiac output, and peripheral vascular resistance; thus, it is a helpful model for studies on resistant hypertension [7,10,11].

Non-pharmacological strategies to prevent or treat hypertension have gained attention. In this context, natural bioactive compounds from foods seem safe and low-cost alternatives. Moreover, this strategy generally does not present side effects common in the polytherapy usually used for the treatment of hypertension [4,12]. Among them, bioactive peptides derived from food proteins with antihypertensive and antioxidant properties have been reported to be successfully used to control hypertension and related disorders. In previous works, enzymatic hydrolysis of egg white proteins with pepsin for eight hours produced multifunctional peptides with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory action and antioxidant, anti-inflammatory, and vasorelaxant activities [13–24]. A blood-pressure-lowering effect related to ACE inhibition and antioxidant activity was also demonstrated after short- and long-term administration of this hydrolysate on a genetic model of hypertension—spontaneously hypertensive rats (SHR) [14,15]. However, the effect and mechanisms of this functional food administration on blood pressure and vascular dysfunction in the severe hypertension model have been little explored.

This study aimed to evaluate the potential antihypertensive and vasculoprotective effects of dietary supplementation of an egg white hydrolysate (EWH) in DOCA-salt hypertensive rats and the mechanisms involved.

2. Material and Methods

2.1. Egg White Hydrolysate Preparation

EWH was obtained by enzymatic hydrolysis of raw egg whites after treatment with food-grade pepsin, as described previously by Garcés-Rimón et al., 2016 [20]. For eight hours, pasteurized egg white was hydrolyzed with pepsin BC 1:3000 (Biocatalyst, UK). Enzyme inactivation was achieved by increasing the pH to 7.0 with NaOH (5 N). The hydrolysate was centrifuged at $2500\times g$ for 15 min, and the supernatant was frozen and lyophilized until used.

2.2. Animals and Treatment

Male Wistar rats (180–220 g) were obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Pelotas (Rio Grande do Sul, Brazil). Animals were maintained at standard conditions (constant room temperature, humidity, and 12:12 h light-dark) with water and fed *ad libitum* in the Federal University of Pampa vivarium. The experimental protocols were performed according to guidelines of the National Council of Ethics with Animals (CONCEA) and National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH, 1996), and the Local Institution Animal Care and Use Committee (protocol number 003/2020).

Rats were submitted to the tail-cuff plethysmography to evaluate the systolic blood pressure (SBP) levels before the uninephrectomy (time -1 /week) and the induction of the hypertensive model. Afterward, all animals were submitted for right kidney removal as previously described [7]. Thus, the rats were anesthetized (64.9 mg/kg ketamine, 3.2 mg/kg xylazine, and 0.78 mg/kg acepromazine, *i.p.*) and underwent a small incision in the right flank for kidney removal. All animals received analgesia for 3 days post-surgery (Ketofen® 0.2 mg/kg, *s.c.*).

As observed in Figure 1, seven days after surgery (time 0), rats were randomly divided into two groups: DOCA-salt and SHAM (Vehicle). Animals of the SHAM group received

vehicle injections (1:1 mineral oil and propylene glycol) and drinking water. Animals of the DOCA-salt group received subcutaneous injections of DOCA (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) diluted in 1:1 mineral oil and propylene glycol at the sequential doses of 20 mg/kg in the first week, 12 mg/kg in the second and third week, and 6 mg/kg from the fourth week to the eighth week of the experimental period, plus water supplemented with 1.0% of NaCl and 0.2% of KCl [7]. In the last four weeks of the experimental period, the groups were subdivided into animals treated with EWH diluted in water (1 g/kg/day, by gavage) [21] or water, by gavage. Thus, the animals constituted 4 experimental groups: SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH.

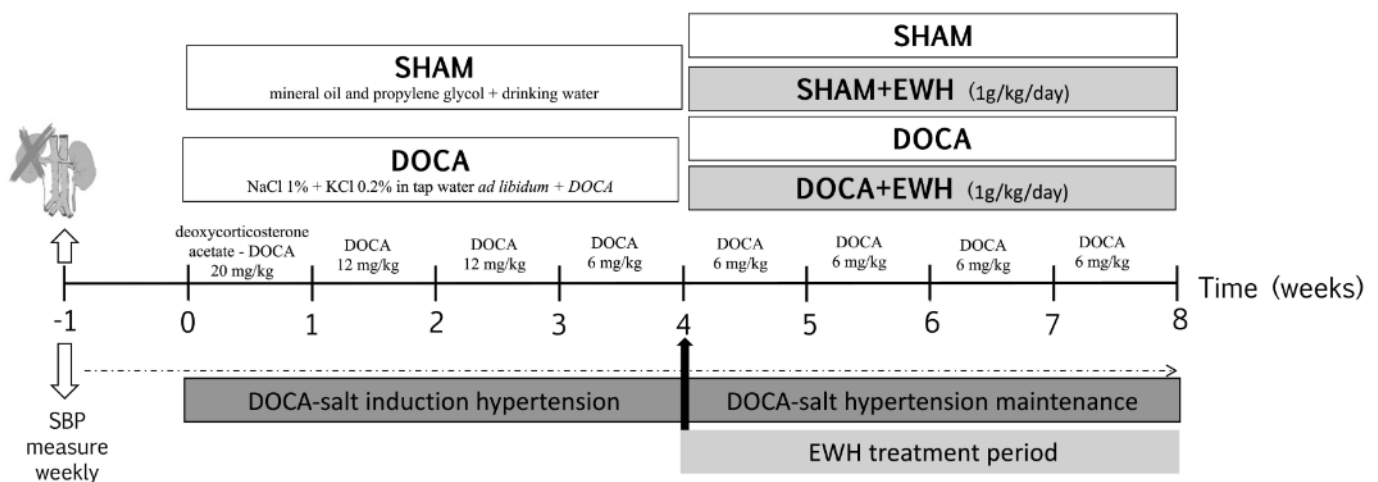


Figure 1. Schematic representation of experimental groups, DOCA-salt hypertension induction model and EWH treatment period.

2.3. Systolic Blood Pressure Measurement

As described above, SBP was measured weekly using a standard non-invasive tail-cuff plethysmography method (Pneumatic transducer, AD Instruments Pty Ltd., Bella Vista, NSW, Australia) in conscious, restrained rats as described [25]. Briefly, rats were heated to 37 °C for 10 min to detect caudal artery pulsations. Afterward, the transducer was placed on the tail, and the average of ten collected times of SBP was used. To ensure the reliability of the measurements, all animals were previously acclimatized, and measurements were made for the same person at the same time of day. The measurements were made weekly in the following times: time −1 and 0, before, and 1 week after uninephrectomy; time 1 to 4, 1 to 4 weeks after DOCA-salt or SHAM treatment; and time 4–8, after the co-treatment with EWH or water (Figure 1).

2.4. Blood, Tissue Collection, and Mesenteric and Aorta Vascular Reactivity Experiments

At the end of the experimental period, animals were anesthetized (87 mg/kg ketamine, and 13 mg/kg xylazine, *i.p.*) and euthanized. Blood samples, mesenteric resistance arteries (MRA), and thoracic aorta were removed. Arteries were cleaned of connective tissue, and some rings were inserted in a freezing medium (OCT) and frozen at −80 °C.

For vascular reactivity experiments, third order MRA (2 mm) and thoracic aorta (4 mm) segments with (E+) and without endothelium (E-, mechanically removed) were mounted in a wire myograph for small and larger vessels [26,27]. After 45 min of equilibration period in gassed (95% O₂ and 5% CO₂) Krebs–Henseleit solution (in mM: 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 11.1 glucose, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgSO₄·7H₂O, 1.2 KH₂PO₄, and 0.01 Na₂EDTA; pH 7.4, 37 °C), MRA were stretched to their optimal lumen diameter to develop active tension, and aorta segments maintaining an optimal resting tension of 1.5 g. MRA diameter were similar among groups (SHAM: 292.2 ± 4.8 vs. SHAM+EWH: 291.1 ± 8.4 vs. DOCA: 288.5 ± 8.2 vs. DOCA+EWH: 291.1 ± 4.5 μm, n = 10; Two-way ANOVA, *p* > 0.05).

To verify the smooth muscle integrity and the maximal tension developed, MRA and aorta segments were exposed twice to a high-potassium solution (KPSS-120 or 75 mM, respectively). The vascular response to KPSS remained unaltered in MRA (SHAM: 4.0 ± 0.1 vs. SHAM+EWH: 4.2 ± 0.2 vs. DOCA: 4.0 ± 0.1 vs. DOCA+EWH: 4.3 ± 0.1 mN/mm, $n = 10$; Two-way ANOVA, $p > 0.05$) and in aorta (SHAM: 1.5 ± 0.1 vs. SHAM+EWH: 1.4 ± 0.1 vs. DOCA: 1.5 ± 0.1 vs. DOCA+EWH: 1.7 ± 0.1 g, $n = 10$; Two-way ANOVA, $p > 0.05$) among groups.

After 60 min, the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine (ACh—Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was assessed. MRA and aorta segments were pre-contracted with α -adrenergic agonists (norepinephrine—NE and phenylephrine—Phe, respectively; Sigma-Aldrich), in a concentration that produced tension close to 50% of those induced by KPSS and a concentration–response curve to ACh (1 nM–1 mM) was performed. To evaluate the endothelium-independent relaxation, concentration–response curves to NO donor sodium nitroprusside (SNP, 0.1 nM–300 μ M; Sigma-Aldrich) were performed in NE or Phe pre-contracted segments.

To evaluate the participation of NO, reactive oxygen species (ROS), mitochondrial superoxide anion production, NF- κ B activity on ACh-induced relaxation, and some MRA and/or aorta segments with intact endothelium (E+) were pre-incubated for 30 min with: (i) N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μ M; Cat. N $^{\circ}$ N5751—Sigma-Aldrich), a non-selective NO synthase (NOS) inhibitor (only in the aorta); (ii) superoxide dismutase (SOD, 750 U/mL; Cat. N $^{\circ}$ s5395—Sigma-Aldrich), superoxide anion scavenger; (iii) Mi-toTEMPO (0.5 μ M; Cat. N $^{\circ}$ SML0737—Sigma-Aldrich), specific scavenger of mitochondrial O $_2^-$; and (iv) BAY 117,082 (5 μ M; Cat. N $^{\circ}$ B5556—Sigma-Aldrich) NF- κ B inhibitor (only in MRA), respectively.

2.5. Determination of Oxidative Stress Biomarkers in Plasma, MRA, and Aorta

To evaluate the oxidative stress biomarkers in MRA and aorta, the vessels were homogenized in Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) and centrifuged at $2400 \times g$ for 10 min at 4 $^{\circ}$ C, and the supernatant fraction was used.

Malondialdehyde levels (MDA), a measure of lipid peroxidation, were performed using the colorimetric method. Briefly, thiobarbituric acid (TBA) 0.8%, acetic acid buffer (pH 3.2) plus sodium dodecyl sulfate (SDS) 8% were added to the samples, and the color reaction was measured against blanks (532 nm—SpectraMax M5 Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The results were expressed as nmol MDA/g tissue [28].

ROS levels [29] were determined by 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) using the spectrofluorometric method. Briefly, after being diluted (1:5 in Tris-HCl 50 mM; pH 7.4), samples received 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, 1 mM; Cat. N $^{\circ}$ 6883—Sigma-Aldrich). The DCF fluorescence intensity emission represents the amount of ROS formed (520 nm emission with 480 nm excitation for 60 min at 15 min intervals—SpectraMax M5 Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The ROS levels were expressed as fluorescence units.

The total antioxidant capacity (FRAP) was measured by the Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP) assay [30]. Briefly, the sample was added to FRAP reagent 10:1:1 [Sodium acetate buffer—300 mM pH 3.6; 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine—TPTZ—10 mM (Cat. N $^{\circ}$ 93285, Sigma-Aldrich); Iron (III)—FeCl $_3$ —20 mM (Cat. N $^{\circ}$ 157740, Sigma-Aldrich)] and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 10 min. The absorbance was read at 593 nm (SpectraMax M5 Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Data are expressed in reference to mM Trolox equivalents.

2.6. In Situ Detection of Vascular O $_2^-$ Production in MRA and Aorta and NO Production in the Aorta

O $_2^-$ production in situ in MRA and aorta was measured by dihydroethidium (DHE) (Cat. N $^{\circ}$ D2310, Invitrogen Life Technologies, Waltham, MA, USA), as previously described by Piech et al. (2003) [31]. To evaluate the source of the O $_2^-$, mitochondrial and/or by the antioxidant activity of superoxide dismutase (SOD), some sections were incubated with

DHE plus Mito-Tempo a scavenger of mitochondrial superoxide anion (0.5 mM—Sigma Aldrich) or MnTMPyP, a mimetic of SOD (25 μ M; Cat. N° ALX-430-07—Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), respectively. The mean fluorescence densities were calculated using NIH ImageJ software V1.56 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) using the same imaging settings in each case. The results are expressed as arbitrary units (AU) of fluorescence intensity.

NO production was measured in the aorta sections using the NO-sensitive fluorescent dye 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2; Cat. N° D225, Sigma Aldrich), according to Couto et al. (2015) [32]. The aortic sections were equilibrated for 10 min in phosphate buffer (0.1 mol/L, pH 7.4) that contained CaCl_2 (0.45 mmol/L). The fresh buffer that contained DAF-2 (8 μ mol/L) was topically applied to each tissue section and incubated in a light-protected humidified chamber at 37 °C. After 25 min of incubation, sections of each artery were stimulated without (Basal) or with ACh (100 μ mol/L) for 15 min. The concentration of ACh used to evaluate the NO production in the aorta was selected based on functional vascular experiments. The images were analyzed with Image J software using the integrative density of the fluorescence observed in the artery in relation to the background staining in sections with and without Ach stimulation.

2.7. Immunofluorescence in MRA and Aorta

Arterial segments of MRA and aorta were prepared and analyzed according to Jimenez-Altayó et al. (2005) [33]. The primary antibodies used were against *NOX1* (1:400; Cat. 2108601, Sigma Aldrich), *eNOS* (1:400; Cat. SAB4502615, Sigma Aldrich), *NF-kB* (1:400; Cat. 4502615, Sigma Aldrich), and *TNF α* (1:400; Cat. 5700627, Sigma Aldrich). Alexa 488-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G [IgG]) was diluted at 1:400 (Cat. N° A11001, Invitrogen Life Technologies). DAPI (1:500; Cat. MBD0015, Sigma Aldrich) to stain nuclei was used. In the preparation of negative control sections, we omitted the primary antibody. Images were acquired using an EVOS[®] Fluid[®] Cell Imaging Station (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). For quantification, sections with the same capture parameters were analyzed. The mean fluorescence densities (histogram) using ImageJ were calculated. Data are expressed as fluorescence intensity.

2.8. Statistical Analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM. Vasodilator responses to ACh or SNP were expressed as a percentage of relaxation of the pre-contraction induced by NE or Phe. Results were analyzed using two-way ANOVA followed by a post hoc Bonferroni test (GraphPad Prism 8 software, San Diego, CA, USA). Differences were considered statistically significant with values of $p < 0.05$.

3. Results

SBP was similar among groups before starting the experimental period (Figure 2, time –1), and the uninephrectomy did not alter this parameter (Figure 2, time 0). As expected, DOCA-salt treatment progressively increased SBP from week 1 to week 4 (Figure 2, time 1–4). After the 4th week of treatment, DOCA animals maintained high blood pressure levels as compared to SHAM, but DOCA+EWH animals present lower SBP values than DOCA animals (Figure 2, time 4–8). This reduction was 36% compared to the untreated DOCA group, without reaching the SBP values of the SHAM group (Figure 2). SHAM+EWH animals maintained blood pressure levels similar to those observed in SHAM animals (Figure 2).

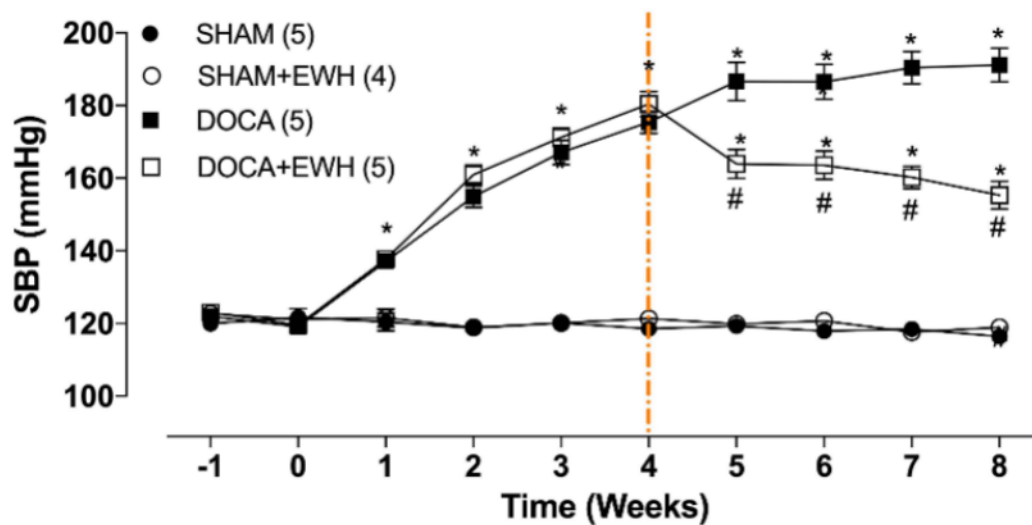


Figure 2. Effect of EWH on SBP in DOCA-salt hypertensive rats. SBP values of SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups, measured before and after nephrectomy (−1 and 0 weeks), during DOCA-salt model induction (1 to 4th week), and during the maintenance of the DOCA-salt hypertensive model co-treated or not with EWH (5th to 8th week). The EWH treatment started on the 4th week after DOCA-salt or SHAM treatment (orange-marked line). Data are expressed as mean \pm SEM. The number of rats is indicated in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. SHAM; # vs. DOCA.

The endothelium-dependent relaxation induced by ACh, in both arteries, was reduced in the DOCA group as compared to SHAM (Figure 3A,B). EWH co-treatment improved ACh-induced relaxation in MRA and aorta of DOCA animals and did not change it in SHAM animals (Figure 3A,B). The SNP-induced relaxation was not altered in both vessels among groups (Figure 3C,D).

The removal of the endothelium (E−) reduced the ACh-induced relaxation in MRA and aorta of all groups as compared to the respective E+ segments (Figure 4). The role of the endothelium in the relaxation response to ACh was strongly reduced in MRA and aorta of DOCA animals compared to SHAM, whereas EWH co-treatment partially restores this response in both arteries (Figure 4).

To investigate whether the ROS could be involved in the vascular protective action induced by EWH, the participation of the O_2^- at the cellular (SOD) or mitochondrial (Mito-Tempo) level was investigated in both vessels (Figures 5 and 6). In MRA, SOD incubation did not alter the relaxation induced by ACh in any group (Figure 5). However, Mito-Tempo improved the ACh-induced relaxation in the DOCA group (Figure 6). Moreover, in the MRA of SHAM, SHAM+EWH, and DOCA+EWH, Mito-Tempo did not change the ACh-induced response (Figure 6). This finding demonstrated the pivotal role of mitochondrial ROS in MRA endothelial dysfunction of the DOCA salt hypertensive model and the role of EWH in restoring this oxidative status. On the other hand, in aorta segments, only SOD (Figure 5), but not Mito-Tempo (Figure 6), was able to improve the ACh-induced relaxation in DOCA group, suggesting a dysfunctional action of the SOD in the aorta of the DOCA group and an antioxidant effect of EWH.

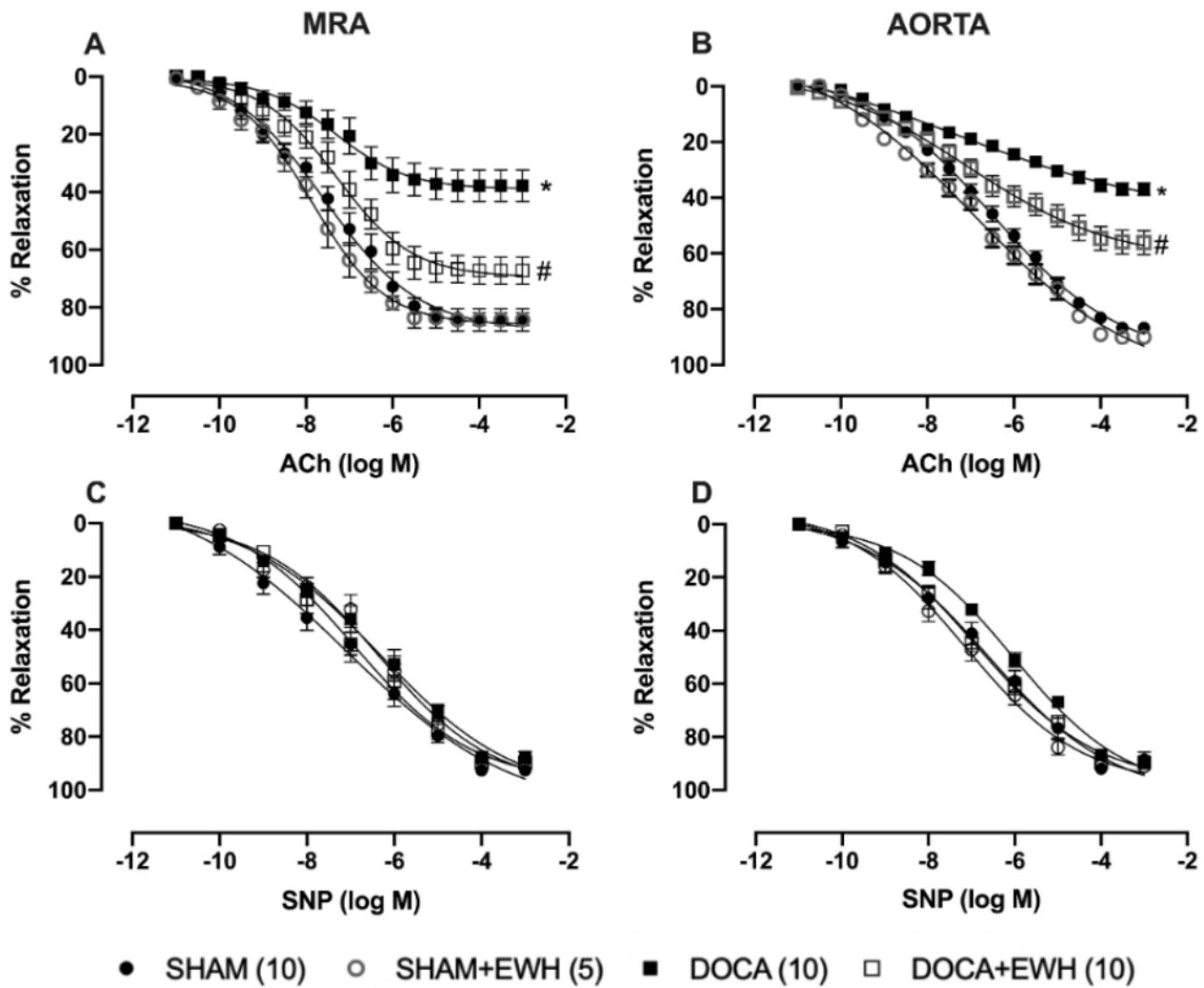


Figure 3. Effect of EWH in endothelium-dependent and -independent relaxation of MRA and aorta segments from DOCA-salt rats. Concentration–response curves to ACh (A,B) and SNP (C,D) in MRA and aorta segments from SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups. The results are expressed (mean \pm SEM) as the percentage of relaxation responses in norepinephrine or phenylephrine precontracted rings. The number of rats is indicated in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. SHAM; # vs. DOCA.

To corroborate these findings, in situ vascular ROS detection was evaluated. In MRA and aorta sections of the DOCA group, higher O_2^- detection was observed, whereas EWH co-treatment restored this detection towards SHAM levels (Figure 7). The incubation of Mito-Tempo in MRA or MnTMPyP in aorta sections decreased the DHE fluorescence intensity in DOCA group, without additional effect in the section of the DOCA+EWH group (Figure 7). Interestingly, the NOX1 protein levels were increased in MRA and aorta of DOCA rats, and the co-treatment with EWH, once again, reduced these levels towards SHAM values (Figure 8).

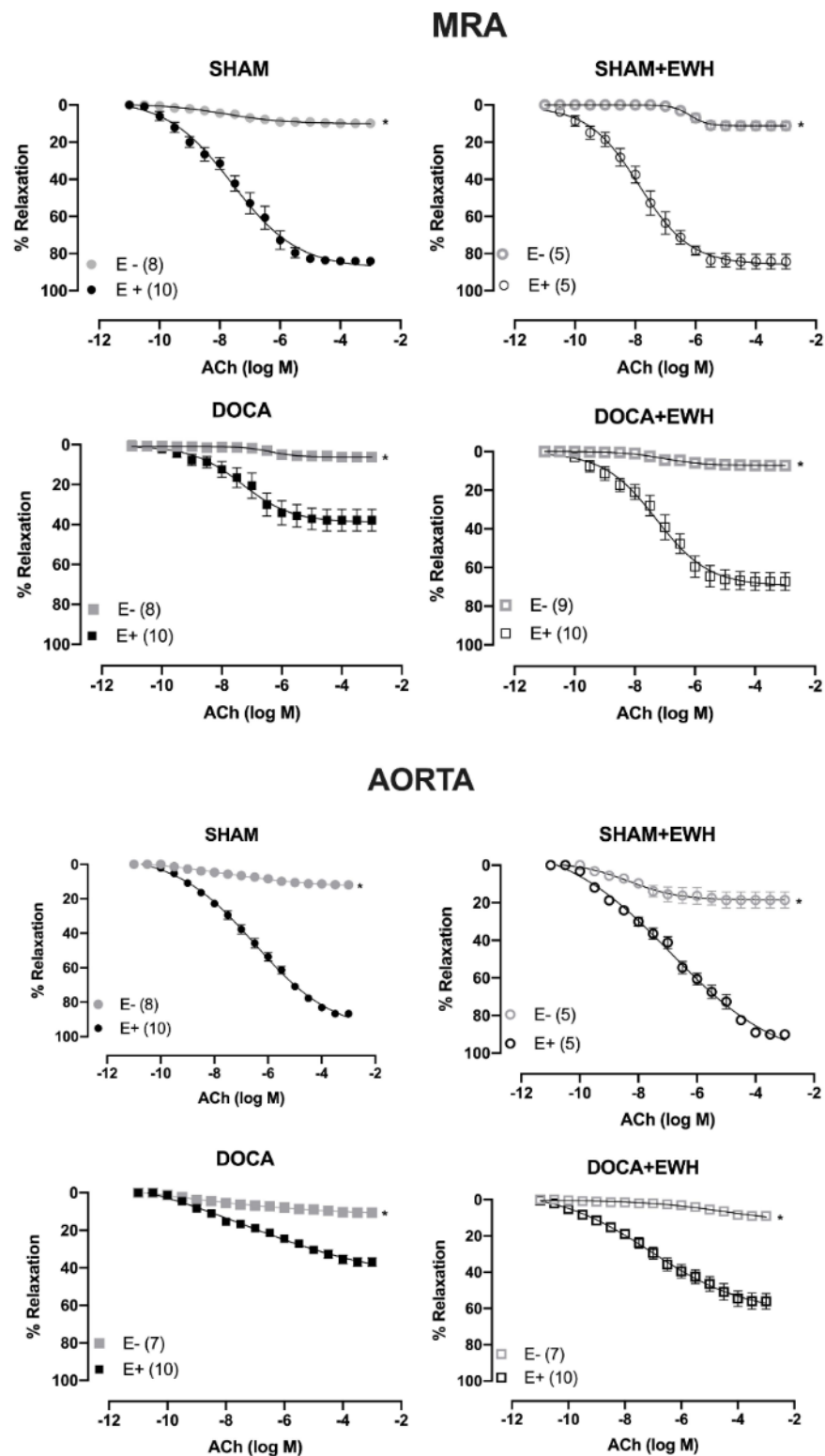


Figure 4. The role of endothelium on the effect of EWH in ACh-induced relaxation of MRA and aorta segments from DOCA-salt rats. Concentration–response curve to ACh in the presence (E+) and absence of endothelium (E−) in MRA (Upper graphics) and aorta (Bottom graphics) segments from rats SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH. The results are expressed (mean ± SEM) as the percentage of relaxation responses in norepinephrine or phenylephrine precontracted rings. The number of rats is indicated in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. E+.

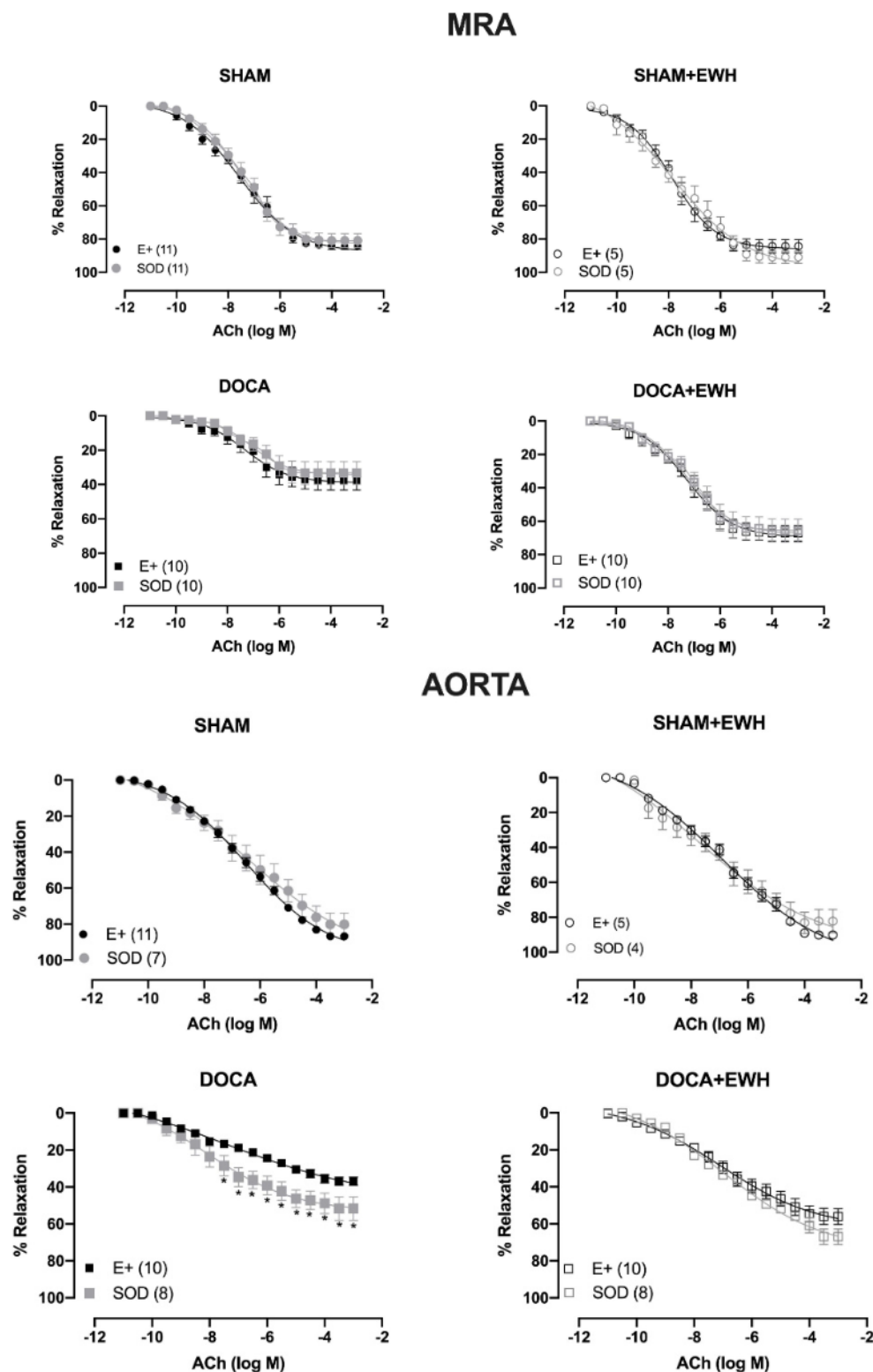


Figure 5. The role of EWH in ROS-mediated ACh-induced relaxation in MRA and aorta of DOCA-salt rats. Concentration–response curves to ACh were obtained in MRA (Upper graphics) and aorta (Bottom graphics) segments from rats from SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups before (E+) and after incubation with scavenger reactive oxygen species, the superoxide dismutase (SOD, 750/mL). The results are expressed (mean \pm SEM) as the percentage of relaxation responses in norepinephrine or phenylephrine precontracted rings. The number of animals in each group is in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. E+.

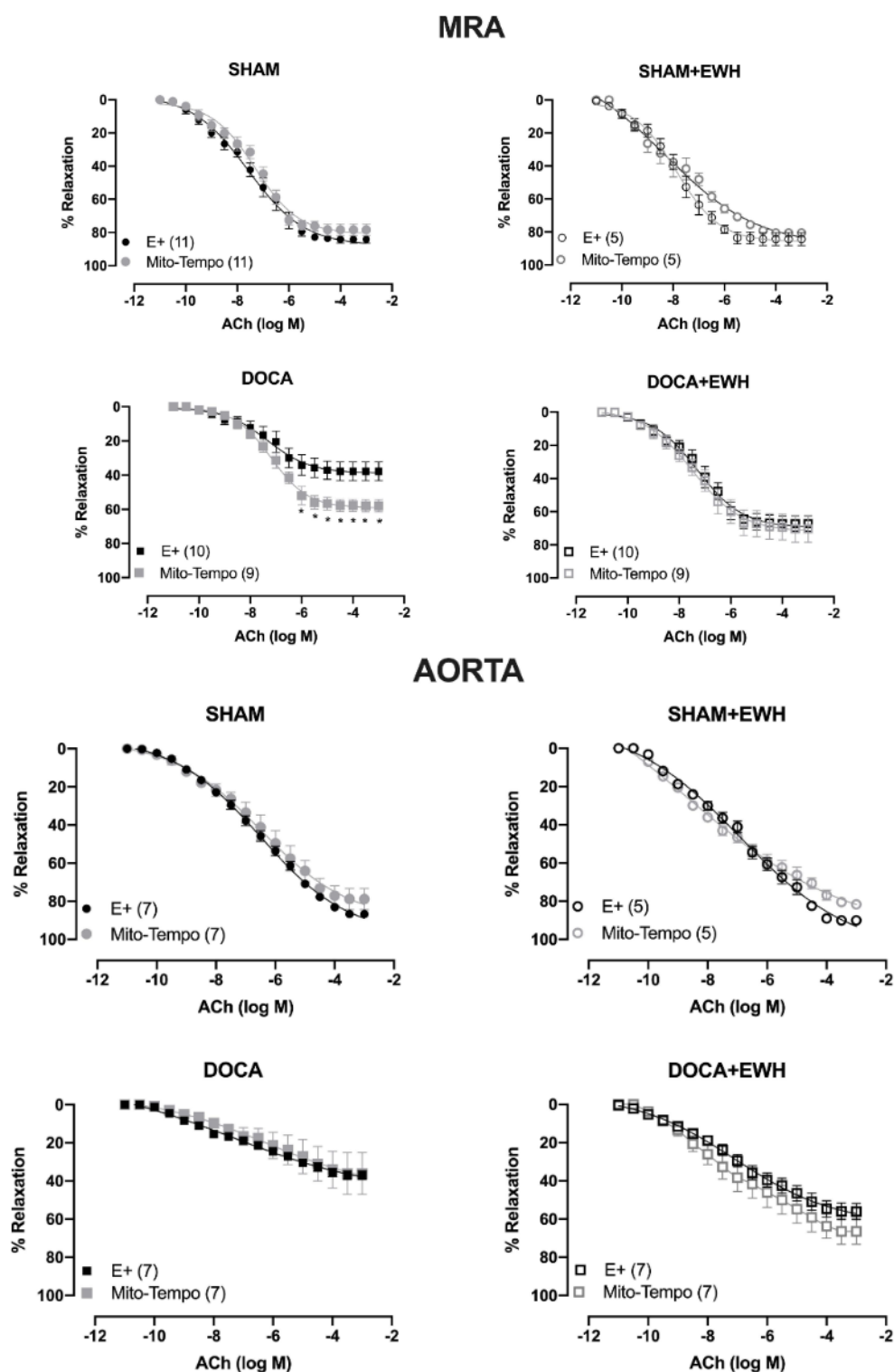


Figure 6. The role of EWH on mitochondrial ROS-mediated, ACh-induced relaxation in MRA and aorta of DOCA-salt rats. Concentration–response curves to ACh were obtained in MRA (Upper graphics) and aorta (Bottom graphics) segments from rats from SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups before (E+) and after incubation with specific scavenger of mitochondrial superoxide, Mito-TEMPO (0.5 $\mu\text{mol/L}$). The results are expressed (mean \pm SEM) as the percentage of relaxation responses in norepinephrine or phenylephrine precontracted rings. The number of animals in each group is in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. E+.

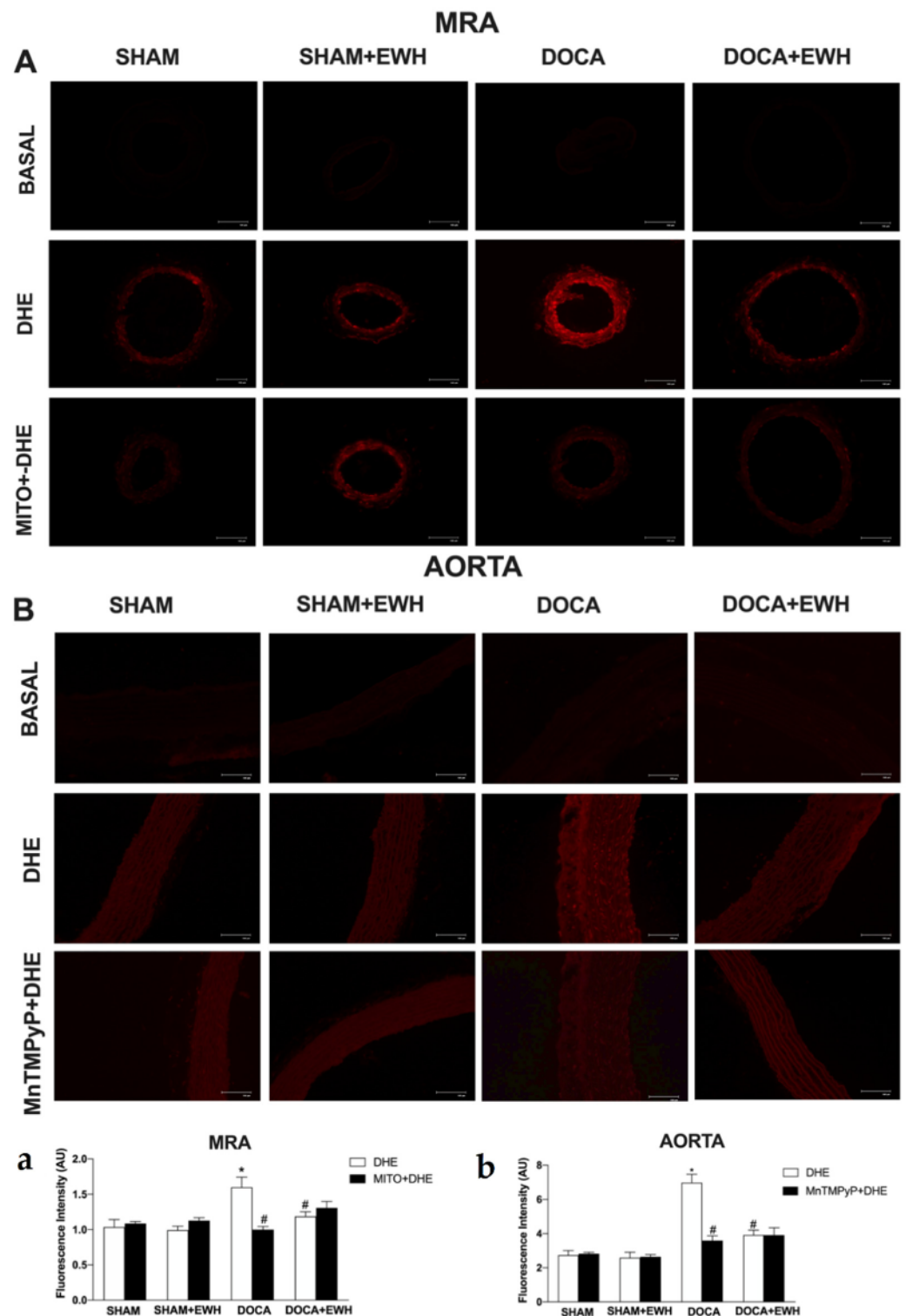


Figure 7. The role of EWH on O_2^- production in MRA and aorta section of DOCA-salt rats. Typical images of sensitive fluorescent dye Dihydroethidium (DHE) in the absence or presence of Mito-TEMPO (0.5 $\mu\text{mol/L}$ —third line panel A) or MnTMPyP (25 μM —third line panel B) in MRA and aorta sections of SHAM, SHAM+EWH, DOCA, or DOCA+EWH rats. The basal images are the negative control pictures without DHE. The histogram (a—MRA and b—Aorta) shows in white bars the DHE fluorescence and in black bars the DHE fluorescence after Mito-TEMPO or MnTMPyP incubation. The results are expressed as representative fluorescence intensity in arbitrary units. The results are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$). Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. SHAM; # vs. DOCA.

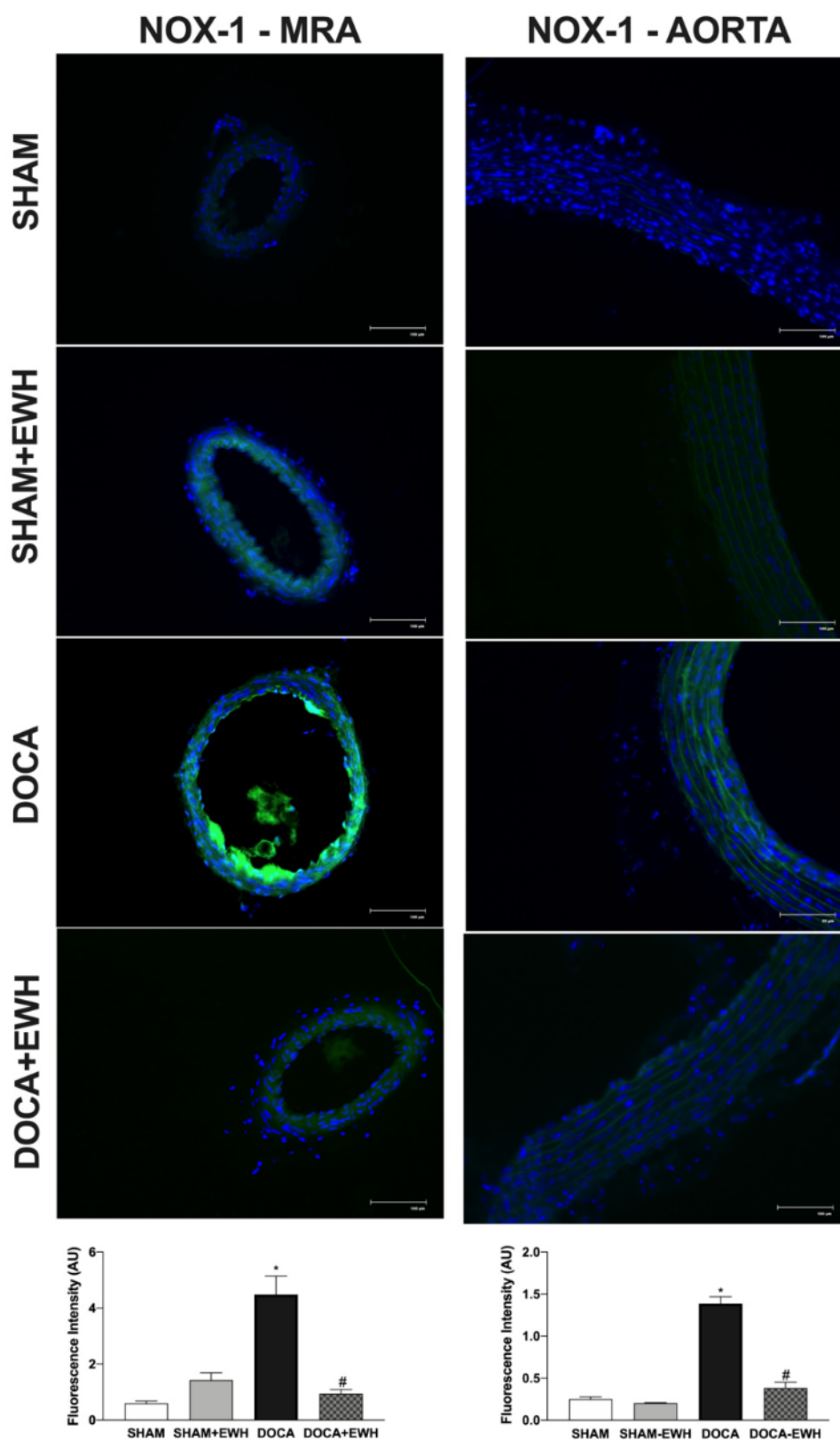


Figure 8. The role of EWH on NOX1 expression in MRA and aorta section of DOCA-salt rats. Representative photomicrographs ($\times 40$ magnification) and histogram of NOX1 immunofluorescence in MRA and aortic sections of SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH arteries. Data are expressed as mean \pm SEM, $n = 8$. The images correspond to the merge of the marking of the colors by the DAPI in blue and the NOX-1 in green. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. SHAM; # vs. DOCA.

Vascular inflammatory mechanisms play an essential role in the development of hypertension and oxidative stress [5]; thus, we investigated the expression of NF- κ B and TNF α in MRA and aorta segments. Higher NF- κ B and TNF α protein levels were observed in MRA and aorta of DOCA than in the SHAM group (Figure 9), and a significant reduction was observed in arteries of DOCA co-treated with EWH (Figure 9). In addition, NF- κ B inhibitor BAY 117,082 enhances ACh-induced relaxation in MRA of DOCA group compared to SHAM, but not in the SHAM, SHAM +EWH, and DOCA+EWH groups (Supplemental Figure S1), suggesting a greater activation of NF- κ B in MRA segments from DOCA-salt animals that was restored by EWH co-treatment.

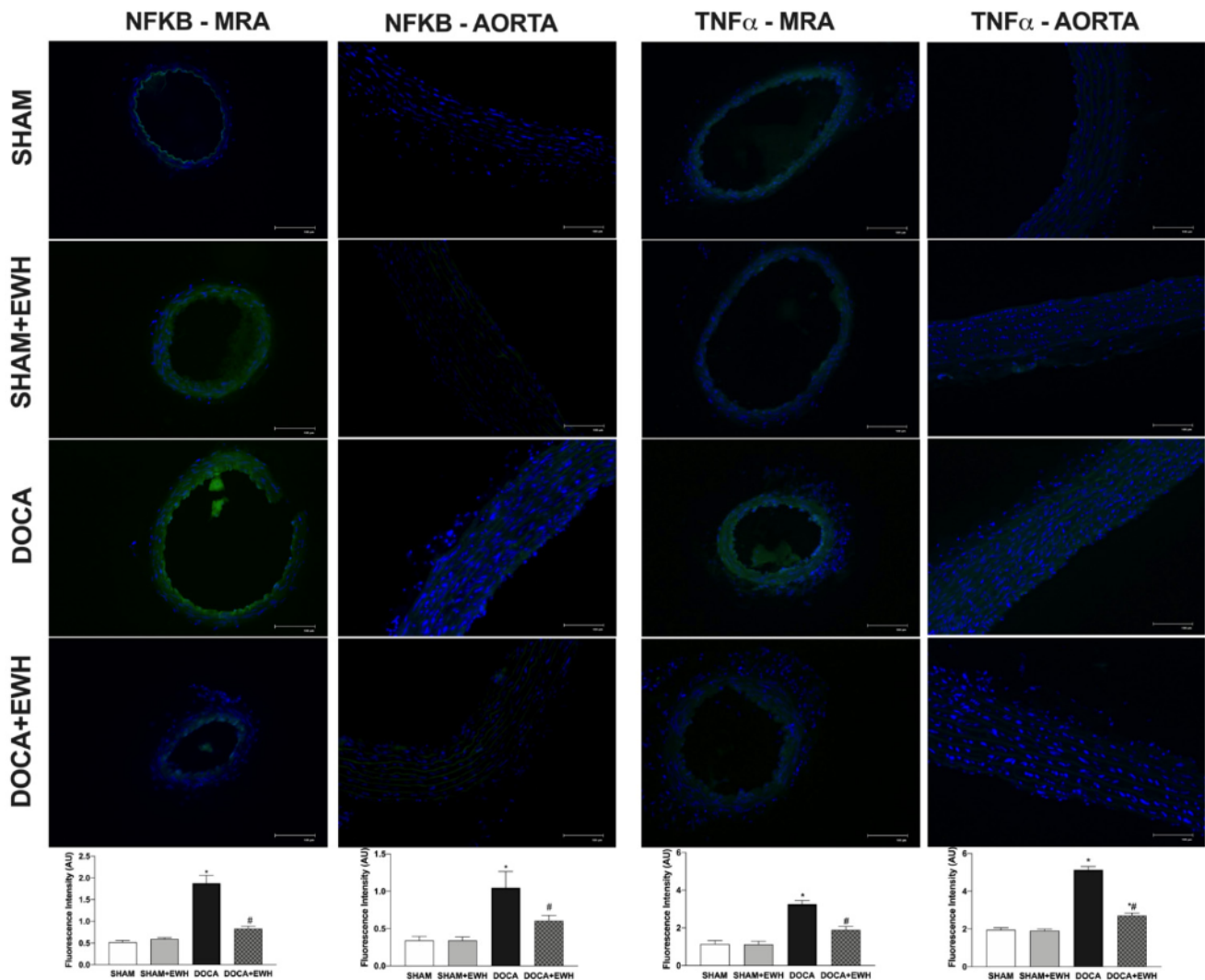


Figure 9. The role of EWH on NF- κ B and TNF α expression in MRA and aorta section of DOCA-salt rats. Representative photomicrographs ($\times 40$ magnification) and histogram of NF- κ B (left) and TNF α (right) immunofluorescence of MRA and aorta sections of SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH arteries. Data are expressed as mean \pm SEM, $n = 8$. The images correspond to the merge of the marking of the colors by the DAPI in blue and the NF- κ B and TNF α in green. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. SHAM; # vs. DOCA.

Lipid peroxidation and ROS levels were increased in both plasma and arteries of the DOCA group compared to SHAM, and the co-treatment with EWH restored those parameters (Figure 10). However, DOCA-salt treatment or EWH co-treatment did not change the antioxidant capacity in plasma or arteries (Figure 10). These results suggest a redox imbalance in the DOCA group that was restored after EWH co-treatment.

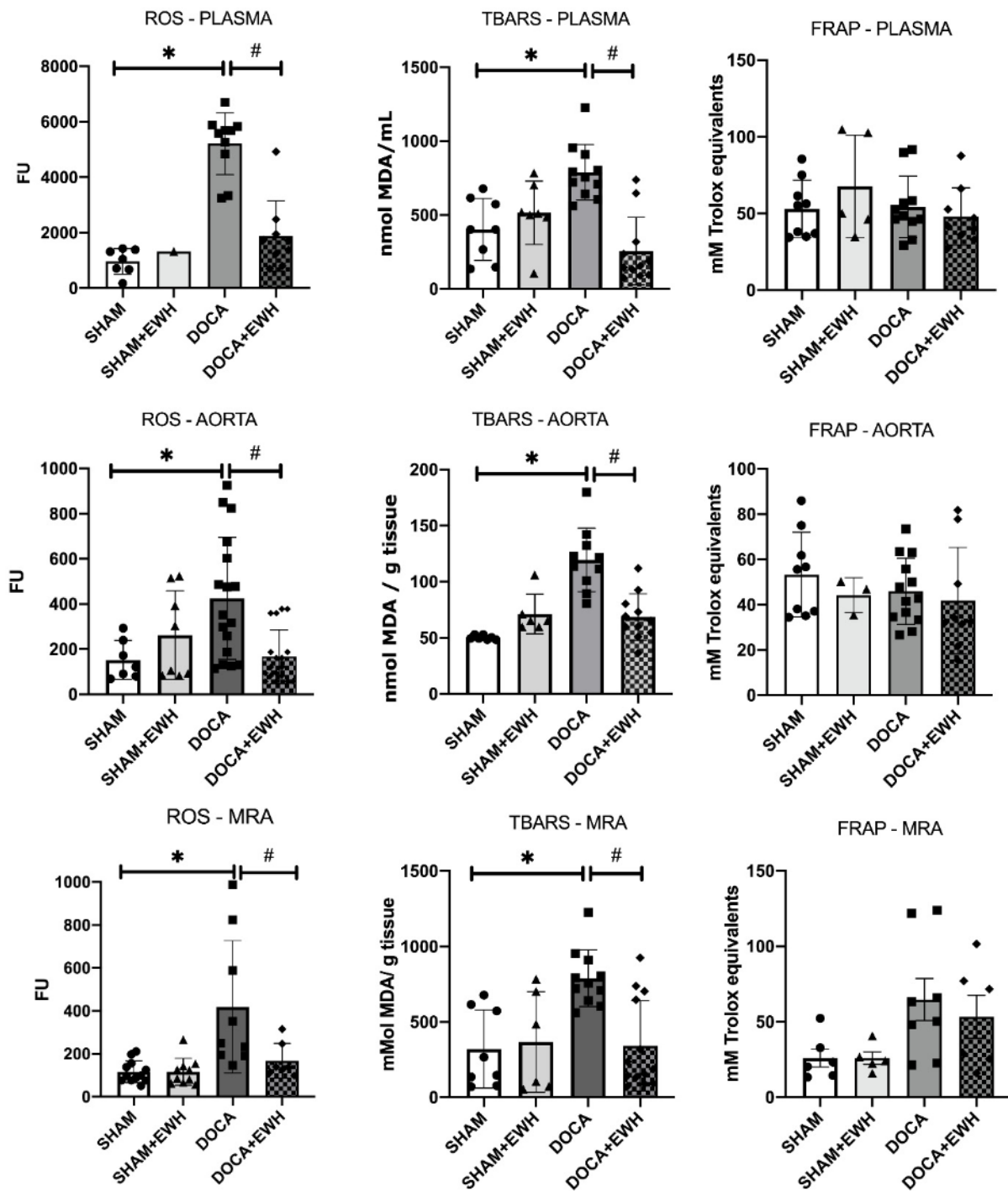


Figure 10. Effects of EWH on the oxidative stress (ROS and TBARS) and antioxidant (FRAP) capacity in plasma, MRA, and aorta of DOCA-salt rats. ROS, TBARS, and FRAP values were assessed in plasma, MRA, and aorta of SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH rats. The results are expressed as mean \pm SEM, and the number of animals is indicated as dots in the bars. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. SHAM; # vs. DOCA.

Additionally, the involvement of the NO pathway was also investigated. In aorta segments, a reduced relaxation response to ACh was observed in all groups after the non-selective NOS inhibition with L-NAME (Supplemental Figure S2). However, in the DOCA group, the magnitude of the reduction was smaller compared to SHAM, and EWH co-treatment improved it (Supplemental Figure S2). To corroborate these findings, we observed a significant reduction in ACh-induced NO levels in aortic sections of the DOCA

group as compared to SHAM and its recovery in the aortic section of EWH co-treated rats (Supplemental Figure S3). In addition, the eNOS expression was lower in MRA and aorta of the DOCA group than in SHAM; once again, EWH co-treatment restored eNOS expression to SHAM levels (Figure 11).

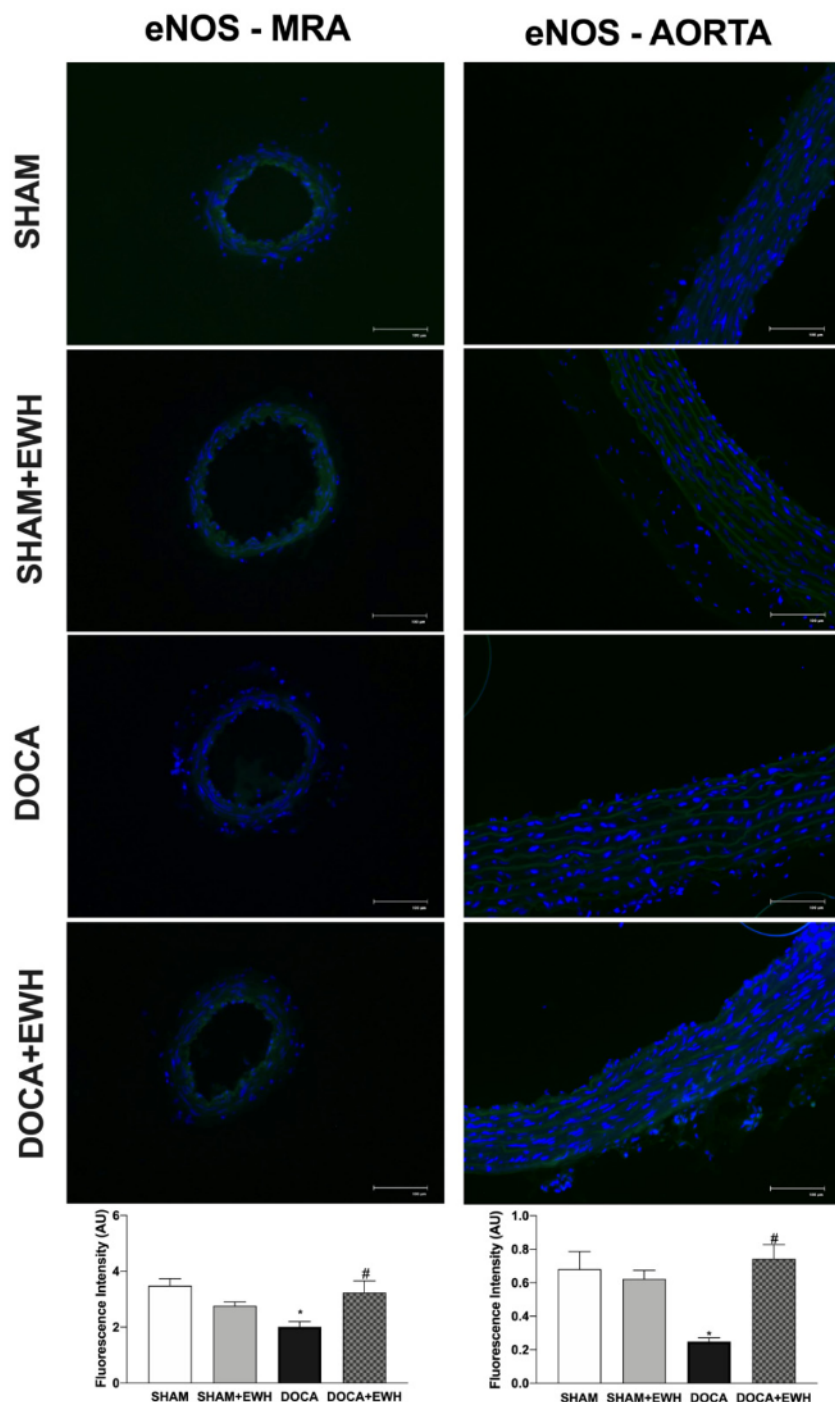


Figure 11. The role of EWH on endothelial NO synthase (eNOS) expression in MRA and aorta section of DOCA-salt rats. Representative photomicrographs ($\times 40$ magnification) and histogram of eNOS immunofluorescence of MRA (left panels) and aortic (right panels) sections of SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH arteries. Data are expressed as mean \pm SEM, $n = 8$. The images correspond to the merge of the marking of the colors by the DAPI in blue and the eNOS in green. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ * vs. SHAM; # vs. DOCA.

4. Discussion

Previously our group demonstrated that EWH has antihypertensive, vasorelaxant, antioxidant, and anti-inflammatory properties, observed in a genetic model of hypertension SHR and metals-induced hypertension [15,21–24]. In this work, for the first time, we show a significant antihypertensive effect of EWH in a model of severe hypertension induced by DOCA-salt treatment in uninephrectomized rats. The beneficial effects of EWH supplementation are associated with local (mitochondrial) and systemic antioxidant effects and anti-inflammatory action, through NF- κ B and TNF α inhibition, which improves NO bioavailability and endothelium-dependent relaxation in MRA and aorta.

The relationship between hypertension and redox imbalance has been demonstrated in experimental rodent models and human hypertension [7,10,33,34]. Diets with high antioxidant content may reduce blood pressure and cardiovascular complications. In contrast, some randomized clinical and population studies have shown disappointing results, in part associated with several specific points in the trial design or dosing regimens. However, the potential pro-oxidant activity of antioxidants is a phenomenon that should not be ignored [35]. Since antioxidant food compounds have different mechanisms of action, such as activation of antioxidant enzymes, chelation of metals, blocking of lipid peroxidation, or elimination of O₂⁻, therapeutic alternatives derived from them may be an additional tool for controlling severe hypertension [4,12]. In this sense, bioactive peptides released during food processing or after the digestion of food proteins, such as EWH, can exert different powerful biological activities [16,36]. Specifically, it is well known that peptides with antioxidant properties play a beneficial multifunctional role in the cardiovascular system and blood pressure control [4,37].

The DOCA-salt model is recognized for inducing hypertension to malignant levels and promoting vascular dysfunction, as observed in the animals in this study. Furthermore, this response was associated with an impaired synthesis or NO bioavailability and increased myogenic tone, endothelin-1 activation, ROS production by NADPH oxidase, cyclooxygenase-2, proinflammatory cytokines, NF- κ B activation, and macrophage infiltration [7,10,38,39]. In addition, our study found increased ROS at systemic, cellular, and mitochondrial levels, and NF- κ B and TNF α pro-inflammatory activation and reduced eNOS expression in MRA and aorta. Altogether, these results strengthen the pivotal role of vascular dysfunction in malignant hypertension and the end-organ damage observed in DOCA-salt rats. In addition, the results reinforced this model as an important model with which to study non-controlled and severe hypertension and revealed potential tools to reverse this condition.

Daily doses of EWH after the onset of DOCA-salt hypertension prevented the increase in SBP by 36% in this experimental model, as shown in Figure 2. The antihypertensive effect of EWH was previously demonstrated. EWH supplementation reduced and prevented the development of hypertension in SHR rats [14,15]. In addition, in animals exposed to toxic metals such as mercury and aluminum, EWH can reduce blood pressure to control levels. However, in this metal's exposure models, the blood pressure levels were within normal limits [21,23] or in stage 1 of hypertension [2,22]. Moreover, in rats exposed to high concentrations of cadmium, which showed hypertension at high levels, EWH also reversed high blood pressure levels towards those of the control animals [24]. An essential point on which those results differ from those observed in the present study is that in animals exposed to toxic metals, the treatment was performed as a preventive tool, during the development of hypertension. By contrast, in the present study, the treatment was performed as a therapeutic tool, when hypertension was established.

As we described above, hypertension in the DOCA-salt model impairs vasodilator responses [7,10,40–42], and these vascular effects are strongly related to systemic and locally promoted oxidative stress and inflammation [7,10,43]. However, until now, there have been no studies in this model evaluating the effect of dietary EWH supplementation on vascular damage. The direct vasorelaxant effect of EWH and its isolated bioactive peptides were previously described in conductance and resistance arteries [15,16,19,21–24]. Fujita

et al. (1995) isolated ovokinin peptide, whose amino acid sequence (Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu) was also identified in this EWH. Ovokinin showed a significant vasorelaxant response in the MRA of SHR rats [44]. Furthermore, other isolated peptide sequences (RADHPFL, RADHP, YRGGLEPINE, RDILNQ) of EWH also showed vasodilator properties in MRA, associated with increased NO synthesis, probably due to its amino acid composition and mainly due to the N-terminal position of Arg or Tyr [19]. In the present study, the improvement in ACh-induced endothelium-dependent relaxation in MRA and aorta of the DOCA-salt rats supplemented with EWH was due to the increase in endothelial function, as NO donor did not change its response among groups. The present results agree with previous results using models of exposure to different metals, in which the protective effect of EWH on the endothelium was observed in resistance and conductance vessels [21–24].

The bioavailability of NO is an important modulating factor of vascular vasodilator responses [7,45]. The present results demonstrated that the lower eNOS expression observed in MRA and aorta was restored towards the SHAM levels. In addition, using aorta segments as a model that represents the pivotal role of NO for endothelium-dependent relaxation, the present results also demonstrated that EWH supplementation in DOCA-salt rats recovered the NO-dependent participation in the ACh-induced relaxation, suggesting that EWH supplementation could improve NO bioavailability. Likewise, EWH restored the decreased NO levels in the arteries of rats exposed to mercury [23], and this effect was related to its capacity to increase NO release by enhancing eNOS activity [37]. Furthermore, the relaxation promoted by the RADHPFL, a peptide included in EWH, was endothelium-dependent and mediated by NO production via bradykinin B1 receptor activation [17]. In SHR rats treated with ovotransferrin-derived peptide, one of the main proteins present in raw egg white, NO levels were preserved in MRA [46].

NO bioavailability is the balance between NO synthesis and degradation. Thus, the restored endothelial function induced by EWH supplementation in MRA and aorta of DOCA-salt rats may be related to the antioxidant profile of EWH. This mechanism was confirmed in the present study by the reduction of oxidative stress (MDA and ROS) parameters in plasma and arteries, and by functional and immunohistochemical data. The antioxidant capacity of EWH and its bioactive peptides has been also previously described in models of genetic obesity [47] and metabolic syndrome [48]. In those studies, the antioxidant properties of EWH are related to some peptides, particularly by the Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu (YAEERYPIL) sequence, which has high radical scavenging activity.

An important source of O_2^- at the vascular level is the activation of the NADPH oxidase enzyme, related to the increase of NOX1 expression and activation [7,49–51]. In the present study, we observed that EWH was able to restore NOX-1 expression and O_2^- production in MRA and aorta of the DOCA-salt group. In line with these results, previously we reported that EWH also prevents the increase in ROS arising from the activation of NADPH oxidase and activation of NOX-1 and/or NOX-4 in animal exposure to heavy metals [21,22]. In the last two decades, the vital role of mitochondria in maintaining vascular homeostasis and ROS production has been highlighted [52,53]. In addition, mitochondrial O_2^- generation promoted vascular dysfunction in resistance and conductance arteries of the DOCA-salt model was described [8]. In part, that endothelial dysfunction is related to depletion of Sirt3 (a protein essential for mitochondrial health) and mitochondrial ROS generation [45]. In our study, MRA O_2^- generation was derived from two distinct sources, NADPH oxidase and mitochondria, and Mito-Tempo incubation and EWH supplementation restored the in situ and ex vivo mitochondrial ROS production observed in DOCA-Salt rats. Previously, EWH has described increasing mitochondrial DNA gene expression in brown fat tissue in a metabolic syndrome model [54]. However, the present study is the first that demonstrated EWH scavenging action on mitochondrial O_2^- generation in MRA; by this mechanism, EWH contributes to the restoration of endothelial function.

Another important mechanism related to excessive ROS production in the DOCA-salt model is the activation of transcription factors, which seems to be related to an inflammatory response and endothelial dysfunction [4,15,49]. Moreover, TNF α deficiency improved

endothelial function and cardiovascular injury in hypertension [55]. Our study also demonstrated that in MRA and aorta of DOCA-salt hypertensive rats, increased NF- κ B and TNF α expression by immunofluorescence and EWH supplementation restored the pro-inflammatory markers towards SHAM levels. In addition, we also observed the restoration of endothelial dysfunction in MRA of DOCA-salt rats by the blockage of NF- κ B activation and no additional effect in MRA of DOCA-salt rats supplemented with EWH. In vessels exposed to metals, the anti-inflammatory role of EWH was previously described and related to cyclooxygenase-2 inhibition [21–24]. In addition, EWH was effective in reducing the systemic plasma levels of TNF α in obese rats [20]. Thus, the present results also show that by its anti-inflammatory effect and inhibition of NF- κ B and TNF α expression, EWH may improve endothelial dysfunction in arteries of DOCA-salt rats.

5. Conclusions

The EWH supplementation in DOCA-salt rats, when the hypertension was stabilized, restored the mitochondrial and cellular ROS production, NF- κ B activation, and TNF α pro-inflammatory levels, improving the eNOS expression and endothelial function in MRA and aorta and reducing blood pressure levels. EWH could be used as a natural functional food ingredient or as an adjuvant supplement in the treatment of vascular dysfunction related to malignant hypertension.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox11091713/s1>, Figure S1: The role of EWH in NF- κ B-induced impairment on acetylcholine (ACh) relaxation in MRA of DOCA-salt rats; Figure S2: The role of EWH in NO-mediated acetylcholine (ACh)-induced relaxation in the aorta of DOCA-salt rats; Figure S3: NO production is recovered by EWH treatment in aortic sections of DOCA-salt rats.

Author Contributions: E.d.L.A.: Investigation, Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Visualization, Writing—original draft, review & editing. C.R.M.: Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing—original draft, review & editing. S.H.H.K.: Investigation, Formal analysis, Writing—review & editing. R.B.d.P.: Methodology, Writing—review & editing. C.T.H.: Investigation, Writing—review & editing. P.H.D.C.: Investigation, Writing—review & editing. F.M.P.: Conceptualization, Methodology, Validation, Writing—original draft, review & editing. D.V.V.: Resources, Funding acquisition, Writing—original draft, review & editing. L.V.R.: Conceptualization, Methodology, Validation, Writing—original draft, review & editing. M.M.-C.: Conceptualization, Methodology, Validation, Resources, Project administration, Funding acquisition, Writing—original draft, review & editing. G.A.W.: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Validation, Visualization, Data curation, Supervision, Project administration, Resources, Funding acquisition, Writing—original draft, review & editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development—CNPq [Edital Universal/CNPq No 44181/2014-9 and PQ/CNPq 311834/2020-5]; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul—FAPERGS/Brazil [PQG:19/2551-0001810-0]; Programa Nacional de Cooperação Acadêmica; Pró-reitoria de Pesquisa—Universidade Federal do Pampa [N. 20180615102630]; FAPES/CNPq/PRONEX [N. 80598773], Foundation for Research Support of the State of Sao Paulo (FAPESP 2019/08026-5), and Spanish Government by the Agencia Estatal de Investigación (AEI) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) [AGL2017-89213]; I-COOP+2020 (COOPA 20453). ELA were supported by CAPES/Brazil, CRM by FAPERGS/Brazil and PHD, CTH by Unipampa. LVR are research fellows from CNPq (312237/2021-9).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by National Council of Ethics with Animals (CONCEA) and National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH, 1996), and the Local Institution Animal Care and Use Committee (protocol number 003/2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the manuscript or supplementary material.

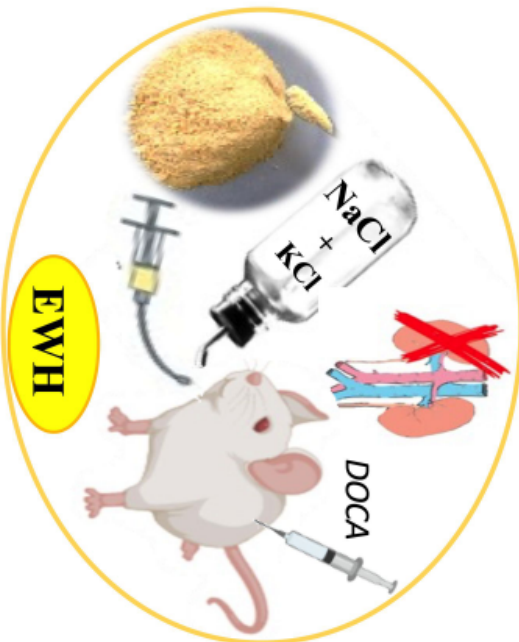
Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interest or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. Fatani, N.; Dixon, D.L.; van Tassell, B.W.; Fanikos, J.; Buckley, L.F. Systolic Blood Pressure Time in Target Range and Cardiovascular Outcomes in Patients with Hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2021**, *77*, 1290–1299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Whelton, P.K.; Carey, R.M.; Aronow, W.S.; Casey, D.E.; Collins, K.J.; Himmelfarb, C.D.; De Palma, S.M.; Gidding, S.; Jamerson, K.A.; Jones, D.W.; et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults a Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension* **2018**, *71*, e13–e115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Oparil, S.; Acelajado, M.C.; Bakris, G.L.; Berlowitz, D.R.; Cifková, R.; Dominiczak, A.F.; Grassi, G.; Jordan, J.; Poulter, N.R.; Rodgers, A.; et al. *Hypertension. Nature Reviews Disease Primers*; Nature Publishing Group: Berlin, Germany, 2018. [[CrossRef](#)]
4. Santos-Parker, J.R.; Strahler, T.R.; Bassett, C.J.; Bispham, N.Z.; Chonchol, M.B.; Seals, D.R. Curcumin Older Adults by Increasing Nitric Oxide Bioavailability and Reducing Oxidative Stress. *Aging* **2017**, *9*, 187–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Briones, A.M.; Touyz, R.M. Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. *Curr. Hypertens. Rep.* **2010**, *12*, 135–142. [[CrossRef](#)]
6. Prahalthan, P.; Kumar, S.; Raja, B. Morin Attenuates Blood Pressure and Oxidative Stress in Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertensive Rats: A Biochemical and Histopathological Evaluation. *Metab. Clin. Exp.* **2012**, *61*, 1087–1099. [[CrossRef](#)]
7. Wenceslau, C.F.; Rossoni, L.V. Rostafuroxin Ameliorates Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress in Resistance Arteries from Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertensive Rats: The Role of Na⁺K⁺-ATPase/CSRC Pathway. *J. Hypertens.* **2014**, *32*, 542–554. [[CrossRef](#)]
8. Viel, E.C.; Benkirane, K.; Javeshghani, D.; Touyz, R.M.; Schiffrin, E.L. Xanthine Oxidase and Mitochondria Contribute to Vascular Superoxide Anion Generation in DOCA-Salt Hypertensive Rats. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2008**, *295*, H281–H288. [[CrossRef](#)]
9. Dikalova, A.E.; Bikineyeva, A.T.; Budzyn, K.; Nazarewicz, R.R.; Lewis, W.; Harrison, D.G.; Dikalov, S.I. Therapeutic Targeting of Mitochondrial Superoxide in Hypertension. *Circ. Res.* **2011**, *107*, 106–116. [[CrossRef](#)]
10. Basting, T.; Lazartigues, E. DOCA-Salt Hypertension: An Update. *Curr. Hypertens. Rep.* **2017**, *19*, 32–42. [[CrossRef](#)]
11. Lerman, L.O.; Kurtz, T.W.; Touyz, R.M.; Ellison, D.H.; Chade, A.R.; Crowley, S.D.; Mattson, D.L.; Mullins, J.J.; Osborn, J.; Eirin, A.; et al. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Hypertension* **2019**, *73*, 87–120. [[CrossRef](#)]
12. Robles-Vera, I.; de la Visitación, N.; Toral, M.; Sánchez, M.; Romero, M.; Gómez-Guzmán, M.; Yang, T.; Izquierdo-García, J.L.; Guerra-Hernández, E.; Ruiz-Cabello, J.; et al. Probiotic Bifidobacterium Breve Prevents DOCA-Salt Hypertension. *FASEB J.* **2020**, *34*, 13626–13640. [[CrossRef](#)]
13. Dávalos, A.; Miguel, M.; Bartolomé, B.; López-Fandiño, R. Antioxidant Activity of Peptides Derived from Egg White Proteins by Enzymatic Hydrolysis. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 1939–1944. [[CrossRef](#)]
14. Miguel, M.; López-Fandiño, R.; Ramos, M.; Aleixandre, A. Short-Term Effect of Egg-White Hydrolysate Products on the Arterial Blood Pressure of Hypertensive Rats. *Br. J. Nutr.* **2005**, *94*, 731–737. [[CrossRef](#)]
15. Miguel, M.; López-Fandiño, R.; Ramos, M.; Aleixandre, A. Long-Term Intake of Egg White Hydrolysate Attenuates the Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2960–2966. [[CrossRef](#)]
16. Miguel, M.; Recio, I.; Gómez-Ruiz, J.A.; Ramos, M.; López-Fandiño, R. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptides Derived from Egg White Proteins by Enzymatic Hydrolysis. *J. Food Prot.* **2004**, *67*, 1914–1920. [[CrossRef](#)]
17. Miguel, M.; Alvarez, Y.; López-Fandiño, R.; Alonso, M.J.; Salices, M. Vasodilator Effects of Peptides Derived from Egg White Proteins. *Regul. Pept.* **2007**, *140*, 131–135. [[CrossRef](#)]
18. Miguel, M.; Manso, M.; Aleixandre, A.; Alonso, M.J.; Salices, M.; López-Fandiño, R. Vascular Effects, Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Activity, and Antihypertensive Properties of Peptides Derived from Egg White. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10615–10621. [[CrossRef](#)]
19. Garcia-Redondo, A.B.; Roque, F.R.; Miguel, M.; López-Fandiño, R.; Salices, M. Vascular Effects of Egg White-Derived Peptides in Resistance Arteries from Rats. Structure-Activity Relationships. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 1988–1993. [[CrossRef](#)]
20. Garcés-Rimón, M.; González, C.; Uranga, J.A.; López-Miranda, V.; López-Fandiño, R.; Miguel, M. Pepsin Egg White Hydrolysate Ameliorates Obesity-Related Oxidative Stress, Inflammation and Steatosis in Zucker Fatty Rats. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151193. [[CrossRef](#)]
21. Rizzetti, D.A.; Martín, Á.; Corrales, P.; Fernandez, F.; Simões, M.R.; Peçanha, F.M.; Vassallo, D.V.; Miguel, M.; Wiggers, G.A. Egg White-Derived Peptides Prevent Cardiovascular Disorders Induced by Mercury in Rats: Role of Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) and NADPH Oxidase. *Toxicol. Lett.* **2017**, *281*, 158–174. [[CrossRef](#)]
22. Martínez, C.S.; Piagette, J.T.; Escobar, A.G.; Martín, Á.; Palacios, R.; Peçanha, F.M.; Vassallo, D.V.; Exley, C.; Alonso, M.J.; Salices, M.; et al. Egg White Hydrolysate: A New Putative Agent to Prevent Vascular Dysfunction in Rats Following Long-Term Exposure to Aluminum. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *133*, 110799. [[CrossRef](#)]
23. Escobar, A.G.; Rizzetti, D.A.; Piagette, J.T.; Peçanha, F.M.; Vassallo, D.V.; Miguel, M.; Wiggers, G.A. Antioxidant Properties of Egg White Hydrolysate Prevent Mercury-Induced Vascular Damage in Resistance Arteries. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 595767. [[CrossRef](#)]

24. Moraes, P.Z.; Júnior, J.E.G.P.; Martinez, C.S.; Moro, C.R.; da Silva, G.C.; Rodriguez, M.D.; Simões, M.R.; Junior, F.B.; Peçanha, F.M.; Vassallo, D.V.; et al. Multi-Functional Egg White Hydrolysate Prevent Hypertension and Vascular Dysfunction Induced by Cadmium in Rats. *J. Funct. Foods* **2022**, *94*, 105131. [[CrossRef](#)]
25. Buñag, R.D. Validation in Awake Rats of a Tail-Cuff Method for Measuring Systolic Pressure. *J. Appl. Physiol.* **1973**, *34*, 279–282. [[CrossRef](#)]
26. Mulvany, M.J.; Halpern, W. Contractile Properties of Small Arterial Resistance Vessels in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats. *Circ. Res.* **1977**, *41*, 19–26. [[CrossRef](#)]
27. Nielsen, K.C.; Owman, C. Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res.* **1971**, *27*, 33–42. [[CrossRef](#)]
28. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351–358. [[CrossRef](#)]
29. Loetchutinat, C.; Kothan, S.; Dechsupa, S.; Meesungnoen, J.; Jay-Gerin, J.P.; Mankhetkorn, S. Spectrofluorometric Determination of Intracellular Levels of Reactive Oxygen Species in Drug-Sensitive and Drug-Resistant Cancer Cells Using the 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate Assay. *Radiat. Phys. Chem.* **2005**, *72*, 323–331. [[CrossRef](#)]
30. Benzie, I.; Strain, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Piech, A.; Dessy, C.; Havaux, X.; Feron, O.; Balligand, J.L. Differential Regulation of Nitric Oxide Synthases and Their Allosteric Regulators in Heart and Vessels of Hypertensive Rats. *Cardiovasc. Res.* **2003**, *57*, 456–467. [[CrossRef](#)]
32. Couto, G.K.; Britto, L.R.; Mill, J.G.; Rossoni, L.V. Enhanced nitric oxide bioavailability in coronary arteries prevents the onset of heart failure in rats with myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *86*, 110–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jiménez-Altayó, F.; Briones, A.M.; Giraldo, J.; Planas, A.M.; Salaices, M.; Vila, E. Increased Superoxide Anion Production by Interleukin-1 β Impairs Nitric Oxide-Mediated Relaxation in Resistance Arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *316*, 42–52. [[CrossRef](#)]
34. Harrison, D.G.; Gongora, M.C. Oxidative Stress and Hypertension. *Med. Clin. N. Am.* **2009**, *93*, 621–635. [[CrossRef](#)]
35. Sorriento, D.; De Luca, N.; Trimarco, B.; Iaccarino, G. The Antioxidant Therapy: New Insights in the Treatment of Hypertension. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 258. [[CrossRef](#)]
36. Lee, C.K.; Jin, S.H.; Won, K.J.; Jung, S.H.; Park, H.J.; Hwan, M.L.; Kim, J.; Young, S.P.; Kim, H.J.; Park, P.J.; et al. Diminished Expression of Dihydropteridine Reductase Is a Potent Biomarker for Hypertensive Vessels. *Proteomics* **2009**, *9*, 4851–4858. [[CrossRef](#)]
37. Moughan, P.J.; Rutherford, S.M.; Montoya, C.A.; Dave, L.A. Food-Derived Bioactive Peptides—A New Paradigm. *Nutr. Res. Rev.* **2014**, *27*, 16–20. [[CrossRef](#)]
38. Miguel, M.; Dalton, V.; Vassallo, G.A.W. Bioactive Peptides and Hydrolysates from Egg Proteins as a New Tool for Protection against Cardiovascular Problems. *Curr. Pharm. Des.* **2020**, *26*, 3676–3683. [[CrossRef](#)]
39. Pestana-Oliveira, N.; Nahey, D.; Johnson, T.; Collister, J. Development of the Deoxycorticosterone Acetate (DOCA)-Salt Hypertensive Rat Model. *Bio-Protocol* **2020**, *10*, e3708. [[CrossRef](#)]
40. Ghosh, M.; di Wang, H.; McNeill, J.R. Role of Oxidative Stress and Nitric Oxide in Regulation of Spontaneous Tone in aorta of DOCA-Salt Hypertensive Rats. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141*, 562–573. [[CrossRef](#)]
41. Han, S.; Bal, N.B.; Sadi, G.; Usanmaz, S.E.; Uludag, M.O.; Demirel-Yilmaz, E. The Effects of LXR Agonist GW3965 on Vascular Reactivity and Inflammation in Hypertensive Rat Aorta. *Life Sci.* **2018**, *213*, 287–293. [[CrossRef](#)]
42. Matin, N.; Pires, P.W.; Garver, H.; Jackson, W.F.; Dorrance, A.M. DOCA-Salt Hypertension Impairs Artery Function in Rat Middle Cerebral Artery and Parenchymal Arterioles. *Microcirculation* **2016**, *23*, 571–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Silva, G.C.; Silva, J.F.; Diniz, T.F.; Lemos, V.S.; Cortes, S.F. Endothelial Dysfunction in DOCA-Salt-Hypertensive Mice: Role of Neuronal Nitric Oxide Synthase-Derived Hydrogen Peroxide. *Clin. Sci.* **2016**, *130*, 895–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Fujita, H.; Usui, H.; Kurahashi, K.; Yoshikawa, M. Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides* **1995**, *16*, 785–790. [[CrossRef](#)]
45. Dikalova, A.E.; Pandey, A.; Xiao, L.; Arslanbaeva, L.; Sidorova, T.; Lopez, M.G.; Billings, F.T., 4th; Verdin, E.; Auwerx, J.; Harrison, D.G.; et al. Mitochondrial Deacetylase Sirt3 Reduces Vascular Dysfunction and Hypertension While Sirt3 Depletion in Essential Hypertension Is Linked to Vascular Inflammation and Oxidative Stress. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 439–452. [[CrossRef](#)]
46. Majumder, K.; Chakrabarti, S.; Morton, J.S.; Panahi, S.; Kaufman, S.; Davidge, S.T.; Wu, J. Egg-Derived Tri-Peptide IRW Exerts Antihypertensive Effects in Spontaneously Hypertensive Rats. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82829. [[CrossRef](#)]
47. Garcés-Rimón, M.; González, C.; Vera, G.; Uranga, J.A.; López-Fandiño, R.; López-Miranda, V.; Miguel, M. Pepsin Egg White Hydrolysate Improves Glucose Metabolism Complications Related to Metabolic Syndrome in Zucker Fatty Rats. *Nutrients* **2018**, *10*, 441. [[CrossRef](#)]
48. Moreno-Fernández, S.; Garcés-Rimón, M.; González, C.; Uranga, J.A.; López-Miranda, V.; Vera, G.; Miguel, M. Pepsin Egg White Hydrolysate Ameliorates Metabolic Syndrome in High-Fat/High-Dextrose Fed Rats. *Food Funct.* **2018**, *9*, 78–86. [[CrossRef](#)]
49. Jia, Z.; Aoyagi, T.; Yang, T. MPGES-1 Protects against DOCA-Salt Hypertension via Inhibition of Oxidative Stress or Stimulation of NO/CGMP. *Hypertension* **2010**, *55*, 539–546. [[CrossRef](#)]
50. Jiménez, R.; López-Sepúlveda, R.; Kadmiri, M.; Romero, M.; Vera, R.; Sánchez, M.; Vargas, F.; O'Valle, F.; Zarzuelo, A.; Dueñas, M.; et al. Polyphenols Restore Endothelial Function in DOCA-Salt Hypertension: Role of Endothelin-1 and NADPH Oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 462–473. [[CrossRef](#)]

51. Gómez-Guzmán, M.; Jiménez, R.; Sánchez, M.; Zarzuelo, M.J.; Galindo, P.; Quintela, A.M.; López-Sepúlveda, R.; Romero, M.; Tamargo, J.; Vargas, F.; et al. Epicatechin Lowers Blood Pressure, Restores Endothelial Function, and Decreases Oxidative Stress and Endothelin-1 and NADPH Oxidase Activity in DOCA-Salt Hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 70–79. [[CrossRef](#)]
52. Fujii, A.; Nakano, D.; Katsuragi, M.; Ohkita, M.; Takaoka, M.; Ohno, Y.; Matsumura, Y. Role of Gp91phox-Containing NADPH Oxidase in the Deoxycorticosterone Acetate-Salt-Induced Hypertension. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *552*, 131–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kirkman, D.L.; Robinson, A.T.; Rossmann, M.J.; Seals, D.R.; Edwards, D.G. Mitochondrial Contributions to Vascular Endothelial Dysfunction, Arterial Stiffness, and Cardiovascular Diseases. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2021**, *320*, 2080–2100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Moreno-Fernández, S.; Garcés-Rimón, M.; Uranga, J.A.; Astier, J.; Landrier, J.F.; Miguel, M. Expression Enhancement in Brown Adipose Tissue of Genes Related to Thermogenesis and Mitochondrial Dynamics after Administration of Pepsin Egg White Hydrolysate. *Food Funct.* **2018**, *9*, 6599–6607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Cai, R.; Hao, Y.; Liu, Y.Y.; Huang, L.; Yao, Y.; Zhou, M.S. Tumor Necrosis Factor Alpha Deficiency Improves Endothelial Function and Cardiovascular Injury in Deoxycorticosterone Acetate/Salt-Hypertensive Mice. *BioMed Res. Int.* **2020**, *2020*, 3921074. [[CrossRef](#)]

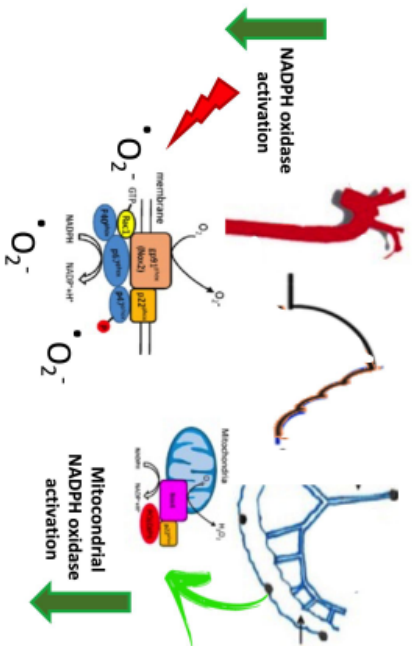
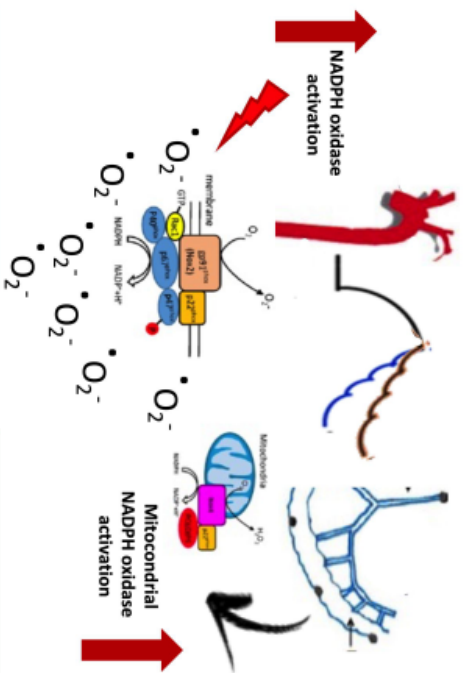


SEVERE HYPERTENSION

↑ SBP

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

RESTORE ENDOTHELIAL FUNCTION



↑ ROS
↑ Oxidative Stress

↓ NO
↓ eNOS

↓ ROS
↓ Oxidative Stress

↑ NO
↑ eNOS

↑ TNFα
↑ NF-κB

↓ TNFα
↓ NF-κB

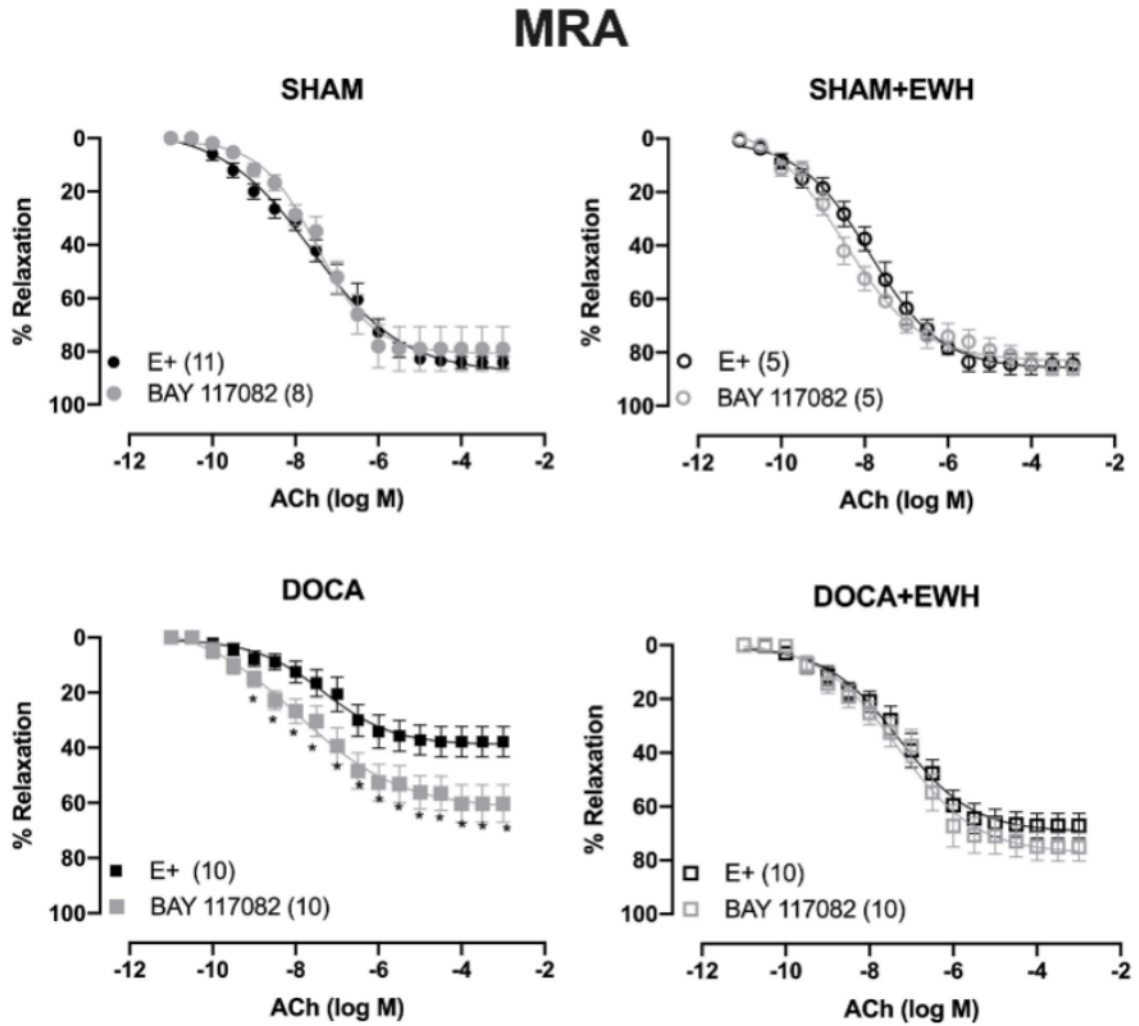


Figure S1. The role of EWH in NF- κ B-induced impairment on acetylcholine (ACh) relaxation in MRA of DOCA-salt rats. Concentration-response curves to ACh were obtained in MRA from rats from SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups before (E+) and after incubation with NF- κ B inhibitor (BAY 117082, 5 μ M). The results are expressed (mean \pm SEM) as the percentage of relaxation responses to norepinephrine precontracted rings. The number of animals in each group is in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ *vs.* E+.

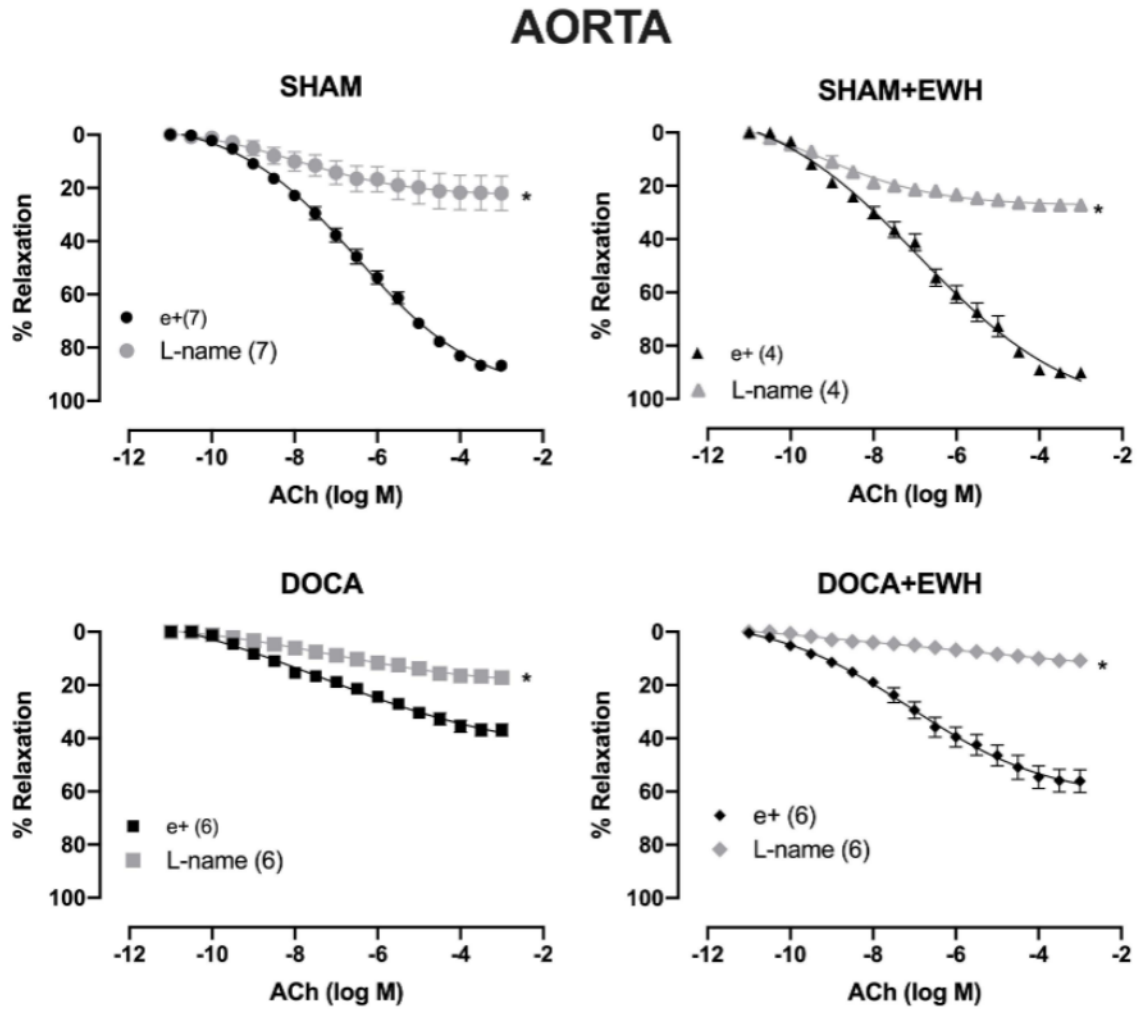


Figure S2. The role of EWH in NO-mediated acetylcholine (ACh)-induced relaxation in the aorta of DOCA-salt rats. Concentration-response curves to ACh were obtained in the aorta of rats from SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups before (E+) and after incubation with a non-selective inhibitor of NOS (L-NAME, 100 μ M). The results are expressed (mean \pm SEM) as the percentage of relaxation responses to phenylephrine precontracted rings. The number of animals in each group is in parentheses. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test: $p < 0.05$ *vs. E+.

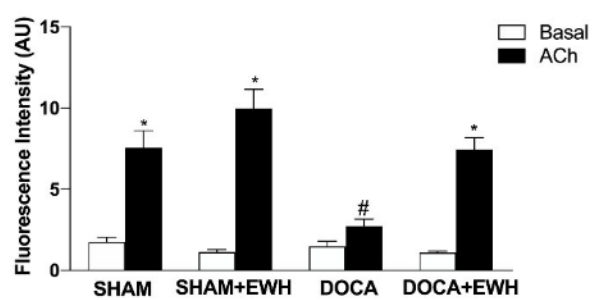
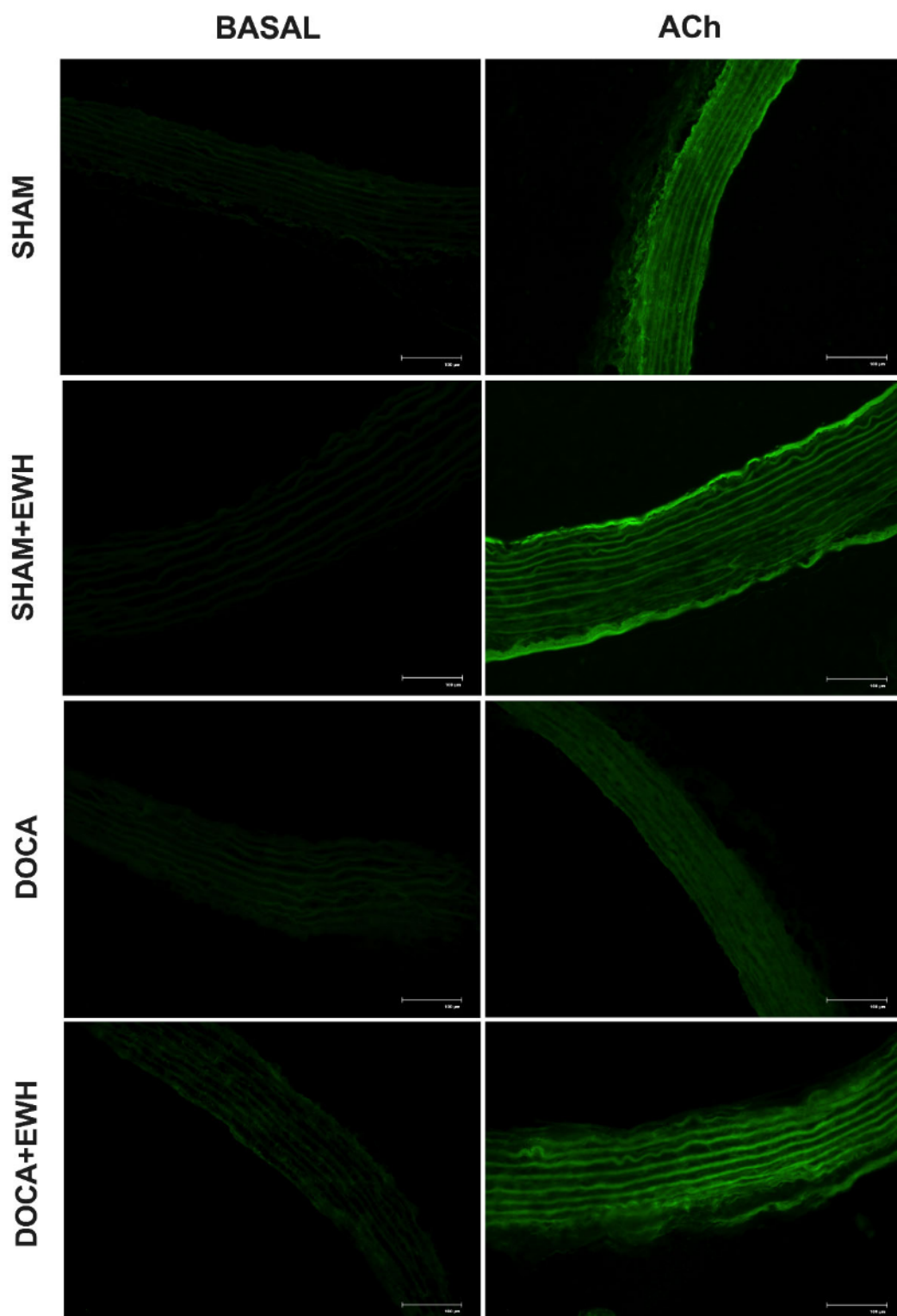


Figure S3: NO production is recovered by EWH treatment in aortic sections of DOCA-salt rats. Representative fluorographs of transverse sections of aorta loaded with DAF-2 in the absence (Basal, left panel) and presence of ACh (100 $\mu\text{mol/L}$, right panel) in SHAM, SHAM+EWH, DOCA, and DOCA+EWH groups. Bar graphs show the quantified NO production measured as DAF-2 fluorescence in sections of the aorta in basal condition (white bar) and after ACh stimulation (black bar). The values are presented as the mean \pm SEM. N=4. Significance was assessed with a two-way ANOVA: $p < 0.05$ *vs. basal condition, # vs. SHAM.

MANUSCRITO II

EGG WHITE HYDROLYSATE MODULATES THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IN MESENTERIC PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE IN DOCA-SALT HYPERTENSIVE RATS AND RESTORES ITS ANTICONTRACTILE ABILITY

Edina da Luz Abreu¹, Camila Rodrigues Moro¹, Jose Antonio Uranga-Ocio², Dalton Valentim Vassallo³, Luciana Venturini Rossoni^{4*}, Marta Miguel^{5*}, Giulia Alessandra Wiggers^{1*}

¹Cardiovascular Physiology Laboratory, Universidade Federal do Pampa, BR 472, Km 592, Urugaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Department of Ciencias Básicas de la Salud, High Performance Research Group in Physiopathology and Pharmacology of the Digestive System (NeuGut), University Rey Juan Carlos (URJC), Av. de Atenas s/n, 28032 Av. de Atenas s/n, 28032 Alcorcón, Spain.

³Cardiac Electromechanical and Vascular Reactivity Laboratory, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

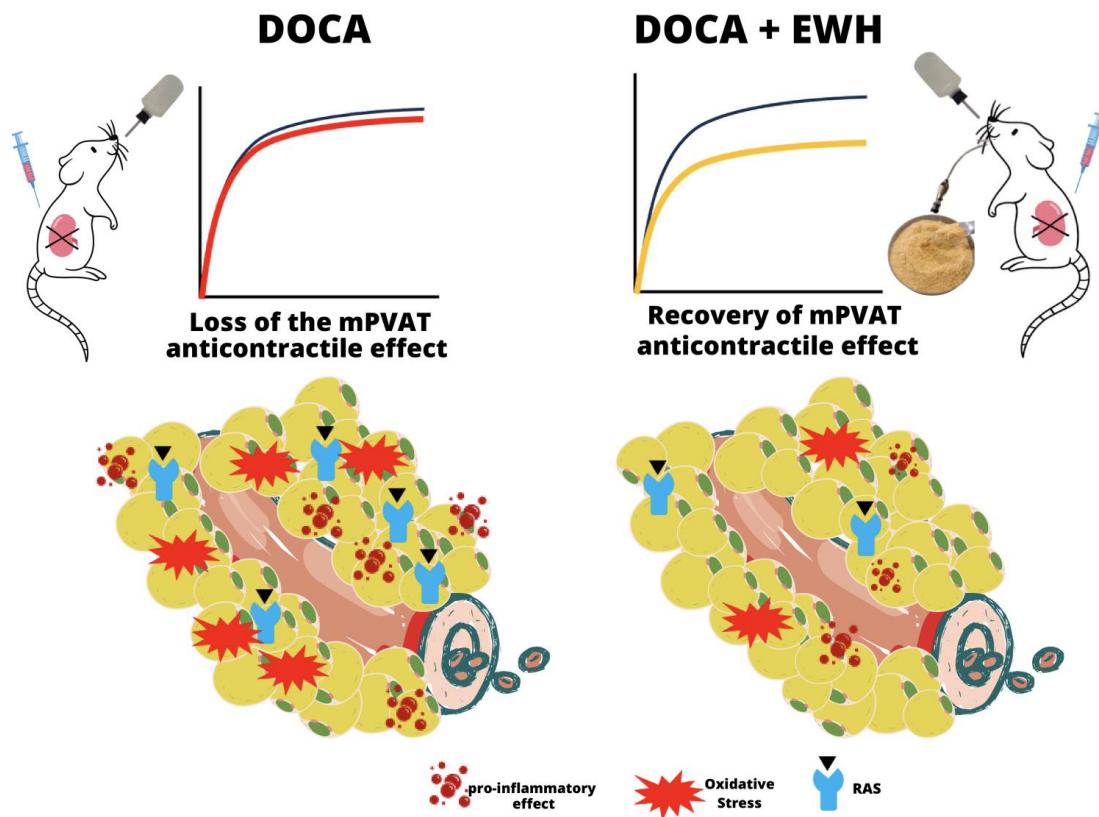
⁴Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, nº 2415, São Paulo, Brazil.

⁵Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM.), C/Nicolás Cabrera, 9, Campus Universitario de Cantoblanco, 280349, Madrid, Spain.

Corresponding Author: Giulia Alessandra Wiggers, Marta Miguel and Luciana Venturini Rossoni

Address: Cardiovascular Physiology Laboratory, Universidade Federal do Pampa, BR 472, Km 592, Urugaiana, Rio Grande do Sul, Brazil / Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, C/Nicolás Cabrera, 9, Campus Universitario de Cantoblanco, 280349, Madrid, Spain / Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, nº 2415, São Paulo, Brazil.

Graphical Abstract



Abstract

Background and Purpose. Perivascular adipose tissue (PVAT) regulates vascular tonus with an anticontractile effect, which may be dysfunctional in hypertension. Our group demonstrated that Egg White Hydrolysate (EWH), a therapeutic food, restores endothelium dysfunction and reduces blood pressure levels in malignant hypertension. We aimed to evaluate whether dietary supplementation with EWH interferes with the PVAT function in the mesenteric resistance arteries (MRA) of DOCA-salt hypertensive animals and the mechanisms involved. *Experimental Approach.* Male rats were divided into 4 groups and treated for 8 weeks. For four weeks, DOCA-salt or vehicle-treated rats (SHAM) were induced, and after that, the rats were co-treated with DOCA-salt or vehicle plus EWH (1g/kg/day) for 4 weeks more. MRA and/or their PVAT (*mPVAT*) were used for functional, molecular, and biochemical analysis. *Results.* The anticontractile effect of *mPVAT* in response to norepinephrine (NE) was observed in MRA rings with PVAT as compared to without PVAT of the SHAM group, while this effect was abolished in DOCA-salt rings. The EWH treatment did not change the anticontractile effect of *mPVAT* in SHAM and partially restored it in DOCA-salt rats. Acute aliskiren (1 $\mu\text{mol/L}$) incubation reduced NE-induced contraction only in MRA with PVAT of DOCA-salt rats. EWH prevents overactivation of the renin levels and ACE activity in *mPVAT* of DOCA-salt rats, while does not change AT1R and increases AT2R expression. In *mPVAT*, EWH blocked the highest MDA, ROS (by NADPH oxidase), and pro-inflammatory cytokines observed by DOCA-salt rats. *Conclusion and Implications.* EWH improved PVAT dysfunction in MRA of severe hypertension. This effect is mediated by an ameliorated redox balance, inflammatory state, and RAS axis.

Keywords: egg white hydrolysate, deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt; perivascular adipose tissue; renin-angiotensin system.

Bullet point summary:

- *DOCA-salt hypertension promotes loss of the anticontractile effect of mPVAT in resistance arteries;*
- *Bioactive peptides derived from dietary proteins modulate the mPVAT renin-angiotensin system;*
- *Functional foods prevent the mPVAT damage caused by DOCA-salt hypertension.*

1 Introduction

Egg White Hydrolysate (EWH) dietary supplementation has a beneficial effect linked to mitigating the detrimental endothelial and vascular injuries observed in obesity (Garcés-Rimón et al., 2016; 2019), exposure to heavy metals (Rizzetti et al., 2017; Martinez et al., 2019; Escobar et al., 2020; Moraes et al., 2022; Piagette et al., 2023) and hypertension (Miguel et al., 2005; 2006; 2007a; Moraes et al., 2022; Abreu et al., 2022). It is well known that EWH obtained by pepsin has antioxidant, anti-inflammatory, vasorelaxant, and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activities (Dávalos et al., 2004; Miguel et al., 2004; 2007a,b; García-Redondo et al., 2010). However, there is no data about the effect of EWH supplementation on the perivascular adipose tissue (PVAT) anticontractile function.

In the past years, the pivotal role of the PVAT, the 4th layer of the vessel, in the control of the vascular tonus was described (Soltis and Cassis, 1991; Lohn et al. 2002). Physiologically PVAT reduces smooth muscle cell contractility by the release of vasoactive factors, such as adiponectin, leptin, hydrogen peroxide, hydrogen sulfide, nitric oxide (NO), palmitic acid methyl ester, angiotensin 1-7, in conductance and resistance arteries in rodent models as well as humans (Lohn et al. 2002; Aghamohammadzadeh et al., 2013; Victorio et al., 2016; Araujo et al., 2015; Nobrega et al., 2019; Saxton et al., 2022; Ahmed et al., 2023). In addition, it is also possible to observe changes in noradrenaline uptake by PVAT, inducing a lower contractile response in smooth muscle cells (Soltis and Cassis, 1991; Ayala-Lopez and Watts, 2017; Saxton et al., 2019). Moreover, the reduction of anticontractile activity or the procontractile effect of PVAT was described in cardiometabolic diseases (Aghamohammadzadeh et al., 2013; Fontes et al., 2020; Victorio and Davel, 2020; Saxton et al., 2021; dos Reis et al., 2021; 2022; Ahmed et al. 2023).

In 2008, Galvez-Pietro et al. demonstrated for the first time a reduction in visceral periadventitial fat mass and function in mesenteric resistance arteries of SHR, which could be a causal factor for the development of hypertension. After this study, the literature describes a lot of PVAT adjustments in hypertension, such as local proinflammatory and prooxidant states, and reduced relaxing factors derived from adipocytes, such as leptin, hydrogen sulfide, and palmitic acid methyl ester (Lee et al., 2011; Gálvez-Prieto et al., 2012; Zou et al., 2016; Liu et al., 2020; Golas et al., 2022). In addition, changes in the function and phenotype of PVAT were also observed in

angiotensin II-induced hypertension and in the malignant deoxycorticosterone salt (DOCA-salt) hypertension model (Ruan et al., 2015; 2017; Pearson et al., 2023).

Although diagnosis and control of hypertension are complex, several drugs have been developed to treat this disease, but side effects are frequently associated with antihypertensive drug therapy (Pagliaro et al., 2016). For this reason, recent efforts have focused on functional dietary supplements as alternative therapies. In this sense, using functional foods as an adjuvant therapy could be helpful as a therapeutic strategy to minimize PVAT dysfunction associated with hypertension.

Therefore, regarding the role of PVAT on vascular tonus control and its dysfunction in hypertension, and the beneficial endothelial and blood pressure effects induced by EWH supplementation in cardiovascular disease, the purpose of this study was to investigate whether EWH dietary supplementation ameliorates the anticontractile effect of PVAT on resistance arteries of DOCA-salt hypertensive rats.

2 Methods

2.1 Egg White Hydrolysate Preparation

EWH was prepared from pasteurized egg white by enzymatic hydrolysis with pepsin for 8 h, as described by Garcés-Rimón et al. (2016). Briefly, the commercial pasteurized egg white was hydrolyzed for 8 hours with B.C. Pepsin BC 1:3000 (E.C. 3.4.23.1; from pork stomach, E:S: 2:100 w-w, pH 2.0, 38 °C), purchased from Biocatalysts (Cardiff, United Kingdom). After, hydrolysis, enzyme inactivation was achieved by increasing the pH to 7.0 with NaOH (5 N), the product was centrifuged at 2500× g for 15 min, and the supernatant was frozen and lyophilized until used. Then, for treatment, the product was resuspended in water and administered by gavage. The peptide profile and some of bioactive sequences previously identified in EWH (FRADHPFL, RADHPFL, YAEERYPIL, YRGGLEPINF, ESIINF, RDILNQ, IVF, YQIGL, SALAM) were checked in hydrolysates by reverse-phase liquid chromatography-mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS) (Miguel et al., 2004).

2.2 Animal and Experimental Design

Male Wistar rats (7 weeks old, 180–220 g) were obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Pelotas (Rio Grande do Sul, Brazil). Animals were housed under standard conditions (constant room temperature, humidity, and 12:12

h light-dark) with water and food *ad libitum* in the Federal University of Pampa vivarium. The experimental protocol followed the National Council of Ethics with Animals (CONCEA) and the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH, 1996). This work was approved by the local Institution Animal Care and Use Committee (protocol number 003/2020).

DOCA-salt hypertension model (DOCA) and sham-operated rats (SHAM) were induced as previously described (Wenceslau and Rossoni, 2014). In the last four weeks of the experimental period, the groups were divided into two subgroups treated or not with EWH, the animals SHAM/EWH and DOCA/EWH received EWH (1 g/kg/day, by gavage) and the control groups (SHAM and DOCA) received water by gavage (Abreu et al., 2022).

Systolic blood pressure (SBP) was measured weekly using a standard non-invasive tail-cuff plethysmography method (Pneumatic transducer, AD Instruments Pty Ltd., Bella Vista, NSW, Australia) in conscious, restrained rats (Abreu et al., 2022).

After 8 weeks, animals were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (87 mg/kg and 13 mg/kg, *i.p.*) and euthanized. The mesentery was carefully removed and immediately placed in ice Krebs-Henseleit Buffer (KHB - 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 11.1 glucose, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgSO₄·7H₂O, 1.2 KH₂PO₄, and 0.01 Na₂EDTA, pH 7.4). The third-order segment of the mesenteric resistance arteries (MRA) was dissected with PVAT preserved (PVAT+) or cleaned (PVAT-). Both samples were placed in an organ bath for vascular reactivity analysis or inserted in a freezing medium (OCT) and frozen at -80 °C for immunohistochemical analysis. In addition, the MRA PVAT (*m*PVAT) was dissected and frozen at -80 °C for biochemistry analysis.

2.3 Vascular Reactivity Experiments

PVAT+ and PVAT- MRA rings (artery length - 2 mm) were mounted in a wire myograph (Model 610M, DMT A/S, Aarhus NA, Denmark), equilibrated for 30 min (KHB, pH 7.4 at 37 °C) and normalized to passive force. To assess the viability, the rings were contracted with a high-potassium solution (KPSS-120 mmol/L). The maximum tension developed by KPSS, and the internal diameter of the vascular rings did not differ among groups regardless of PVAT (Supplementary Table 1).

After a period of rest (30 min), the cumulative concentration-response curve to NE (10 nmol/L–1 mmol/L) was performed to evaluate the anticontractile effect of PVAT. In some rings, the renin inhibitor aliskiren hemifumarate (1 µmol/L - Cat. n° SML 2077,

Sigma Aldrich) was added to the bath 30 min before to perform NE-induced concentration-response curve. The contraction response induced by NE was expressed as mN/mm.

2.4 Analysis of Oxidative Stress Biomarkers

To evaluate the oxidative stress biomarkers in *mPVAT*, the tissue was homogenized in Tris-HCl (50 mmol/L, pH 7.4), centrifuged at 2500× g for 10 min at 4°C, and the supernatant fraction was used.

Lipid Peroxidation was determined as malondialdehyde levels (MDA) using the colorimetric method (Ohkawa et al., 1979). The fluorescent complex generated was measured against blanks at 532 nm (SpectraMax M5 Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The results were expressed as nmol MDA/g tissue.

The levels of reactive oxygen species (ROS) were determined using the spectrofluorometric method (Loetchutinat et al., 2005). The levels of ROS are based on fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) formed by the hydrolysis of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) added to the medium measured at 520 nm emission with 480 nm excitation (SpectraMax M5 Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The Δ value at 45 minutes was used. ROS levels were expressed as arbitrary fluorescent units (FU).

The total antioxidant capacity (FRAP) was measured by assay according to Benzie & Strain (1996). The total antioxidant capacity is based on ferric chloride reduction, whose absorbance was read at 593 nm (SpectraMax M5 Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Data were expressed in mM Trolox equivalents.

2.5 Immunohistochemistry Analysis

Immunohistochemistry (IHC) was investigated in the slices of MRA plus PVAT using the following antibodies: CD163 (1:750, Cat. n° MCA 342GA, Bio RAD), AT2R (1:300), AT1R (1:100), TNF- α (1:150), Renin (1:200) and NOX-1 (1:500): [Cat. n° A3654; Cat. n° A19650; Cat. n° A11534; Cat. n° A1585 and Cat. n° A11966, ABclonal, respectively]. IHC analyses were performed using 5 μ m sections of formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue blocks. Antigen retrieval was done by heating the slides in 10 mmol/L citrate buffer for 30 min at 95 °C. Thereafter, sections were incubated for 10 min in 3% (vol/vol) in hydrogen peroxide to inhibit endogenous peroxidase activity and blocked with normal horse serum (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Burlingame,

CA, USA for 20 min. After endogenous peroxidase-blocking were permeabilized with PBS phosphate-buffered saline (PBS) with 0.05% Tween 20 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) for 30 minutes at room temperature. Primary antibodies were diluted in PBS plus Tween 20 and were incubated at 4°C overnight. The peroxidase kit ImmPRESS® HRP Universal (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Burlingame, CA, USA; horse anti-rabbit IgG plus polymer kit or horse anti-mouse IgG PLUS polymer kit) was used as a secondary antibody. The HRP colorimetric substrate TMB (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Burlingame, CA, USA) was used for visualization. Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted. IHC-stained slides were visualized and scanned on a Leica (Germany) DFC 7000 T microscope at 20 X magnification. The quantified was made using Image J Fiji software version 2.1.0/1.53c.

2.6 Interleukin-6 and 1-β levels

The levels of interleukins IL-6 and IL-1 β in MRA plus PVAT were measured using the kit to analyze IL-6 (Cat. n° RAB 0312, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) and IL-1β (Cat n° RAB 0278, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed in pg/mL.

2.7 Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Activity

The ACE activity was measured in *m*PVAT by the fluorometric method using an assay kit (Cat. n° CS0002, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil). The assay is based on the cleavage of a synthetic fluorogenic peptide at 37 °C. The measured fluorescence is directly proportional to the ACE activity with 320 nm excitation and 405 nm emission. The results were expressed in nmol/min per g tissue.

2.8 Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). We applied the ROUT method to identify and remove outliers, followed by a Shapiro-Wilk test to check the normality of the population data. After that, results were analyzed using three- or two-way ANOVA followed by a *post hoc* Bonferroni test (GraphPad Prism 8 software, San Diego, CA, USA). We considered $p < 0.05$ as statistically significant.

3 Results

As previously published by our group (Wenceslau and Rossoni, 2014; Abreu et al., 2022), since the first week of DOCA-salt treatment, the animals showed a significant increase in SBP compared to SHAM, and after the 4th week of treatment, the elevated SBP levels stabilized in this group (Supplementary Figure 1). In addition, as demonstrated by Abreu et al. (2022), the SBP levels were reduced in DOCA-salt rats supplemented with EWH (DOCA/EWH group), but not normalized to SHAM levels (Supplementary Figure).

3.1 Effect of EWH on the anticontractile action of PVAT in MRA of DOCA-salt rats

The contraction induced by NE was lower in the PVAT+ MRA rings of SHAM and SHAM/EWH groups compared to their PVAT- MRA rings (Figure 1A, C). These results reinforce the anticontractile effect of *m*PVAT of the SHAM group and show that EWH dietary supplementation does not change this effect. Nevertheless, in MRA rings of DOCA-salt rats, the anticontractile effect of *m*PVAT was abolished (Figure 1B, C). Notably, in MRA rings of the DOCA/EWH group, the anticontractile capacity of *m*PVAT was observed (Figure 1B, C). These results suggest that EWH was able to ameliorate the impaired anticontractile effect of *m*PVAT in MRA of DOCA-salt hypertensive rats.

In MRA rings without or with PVAT, we observed an increase in the maximal response to NE in the DOCA compared to the SHAM group (Figure 1C), without changes in the sensitivity to NE (Figure 1D).

To analyze the involvement of RAS in the impaired anticontractile effect of *m*PVAT in DOCA-salt rats and the beneficial effect of EWH dietary supplementation, PVAT+ MRA were pre-incubated, for 30 min, with aliskiren. In PVAT+ MRA, aliskiren significantly reduced NE-induced contraction only in rings of the DOCA group (Figure 2C). Indicating the participation of renin/prorenin receptor in the impaired anticontractile effect of *m*PVAT in DOCA-salt rats. In addition, there are no changes in NE response in the presence of aliskiren in PVAT+ MRA of SHAM (Figure 2A), SHAM/EWH (Figure 2B), or DOCA/EWH (Figure 2D) groups.

3.2 Immunohistochemical evaluation of RAS components in PVAT of MRA.

Renin levels (Figure 3A) and ACE activity (Figure 3D) were higher in the *m*PVAT of DOCA-salt than in the SHAM rats, while EWH supplementation restored both parameters towards the SHAM levels. Neither hypertension nor EWH changed AT1R expression in *m*PVAT (Figure 3B). However, AT2R expression was higher in the

mPVAT of the DOCA group as compared to SHAM, and the DOCA/EWH promoted an additional enhancement in the expression (Figure 3C). EWH dietary supplementation did not change these parameters in the SHAM group (Figure 3).

3.3 Immunohistochemical evaluation of the pro-oxidant and pro-inflammatory factors in mPVAT

The higher NOX-1, CD163, TNF- α , IL-6, and IL-1 β levels observed in *mPVAT* of the DOCA-salt rats were reduced by the EWH supplementation (Figure 4). EWH dietary supplementation did not change these levels in the SHAM group (Figure 4).

3.4 Parameters of oxidative stress in mPVAT

mPVAT of the DOCA group presented an increment in MDA and ROS levels compared to the SHAM, and DOCA/EWH significantly reduced these levels (Figure 5A, B). Moreover, the total antioxidant capacity (FRAP) was increased in the *mPVAT* of the DOCA group when compared to SHAM, and DOCA/EWH restored the antioxidant capacity to SHAM levels (Figure 5C).

4 Discussion

Recently, our group demonstrated that EWH supplementation significantly reduced blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats, as reinforced in the present study, as well as improved endothelium-dependent vasodilation through its antioxidant and anti-inflammatory action in conductance and resistance arteries (Abreu et al., 2022). The present results add a new piece to this scenario, demonstrating for the first time that EWH dietary supplementation in resistance arteries of DOCA-salt rats was able to ameliorate the impaired anticontractile effect of *mPVAT*. This effect was associated with an inhibition of local RAS, associated with an anti-inflammatory and antioxidative effect of EWH.

As described in the introduction section, the phenotype and anticontractile function of PVAT are reduced or reverted to procontractile function in cardiometabolic diseases, such as hypertension (Aghamohammadzadeh et al., 2013; Saxton et al., 2021; Fontes et al., 2020; Victorio and Davel, 2020; dos Reis et al., 2021; 2022; Ahmed et al. 2023). In the present study, for the first time, we demonstrated an abolishment of the anticontractile effect of *mPVAT* in response to noradrenaline in MRA of DOCA-salt rats.

In the DOCA-salt hypertension model, the PVAT is less studied and there is no data about the role of PVAT in response to agonist-induced contraction. However, the present results agree with the literature, where PVAT was described as dysfunctional in response to several agonists-induced contractions in other hypertensive models (Gálvez-Prieto et al., 2008; 2012; Lee et al., 2011; Liu et al., 2020; Golas et al., 2022; Pearson et al., 2023).

Interestingly, the EWH dietary supplementation was able to ameliorate the anticontractile function of *m*PVAT in MRA of DOCA-salt rats but did not restore this response to SHAM levels. In addition, the *m*PVAT anticontractile response was not modified by EWH supplementation in SHAM animals. This point is very interesting, because, like other studies, EWH did not interfere with the vessel reactivity in healthy animals but ameliorated the vascular and endothelial dysfunction in pathological conditions (Rizzetti et al., 2017; Martinez et al., 2019a; Escobar et al., 2020; Moraes et al., 2022; Piagette et al., 2023). To our knowledge, the present work is the first one to study the beneficial effect of EWH on PVAT function.

Previously, our group demonstrated that EWH *in vitro* has ACE inhibitory activity (Miguel et al., 2004). At physiological conditions, RAS components are expressed in the PVAT of the aorta and MRA (Cassis et al., 1988; Gálvez-Pietro et al., 2008; Cassis et al., 2008; Fontes et al., 2020); and angiotensin 1-7 is considered one putative vasodilator factor that is released from PVAT (Nobrega et al., 2019; Barp et al., 2021). Reinforce these results, in the present manuscript, using immunohistochemistry assay, we detect renin, AT1R, and AT2R expression in *m*PVAT of Wistar rats. Our results also demonstrated ACE activity in *m*PVAT at the physiological level. Furthermore, angiotensin I and angiotensin II levels were detected in *m*PVAT (Gálvez-Pietro et al., 2008). On the other hand, PVAT dysfunction involves changes in the release of vasodilator factors, as well as alterations in RAS signaling, with an increment in angiotensin II action (Cassis et al., 2008; Sakaue et al., 2017; Fontes et al., 2020; Victorio and Davel, 2020; Barp et al., 2021; dos Reis et al., 2021; 2022). However, the specific role of the RAS in *m*PVAT of DOCA-salt rats remains to be elucidated.

Our results demonstrate a higher expression of renin and AT2R in *m*PVAT of DOCA-salt hypertensive than normotensive rats, while no changes in AT1R levels were detected. In addition, an increment in ACE activity was observed in the *m*PVAT of this hypertensive model. The blockade of (pro) renin receptor with aliskiren reduced noradrenaline-induced contraction only in PVAT+ MRA of DOCA-salt rats, suggesting that the activation of this pathway in *m*PVAT of DOCA-salt rats is involved in PVAT

dysfunction. However, we do not perform experiments analyzing whether AT1R or AT2R are also involved in the reduced anticontractile effect of PVAT in DOCA-salt rats. It is well known that alterations in angiotensin II/AT1R or AT2R signaling are involved in PVAT dysfunction in cardiometabolic diseases (Cassis et al., 2008; Sakaue et al., 2017; Fontes et al., 2020; Barp et al., 2021; dos Reis et al., 2021; 2022). In addition, we cannot define the angiotensin II/AT2R axis as a protective pathway in PVAT of cardiovascular diseases. In heart failure, for example, the activation of AT2R induces a procontractile function in aortic rings with PVAT, in the same way as the AT1R activation (Fontes et al., 2020). Thus, with our results, it is impossible to conclude if the enhancement in AT2R in *mPVAT* of DOCA-salt animals is an adjustment to reduce the PVAT dysfunction or an additional mechanism to induce it. This is a limitation of our study and further studies need to be performed to answer this point.

In the present study, we also analyzed whether EWH dietary supplementation could improve the anticontractile effect of *mPVAT* through its RAS inhibitory activity. It is well known that ACE activity was inhibited in the aorta and kidney of SHR supplemented with EWH (Miguel et al., 2007). In addition, systemic and local ACE inhibition was also found in the aorta and MRA of metal-exposure animals (Rizzetti et al., 2017; Moraes et al., 2022). In line with those results, EWH was able to restore the higher renin expression and ACE activity in *mPVAT* of DOCA-salt rats to SHAM levels; and aliskiren did not modify noradrenaline-induced contraction in PVAT+ MRA of DOCA-salt/ EWH group. Remarkably, an additional increment in AT2R levels in *mPVAT* of DOCA-salt supplemented with EWH was observed. Taken together, these results reinforce the role of EWH as a RAS inhibitor in *mPVAT* of DOCA-salt hypertensive animals.

EWH, curcumin, and other food protein-derived peptides showed a beneficial effect on endothelial function mediated by increased NO bioavailability, reduced oxidative stress, and anti-inflammatory activity in human and rodent models (Majumder et al., 2013; García-Tejedor et al., 2017; Santos-Parker et al., 2017; Abreu et al., 2022). In line with those results on endothelial cells, in the *mPVAT* of DOCA-salt hypertensive rats, EWH restores oxidative stress, NOX-1 levels, and pro-inflammatory status. Interestingly, in the present study, we demonstrated that antioxidant capacity is enhanced in *mPVAT* of DOCA-salt rats. In addition, EWH supplementation restores the *mPVAT* antioxidant capacity towards SHAM levels, as well as oxidative stress. Altogether these results suggest a counterregulatory mechanism against oxidative stress in *mPVAT* of

DOCA-salt rats, which was restored by EWH supplementation through its antioxidant activity. The present data agrees with our previous results showing that EWH supplementation in heavy metals exposure rats prevented the activation of NADPH oxidase and improved the activity of the antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), restoring the oxidative status (Rizzetti et al., 2017; Martinez et al., 2019; Moraes et al., 2022).

The progression of hypertension is also related to immune responses in adipose tissue and is correlated with inflammation (De Marco et al., 2014; Nosalski and Guzik, 2017; Nosalski et al., 2020). In addition, it has been demonstrated that complement-mediated macrophage polarization in *mPVAT* of DOCA-salt mice, shifts macrophage polarization to M1 (pro-inflammatory) and is associated with vascular and adventitial remodeling (Ruan et al., 2015). Those authors observed an interplay between macrophages and adipocytes in PVAT facilitated by complement-mediated macrophage activation and inflammatory factor secretion to induce lower adiponectin mRNA and expression by stimulating macrophage-derived TNF- α (Ruan et al., 2017). In our study, expression of CD163⁺ cells, TNF- α , and levels of interleukins IL-6 and IL-1 β in *mPVAT* was increased in DOCA-salt rats, and significantly reduced EWH by treatment, evidencing the anti-inflammatory capacity of this functional food. In line with the present results obtained in *mPVAT*, it is important to highlight an important anti-inflammatory capability of EWH at the systemic and local levels (Garcés-Rimón et al., 2016).

In conclusion, our results suggest that EWH dietary supplementation blocked the RAS activation in the *mPVAT* and ameliorated its anticontractile function in the MRA of DOCA-salt rats. EWH also suppressed TNF- α and interleukin levels, as well as oxidative stress in *mPVAT* of DOCA-salt rats, acting as an antioxidant and anti-inflammatory dietary food. Our results suggest that targeting these signaling pathways EWH may protect *mPVAT* against hypertension-related vascular disease and could be an adjuvant food to mitigate cardiovascular risk in the malignant hypertensive.

Author Contributions: E.d.L.A.: Investigation, Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Visualization, Writing—original draft, review & editing. C.R.M.: Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing—original draft, review & editing. J.A.U.O.: Conceptualization, Methodology, Validation, Writing—original draft, review & editing. D.V.V.: Resources, Funding acquisition, Writing—original draft, review & editing. L.V.R.: Conceptualization, Methodology, Validation, Writing—original draft, review & editing. M.M.-C.: Conceptualization, Methodology, Validation, Resources, Project administration, Funding acquisition, Writing—original draft, review & editing.

G.A.W.: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Validation, Visualization, Data curation, Supervision, Project administration, Resources, Funding acquisition, Writing—original draft, review & editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development—CNPq [Edital Universal/CNPq No 44181/2014-9 and PQ/CNPq 311834/2020-5]; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES); Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul—FAPERGS/Brazil [PQG:19/2551-0001810-0]; Programa Nacional de Cooperação Acadêmica; Pró-reitoria de Pesquisa—Universidade Federal do Pampa [N. 20180615102630]; FAPES/CNPq/PRONEX [N. 80598773], Foundation for Research Support of the State of Sao Paulo (FAPESP 2019/08026-5), and Spanish Government by the Agencia Estatal de Investigación (AEI) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) [AGL2017-89213]; I-COOP+2020 (COOPA 20453). ELA were supported by CAPES/Brazil, and CRM by FAPERGS/Brazil. LVR is a research fellow from CNPq (312237/2021-9).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the National Council of Ethics with Animals (CONCEA) and National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH, 1996), and the Local Institution Animal Care and Use Committee (protocol number 003/2020). Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the manuscript or supplementary material.

Conflicts of 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

1. Abreu, E. D. L., Rodrigues Moro, C., Hassan Husein Kanaan, S., de Paula, R. B., Herrera, C. T., Costa, P. H. D., Peçanha, F. M., Vassallo, D. V., Rossoni, L. V., Miguel-Castro, M., & Wiggers, G. A. (2022). ROS Suppression by Egg White Hydrolysate in DOCA-Salt Rats-An Alternative Tool against Vascular Dysfunction in Severe Hypertension. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(9), 1713. <https://doi.org/10.3390/antiox110917134>
2. Aghamohammadzadeh, R., Greenstein, A. S., Yadav, R., Jeziorska, M., Hama, S., Soltani, F., Pemberton, P. W., Ammori, B., Malik, R. A., Soran, H., & Heagerty, A. M. (2013). Effects of bariatric surgery on human small artery function: evidence for reduction in perivascular adipocyte inflammation, and the restoration of normal anticontractile activity despite persistent obesity. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(2), 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.04.027>
3. Ahmed, A., Bibi, A., Valoti, M., & Fusi, F. (2023). Perivascular Adipose Tissue and Vascular Smooth Muscle Tone: Friends or Foes?. *Cells*, 12(8), 1196. <https://doi.org/10.3390/cells12081196>
4. Araujo, H. N., Valgas da Silva, C. P., Sponton, A. C., Clerici, S. P., Davel, A. P., Antunes, E., ZanESCO, A., & Delbin, M. A. (2015). Perivascular adipose tissue and vascular responses in healthy trained rats. *Life sciences*, 125, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.032>
5. Ayala-Lopez, N., & Watts, S. W. (2017). New actions of an old friend: perivascular adipose tissue's adrenergic mechanisms. *British journal of pharmacology*, 174(20), 3454–3465. <https://doi.org/10.1111/bph.13663>
6. Barp, C. G., Bonaventura, D., & Assreuy, J. (2021). NO, ROS, RAS, and PVAT: More Than a Soup of Letters. *Frontiers in physiology*, 12, 640021. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.640021>
7. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
8. Cassis, L. A., Lynch, K. R., & Peach, M. J. (1988). Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta. *Circulation research*, 62(6), 1259–1262. <https://doi.org/10.1161/01.res.62.6.1259>
9. Cassis, L. A., Police, S. B., Yiannikouris, F., & Thatcher, S. E. (2008). Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Current hypertension reports*, 10(2), 93–98. <https://doi.org/10.1007/s11906-008-0019-9>
10. Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., & López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of food protection*, 67(9), 1939–1944. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.9.1939>
11. Dos Reis Costa, D. E. F., Silveira, A. L. M., Campos, G. P., Nóbrega, N. R. C., de Araújo, N. F., de Figueiredo Borges, L., Dos Santos Aggum Capettini, L., Ferreira, A. V. M., & Bonaventura, D. (2021). High-Carbohydrate Diet Enhanced the Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue Through Activation of Renin-Angiotensin System. *Frontiers in physiology*, 11, 628101. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.628101>

12. Dos Reis Costa, D. E. F., de Araújo, N. F., Nóbrega, N. R. C., de Assis Rabelo Ribeiro, N., de Oliveira, A. C. C., Dos Santos Aggum Capettini, L., Ferreira, A. V. M., & Bonaventura, D. (2022). Contribution of RAS, ROS and COX-1-derived prostanoids to the contractile profile of perivascular adipose tissue in cafeteria diet-induced obesity. *Life sciences*, 309, 120994. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120994>
13. Escobar, A. G., Rizzetti, D. A., Piagette, J. T., Peçanha, F. M., Vassallo, D. V., Miguel, M., & Wiggers, G. A. (2020). Antioxidant Properties of Egg White Hydrolysate Prevent Mercury-Induced Vascular Damage in Resistance Arteries. *Frontiers in physiology*, 11, 595767. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.595767>
14. Fontes, M. T., Paula, S. M., Lino, C. A., Senger, N., Couto, G. K., Barreto-Chaves, M. L. M., Mill, J. G., & Rossoni, L. V. (2020). Renin-angiotensin system overactivation in perivascular adipose tissue contributes to vascular dysfunction in heart failure. *Clinical science (London, England : 1979)*, 134(23), 3195–3211. <https://doi.org/10.1042/CS20201099>
15. Gálvez-Prieto, B., Bolbrinker, J., Stucchi, P., de Las Heras, A. I., Merino, B., Arribas, S., Ruiz-Gayo, M., Huber, M., Wehland, M., Kreutz, R., & Fernandez-Alfonso, M. S. (2008). Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *The Journal of endocrinology*, 197(1), 55–64. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0284>
16. Gálvez-Prieto, B., Somoza, B., Gil-Ortega, M., García-Prieto, C. F., de Las Heras, A. I., González, M. C., Arribas, S., Aranguez, I., Bolbrinker, J., Kreutz, R., Ruiz-Gayo, M., & Fernández-Alfonso, M. S. (2012). Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue and Leptin are Reduced in Hypertension. *Frontiers in pharmacology*, 3, 103. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00103>
17. Garcés-Rimón, M., González, C., Uranga, J. A., López-Miranda, V., López-Fandiño, R., & Miguel, M. (2016). Pepsin Egg White Hydrolysate Ameliorates Obesity-Related Oxidative Stress, Inflammation and Steatosis in Zucker Fatty Rats. *PloS one*, 11(3), e0151193. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151193>
18. Garcés-Rimón, M., González, C., Hernanz, R., Herradón, E., Martín, A., Palacios, R., Alonso, M. J., Uranga, J. A., López-Miranda, V., & Miguel, M. (2019). Egg white hydrolysates improve vascular damage in obese Zucker rats by its antioxidant properties. *Journal of food biochemistry*, 43(12), e13062. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13062>
19. Garcia-Redondo, A. B., Roque, F. R., Miguel, M., López-Fandiño, R., & Salices, M. (2010). Vascular effects of egg white-derived peptides in resistance arteries from rats. Structure-activity relationships. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(12), 1988–1993. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4037>
20. García-Tejedor, A., Manzanares, P., Castelló-Ruiz, M., Moscardó, A., Marcos, J. F., & Salom, J. B. (2017). Vasoactive properties of antihypertensive lactoferrin-derived peptides in resistance vessels: Effects in small mesenteric arteries from SHR rats. *Life sciences*, 186, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.07.036>
21. Golas, S., Berenyiova, A., Majzunova, M., Drobna, M., Tuorkey, M. J., & Cacanyiova, S. (2022). The Vasoactive Effect of Perivascular Adipose Tissue and Hydrogen Sulfide in Thoracic Aortas of Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *Biomolecules*, 12(3), 457. <https://doi.org/10.3390/biom12030457>
22. Lee, Y. C., Chang, H. H., Chiang, C. L., Liu, C. H., Yeh, J. I., Chen, M. F., Chen, P. Y., Kuo, J. S., & Lee, T. J. (2011). Role of perivascular adipose tissue-derived

- methyl palmitate in vascular tone regulation and pathogenesis of hypertension. *Circulation*, 124(10), 1160–1171. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.027375>
23. Liu, C. H., Hsu, H. J., Tseng, T. L., Lin, T. J., Weng, W. H., Chen, M. F., & Lee, T. J. (2020). COMT-Catalyzed Palmitic Acid Methyl Ester Biosynthesis in Perivascular Adipose Tissue and its Potential Role Against Hypertension. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 373(2), 175–183. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.263517>
 24. Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J. P., & Mankhetkorn, S. Spectrofluorometric Determination of Intracellular Levels of Reactive Oxygen Species in Drug-Sensitive and Drug-Resistant Cancer Cells Using the 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate Assay. *Radiation Physics and Chemistry*. 72:323–331. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2004.06.011>
 25. Löhn, M., Dubrovská, G., Lauterbach, B., Luft, F. C., Gollasch, M., & Sharma, A. M. (2002). Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(9), 1057–1063. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0024com>
 26. Majumder, K., Chakrabarti, S., Morton, J. S., Panahi, S., Kaufman, S., Davidge, S. T., & Wu, J. (2013). Egg-derived tri-peptide IRW exerts antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *PloS one*, 8(11), e82829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082829>
 27. Martínez, C. S., Piagette, J. T., Escobar, A. G., Martín, Á., Palacios, R., Peçanha, F. M., Vassallo, D. V., Exley, C., Alonso, M. J., Salaices, M., Miguel, M., & Wiggers, G. A. (2019). Egg White Hydrolysate: A new putative agent to prevent vascular dysfunction in rats following long-term exposure to aluminum. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 133, 110799. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110799>
 28. Miguel, M., Recio, I., Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., & López-Fandiño, R. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of food protection*, 67(9), 1914–1920. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.9.1914>
 29. Miguel, M., López-Fandiño, R., Ramos, M., & Aleixandre, A. (2005). Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *The British journal of nutrition*, 94(5), 731–737. <https://doi.org/10.1079/bjn20051570>
 30. Miguel, M., López-Fandiño, R., Ramos, M., & Aleixandre, A. (2006). Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Life sciences*, 78(25), 2960–2966. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.11.025>
 31. Miguel, M., Manso, M. A., Martín-Alvarez, P. J., Aleixandre, A., & López-Fandiño, R. (2007a). Angiotensin-converting enzyme activity in plasma and tissues of spontaneously hypertensive rats after the short- and long-term intake of hydrolysed egg white. *Molecular nutrition & food research*, 51(5), 555–563. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700012>
 32. Miguel, M., Alvarez, Y., López-Fandiño, R., Alonso, M. J., & Salaices, M. (2007b). Vasodilator effects of peptides derived from egg white proteins. *Regulatory peptides*, 140(3), 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.11.029>

33. Moraes, P. Z., Pinheiro, J. E. G. J., Martinez, C. S., Moro, C. R., Silva, G. C., Rodriguez, M. D., Simões, M. R., Barbosa, F., Peçanha, F. M., Vassallo, D. V., Miguel, M., & Wiggers, G. A. Multi-functional egg white hydrolysate prevent hypertension and vascular dysfunction induced by cadmium in rats. *Journal of Functional Foods* (2022), 94:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105131>
34. Nóbrega, N., Araújo, N. F., Reis, D., Facine, L. M., Miranda, C. A. S., Mota, G. C., Aires, R. D., Capettini, L. D. S. A., Cruz, J. D. S., & Bonaventura, D. (2019). Hydrogen peroxide and nitric oxide induce anticontractile effect of perivascular adipose tissue via renin angiotensin system activation. *Nitric oxide: biology and chemistry*, 84, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.12.011>
35. Nosalski, R., Mikolajczyk, T., Siedlinski, M., Saju, B., Koziol, J., Maffia, P., & Guzik, T. J. (2020). Nox1/4 inhibition exacerbates age dependent perivascular inflammation and fibrosis in a model of spontaneous hypertension. *Pharmacological research*, 161, 105235. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105235>
36. Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
37. Pagliaro, B., Santolamazza, C., Rubattu, S., & Volpe, M. (2016). New therapies for arterial hypertension. *Panminerva medica*, 58(1), 34–47. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26730462/>
38. Persson, P., Marchetti, M., & Friederich-Persson, M. (2023). Browning of perivascular adipose tissue prevents vascular dysfunction and reduces hypertension in angiotensin II-infused mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 325(3), R290–R298. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00043.2023>
39. Piagette, J. T., Pinheiro, J. E. G. J., Kanaan, S. H. H., Herrera, C. T., Bastilhos, L. O., Peçanha, F. M., Vassallo, D. V., Miguel-Castro, M., & Wiggers, G. A. (2023) Pretreatment with egg white hydrolysate protects resistance arteries from damage induced after treatment with accidental cadmium exposure values. *Journal of Functional Foods* 104, 105529. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105529>
40. Rizzetti, D. A., Altermann, C. D., Martinez, C. S., Peçanha, F. M., Vassallo, D. V., Uranga-Ocio, J. A., Castro, M. M., Wiggers, G. A., & Mello-Carpes, P. B. (2016). Ameliorative effects of egg white hydrolysate on recognition memory impairments associated with chronic exposure to low mercury concentration. *Neurochemistry international*, 101, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.10.002>
41. Rizzetti, D. A., Martín, Á., Corrales, P., Fernandez, F., Simões, M. R., Peçanha, F. M., Vassallo, D. V., Miguel, M., & Wiggers, G. A. (2017). Egg white-derived peptides prevent cardiovascular disorders induced by mercury in rats: Role of angiotensin-converting enzyme (ACE) and NADPH oxidase. *Toxicology letters*, 281, 158–174. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.10.001>
42. Ruan, C. C., Ge, Q., Li, Y., Li, X. D., Chen, D. R., Ji, K. D., Wu, Y. J., Sheng, L. J., Yan, C., Zhu, D. L., & Gao, P. J. (2015). Complement-mediated macrophage polarization in perivascular adipose tissue contributes to vascular injury in deoxycorticosterone acetate-salt mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(3), 598–606. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304927>
43. Ruan, C. C., Ma, Y., Ge, Q., Li, Y., Zhu, L. M., Zhang, Y., Kong, L. R., Wu, Q. H., Li, F., Cheng, L., Zhao, A. Z., Zhu, D. L., & Gao, P. J. (2017). Complement-

- mediated inhibition of adiponectin regulates perivascular inflammation and vascular injury in hypertension. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(3), 1120–1129. <https://doi.org/10.1096/fj.201600780R>
44. Sakaue, T., Suzuki, J., Hamaguchi, M., Suehiro, C., Tanino, A., Nagao, T., Uetani, T., Aono, J., Nakaoka, H., Kurata, M., Sakaue, T., Okura, T., Yasugi, T., Izutani, H., Higaki, J., & Ikeda, S. (2017). Perivascular Adipose Tissue Angiotensin II Type 1 Receptor Promotes Vascular Inflammation and Aneurysm Formation. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 70(4), 780–789. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09512>
 45. Santos-Parker, J. R., Strahler, T. R., Bassett, C. J., Bispham, N. Z., Chonchol, M. B., & Seals, D. R. (2017). Curcumin supplementation improves vascular endothelial function in healthy middle-aged and older adults by increasing nitric oxide bioavailability and reducing oxidative stress. *Aging*, 9(1), 187–208. <https://doi.org/10.18632/aging.101149>
 46. Saxton, S. N., Withers, S. B., Nyvad, J., Mazur, A., Matchkov, V., Heagerty, A. M., & Aalkjær, C. (2019). Perivascular Adipose Tissue Contributes to the Modulation of Vascular Tone in vivo. *Journal of vascular research*, 56(6), 320–332. <https://doi.org/10.1159/000502689Saxton 2021>
 47. Saxton, S. N., Toms, L. K., Aldous, R. G., Withers, S. B., Ohanian, J., & Heagerty, A. M. (2021). Restoring Perivascular Adipose Tissue Function in Obesity Using Exercise. *Cardiovascular drugs and therapy*, 35(6), 1291–1304. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-07136-0>
 48. Saxton, S. N., Withers, S. B., & Heagerty, A. M. (2022). Perivascular Adipose Tissue Anticontractile Function Is Mediated by Both Endothelial and Neuronal Nitric Oxide Synthase Isoforms. *Journal of vascular research*, 59(5), 288–302. <https://doi.org/10.1159/000526027>
 49. Soltis, E. E., & Cassis, L. A. (1991). Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice*, 13(2), 277–296. <https://doi.org/10.3109/10641969109042063>
 50. Victorio, J. A., Fontes, M. T., Rossoni, L. V., & Davel, A. P. (2016). Different Anti-Contractile Function and Nitric Oxide Production of Thoracic and Abdominal Perivascular Adipose Tissues. *Frontiers in physiology*, 7, 295. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00295>
 51. Victorio, J. A., & Davel, A. P. (2020). Perivascular Adipose Tissue Oxidative Stress on the Pathophysiology of Cardiometabolic Diseases. *Current hypertension reviews*, 16(3), 192–200. <https://doi.org/10.2174/1573402115666190410153634>
 52. Wenceslau, C. F., & Rossoni, L. V. (2014). Rostafuroxin ameliorates endothelial dysfunction and oxidative stress in resistance arteries from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: the role of Na⁺K⁺-ATPase/ cSRC pathway. *Journal of hypertension*, 32(3), 542–554. <https://doi.org/10.1097/HJH.000000000000059>
 53. Zou, L., Wang, W., Liu, S., Zhao, X., Lyv, Y., Du, C., Su, X., Geng, B., & Xu, G. (2016). Spontaneous hypertension occurs with adipose tissue dysfunction in perilipin-1 null mice. *Biochimica et biophysica acta*, 1862(2), 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.024>

Figure 1

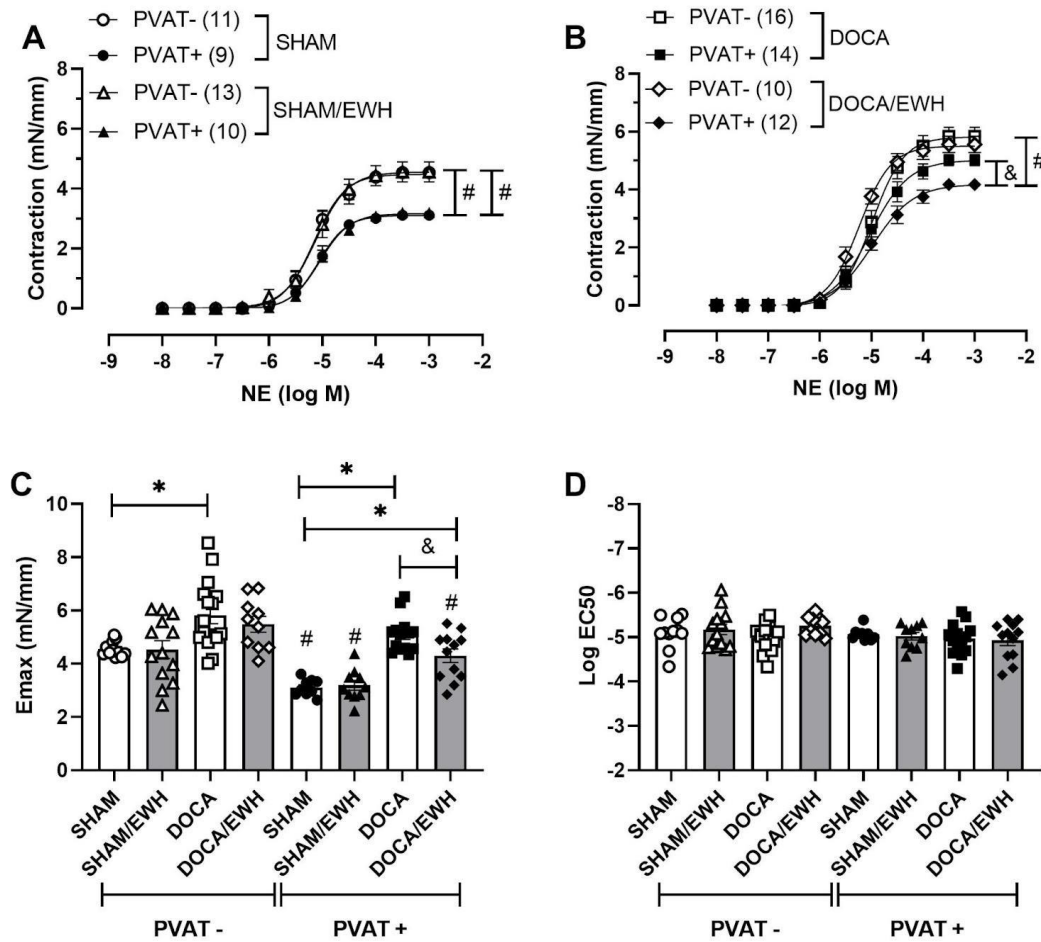


Figure 1 - Concentration-response curves to norepinephrine (NE) in mesenteric resistance artery (MRA) ring in the presence (PVAT+) and absence (PVAT-) of perivascular adipose tissue from animals SHAM and SHAM/EWH (A) and DOCA and DOCA/EWH (B). The bar graph in C represents the comparison of the maximal response of the curves (Emax) of all groups in the absence (PVAT -) and presence (PVAT+) of PVAT. The sensibility of the concentration-response curve of NE (Log EC50) is represented in graph D in the same conditions. Data are presented as mean \pm SEM. The number of animals per group is indicated in parentheses in the figure. The statistical analysis was assessed by three-way ANOVA; # p <0.05 vs. PVAT-; & p < 0.05 vs. DOCA; * p <0.05 vs. SHAM.

Figure 2

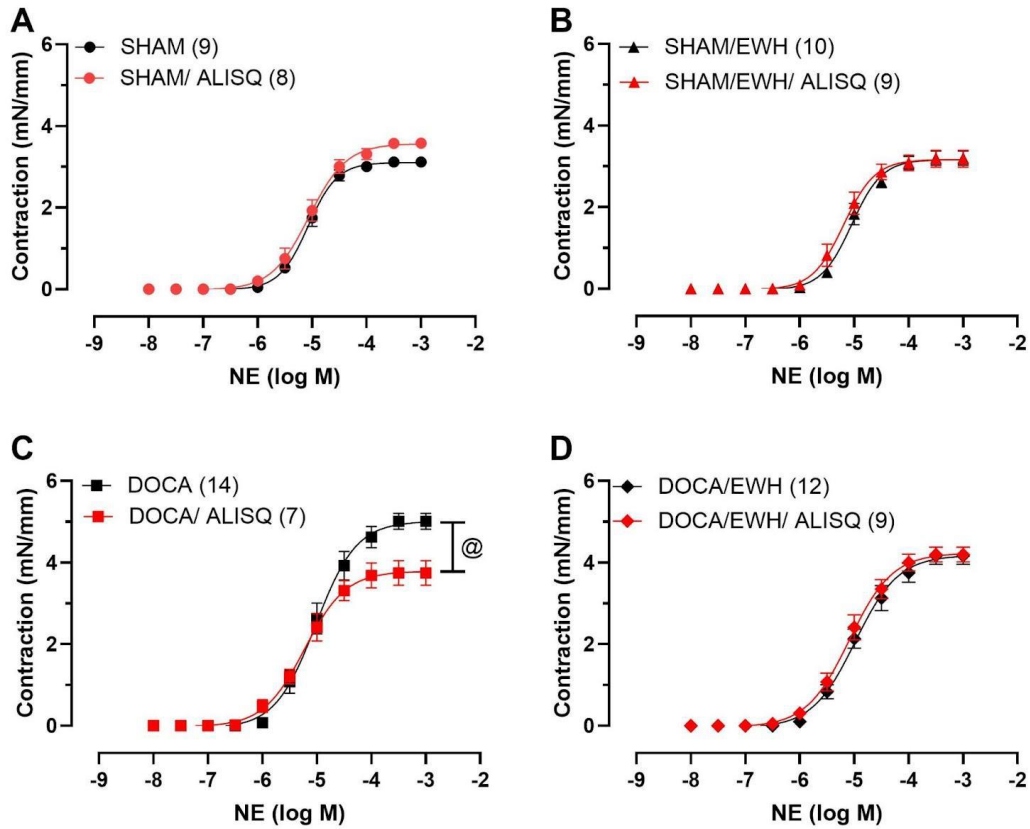


Figure 2 - Effect of Aliskiren (1 $\mu\text{mol/L}$) on concentration-response curves to norepinephrine (NE) in mesenteric resistance artery (MRA) ring with functional endothelium in the presence of perivascular adipose tissue (PVAT+) from animals SHAM (A), SHAM/EWH (B), DOCA (C) and DOCA/EWH (D). Data are presented as mean \pm SEM. The number of animals per group is indicated in parentheses in the figure. The statistical analysis was assessed by two-way ANOVA; @ $p < 0.05$ vs. without ALISQ.

Figure 3

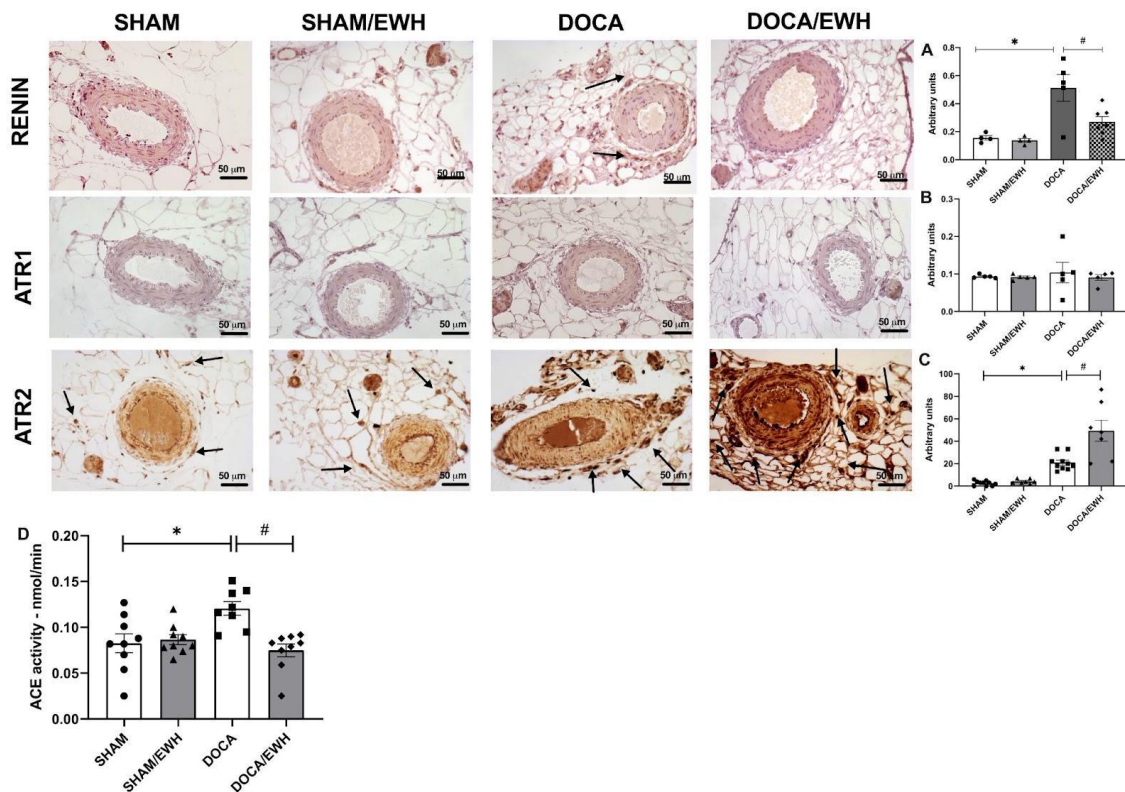


Figure 3 - Effects of treatment with Egg Hydrolysate White (EWH) on components of the renin-angiotensin system (RAS) in SHAM, SHAM/EWH, DOCA, and DOCA/EWH *mPVAT*. The presence of renin (A), ATR1 (B), and ATR2 (C) was indicated in photomicrographs positively are indicated with arrows on the panels. Digital images were captured using the 20× objective. The scale bar represents 50 μm . The bar graph in figure D represents the angiotensin 1 converting enzyme (ACE) activity in the *mPVAT* in all experimental groups. Data are presented as mean \pm SEM. The number of animals per group is indicated in the symbol of the figure. The statistical analysis was assessed by two-way ANOVA; * $p < 0.05$ vs. SHAM; # $p < 0.05$ vs. DOCA.

Figure 4

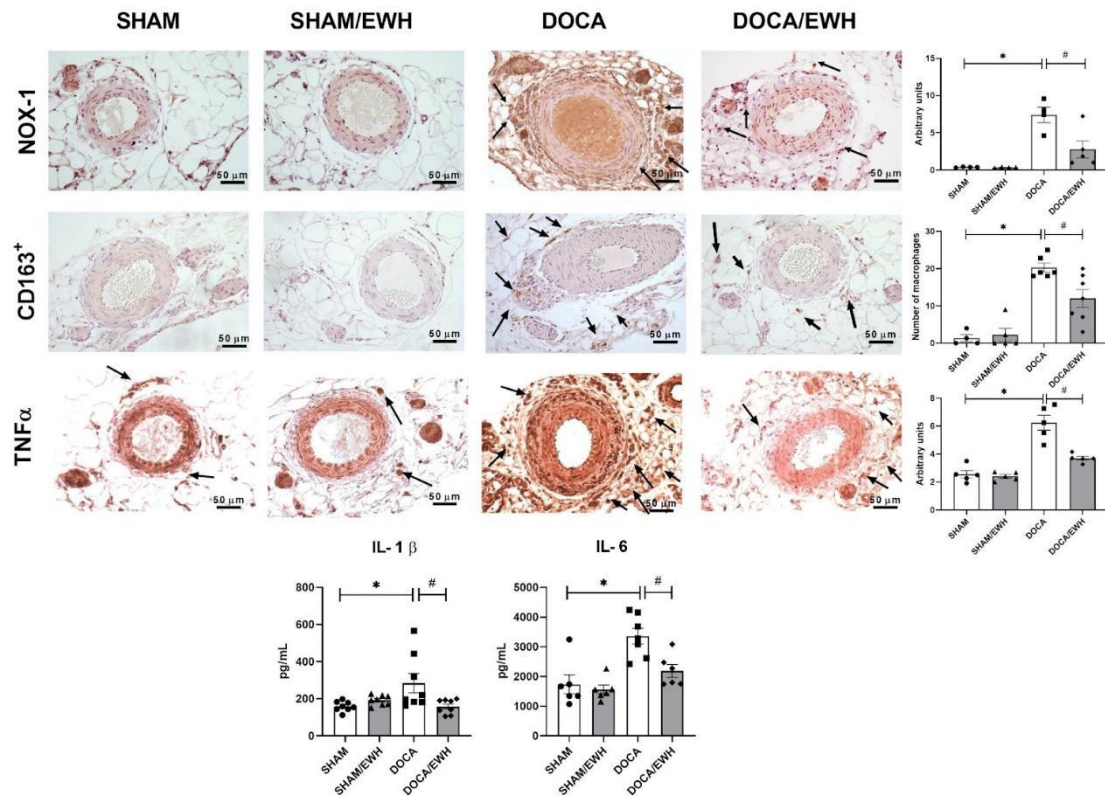


Figure 4 - Effects of treatment with Egg Hydrolysate White (EWH) on the NADPH oxidase enzyme complex (NOX-1), the number of macrophages (CD163⁺ cells), TNF- α production, and IL-6 and IL-1 β levels in *mPVAT*. The presence of NOX-1, CD163, and TNF- α was assessed using an immunohistochemical assay represented by photomicrographs positive are indicated with arrows on the panels A, B and C, respectively. Digital images were captured using the 20 \times objective. The scale bar represents 50 μ m. The bar graph in figures (D) and (E) represents IL-6 and IL-1 β levels in the PVAT m . Data are presented as mean \pm SEM. The number of animals per group is indicated in symbols of the figure. The statistical analysis was assessed by two-way ANOVA; * p <0.05 vs. SHAM; # p <0.05 vs. DOCA.

Figure 5

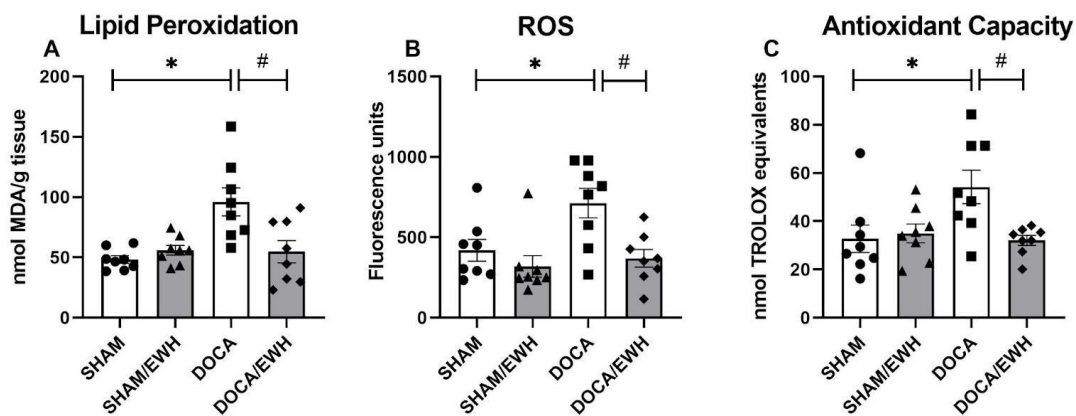
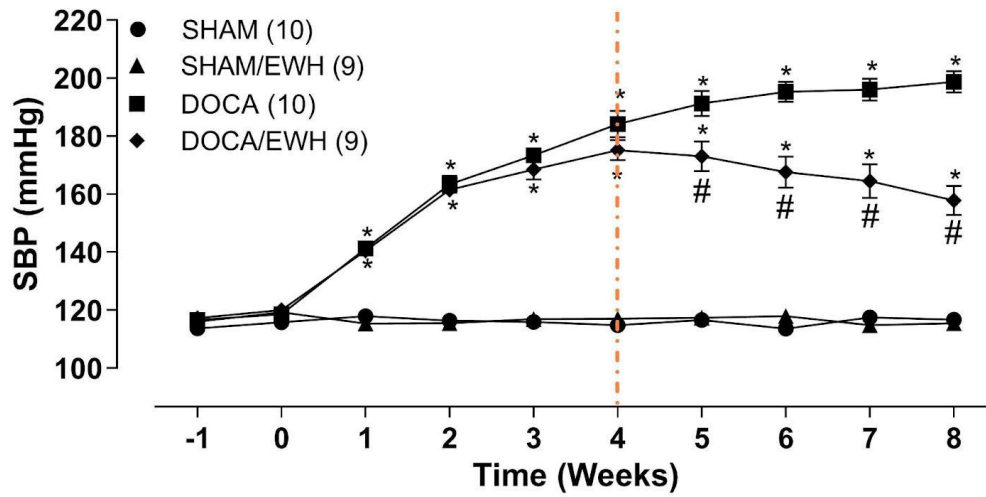


Figure 5 - Effects of treatment with Egg Hydrolysate White (EWH) at MDA (A), ROS (B), Total Antioxidant Capacity (C) levels on *mPVAT* of SHAM, SHAM/EWH, DOCA, and DOCA/EWH groups. Data are presented as mean \pm SEM. The number of rats is indicated in the bars. The statistical analysis was assessed by two-way ANOVA; * $p < 0.05$ vs. SHAM; # $p < 0.05$ vs. DOCA.

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1 - Systolic blood pressure (SBP) values in SHAM, SHAM/EWH, DOCA, and DOCA/EWH rats. SBP before nephrectomy (-1 week), baseline after nephrectomy and DOCA-salt treatment (0 week), and egg hydrolysate white (EWH) dietary supplementation started in dot line (4th week of DOCA-salt treatment). The number of animals per group is indicated in the figure. The statistical analysis was assessed by three-way ANOVA * p<0.05 vs. SHAM; # p<0.05 vs. DOCA.

Table 1 – supplementary

Table 1 – Contractile response to high-potassium solution (KPSS) and the internal diameter of the mesenteric resistance arteries with (PVAT+) or without (PVAT-) perivascular adipose tissue (PVAT) of the SHAM, SHAM/EWH, DOCA, and DOCA/EWH rats.

KPSS-induced contraction				
	SHAM	SHAM+EWH	DOCA	DOCA+EWH
PVAT -	4.43 ± 0.3 (14)	4.40 ± 0.2 (14)	4.78 ± 0.3 (15)	4.38 ± 0.4 (15)
PVAT +	4.24 ± 0.2 (12)	4.72 ± 0.3 (11)	4.16 ± 0.3 (14)	4.44 ± 0.2 (14)
Internal diameter				
PVAT -	283.53 ± 11.8 (14)	274.20 ± 13.7 (14)	262.88 ± 10.6 (15)	273.91 ± 10.8 (15)
PVAT +	270.59 ± 6.73 (12)	276.52 ± 15.3 (11)	260.28 ± 11.2 (14)	267.12 ± 7.2 (14)

Data are mean ± SEM. The number of animals per group is indicated in parentheses. The statistical analysis was assessed by two-way ANOVA; *p<0.05 vs. SHAM; # p<0.05 vs. DOCA.

PARTE III

4 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nesta tese demonstram que o uso dietético com o HCO promoveu redução dos níveis pressóricos diante da hipertensão secundária induzida pelo modelo DOCA-sal. Este tratamento apresentou melhora vascular, nos vasos de condutância e de resistência pelo aumento da resposta vasodilatadora dependente do endotélio. Somados a preservação do efeito anti-contrátil e redução da disfunção do tecido adiposo perivascular mesentérico (mPVAT) induzidas pela HT.

Os resultados do primeiro estudo demonstram que o HCO é uma estratégia não farmacológica efetiva para atenuar os prejuízos da HT estabelecida e prevenir os danos nas artérias de condutância e de resistência com aumento da resposta vasodilatadora mediada pelo endotélio. Este efeito foi atribuído a capacidade do HCO em prevenir a ativação da NADPH oxidase, reduzir os níveis de ROS, especialmente ânion superóxido de origem celular e mitocondrial, restaurando assim a biodisponibilidade de NO, além de evitar o processo redox e inflamatório vascular.

Ademais, os resultados do segundo estudo demonstram que o HCO recupera o efeito anticontrátil do PVAT e melhora os danos nesse tecido relacionado a redução dos níveis de renina tecidual e a inibição de ACE, associada a maior expressão de AT2R em mPVAT.

Por fim, em conjunto, os resultados fornecem evidências valiosas sobre o efeito deste HCO nas alterações vasculares promovidas pela hipertensão secundária. Creditando-o como uma alternativa terapêutica dietética que pode ser utilizada como adjuvante no tratamento da HT severa. Além disso, nossos achados até o presente momento demonstram o papel protetor do HCO no envolvimento do SRA local no tecido adiposo perivascular com consequente participação do AT2R na resposta modulatória do PVAT do leito mesentérico e restauração do efeito anticontrátil desse tecido.

5 PERSPECTIVAS

Embora tenhamos investigado duas importantes vias de produção de ROS vascular (NAD(P)H oxidase e mitocôndrias, outros estudos devem ser conduzidos para abordar a via da xantina oxidase, também fonte de produção de ROS nos vasos sanguíneos. Além disso, o sistema endotelina, alterado no modelo DOCA-sal, também merece atenção e afim de investigar se o HCO possui ação sobre este sistema.

Mostramos pela primeira vez a ação do HCO sobre o eixo “protetor” do SRA local, no entanto, novos estudos devem ser conduzidos para esclarecer melhor os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos observados no PVAT, por exemplo, o envolvimento do receptor prorenina (P)PR, da angiotensina 1-7 e angiotensina 1-9. Quais peptídeos estão presente nesse hidrolisado de 8 horas e a relação dos mesmos com o efeito hipotensor mediado pela ativação do SRA local e a modulação do tecido adiposo perivascular.

Sabendo que o modelo DOCA-sal altera a microbiota intestinal e por sua vez a digestão proteica é diretamente afetada poderia ser investigada qual a relação do modelo nas respostas vasculares apresentadas pelo HCO e quais peptídeos resultam após administração *in vivo*.

6 REFERÊNCIAS

1. ABREU, E. D. L et al. ROS Suppression by Egg White Hydrolysate in DOCA-Salt Rats-An Alternative Tool against Vascular Dysfunction in Severe Hypertension. **Antioxidants (Basel)**, 11(9):1713, 2022. doi: 10.3390/antiox11091713.
2. ARAUJO et al. Perivascular adipose tissue and vascular responses in healthy trained rats. **Life Sci.**, 125, 79–87, 2015. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.12.032.
3. AYALA-LOPEZ & WATTS. New actions of an old friend: perivascular adipose tissue's adrenergic mechanisms. **B J Pharm.**, 174(20), 3454–3465, 2017. DOI: 10.1111/bph.13663.
4. ACC/AHA Blood Pressure Treatment Guideline Recommendations and Cardiovascular Risk. **J Am Coll Cardiol.**, 72(11):1187-1197. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.05.074.
5. ACHARD V. et al. Renin receptor expression in human adipose tissue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 292(1): R274-282, 2007. DOI: 10.1152/ajpregu.00439.2005.
6. ADACHI, Y et al. Perivascular adipose tissue in vascular pathologies-a novel therapeutic target for atherosclerotic disease? **Front Cardiovasc Med.**, 10:1-7. doi: 10.3389/fcvm.2023.1151717.
7. AIRES, M. M. Fisiologia. 5ª edição. Editora: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2018.
8. ALBENZIO, M et al. Bioactive Peptides in Animal Food Products. **Foods.**, 6(5): 1-14, 2017. DOI: 10.3390/foods6050035.
9. ALEXANDER, Y et al. Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and **Thrombosis. Cardiovasc Res.**, 117(1): 29-42, 2021. DOI: 10.1093/cvr/cvaa085.
10. ALMABROUK, T. A M et al. Deletion of AMPK α 1 attenuates the anticontractile effect of perivascular adipose tissue (PVAT) and reduces adiponectin release. **Br J Pharmacol.**, 174(20):3398-3410, 2017. DOI: 10.1111/bph.13633.
11. ARENDSE, L. B et al. Novel Therapeutic Approaches Targeting the Renin-Angiotensin System and Associated Peptides in Hypertension and Heart Failure. **Pharmacol Rev.**, 71(4):539-570, 2019. DOI: 10.1124/pr.118.017129.
12. AROOR, A. R et al. Diet-Induced Obesity Promotes Kidney Endothelial Stiffening and Fibrosis Dependent on the Endothelial Mineralocorticoid Receptor. **Hypertens.**, 73(4):849-858, 2019. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12198.
13. BALAKUMAR, P et al. The physiologic and physiopathologic roles of perivascular adipose tissue and its interactions with blood vessels and the renin-angiotensin system. **Pharmacol Res.**, (173): 1-9, 2021. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105890.
14. BALTIERI, N et al. Protective Role of Perivascular Adipose Tissue in Endothelial Dysfunction and Insulin-Induced Vasodilatation of Hypercholesterolemic LDL Receptor-Deficient Mice. **Front Physiol.**, 19:9:229-241, 2018. DOI: 10.3389/fphys.2018.00229.

15. BAO & WU. Egg White Protein Ovotransferrin-Derived IRW (Ile-Arg-Trp) Inhibits LPS-Induced Barrier Integrity Dysfunction and Inflammation in Caco-2 Cells. **J Agric Food Chem.**, 70(44): 14170-14178, 2022. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c05128.
16. BASTING & LAZARTIGUES. DOCA-Salt Hypertension: an Update. **Curr Hypertens Rep.**, (19): 28-32, 2017. DOI: 10.1007/s11906-017-0731-4.
17. BHAT, Z. F et al. Bioactive peptides of animal origin: a review. **J Food Sci Technol.**, 52(9):5377-5392, 2015. DOI: 10.1007/s13197-015-1731-5.
18. BRASIL. 15º Caderno de Atenção Básica: **Hipertensão Arterial Sistêmica**. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/caderno_atencao_basica15.pdf. Acesso em 05 de janeiro de 2023.
19. BRASIL. Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020**. Disponível em: < <http://departamentos.cardiol.br/sbc-dha/profissional/pdf/Diretriz-HAS-2020.pdf> > Acesso em: 12 de fevereiro de 2023.
20. BROOKS, V. L et al. Time course of synergistic interaction between DOCA and salt on blood pressure: roles of vasopressin and hepatic osmoreceptors. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 291(6): R1825-1834, 2006. DOI: 10.1152/ajpregu.00068.2006.
21. BROWN, N et al. Increased (Na+K+Cl) cotransport in rat arterial smooth muscle in deoxycorticosterone (DOCA)/salt-induced hypertension. **J Vasc Res.**, 36(6):492-501, 1999. DOI: 10.1159/000025692.
22. BROWN, N et al. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, 34(8): 1621–1630, 2014. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303029.
23. CALLERA, G. E et al. ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension. **Hypertens.**, 42 [part 2]: 811–817, 2003. DOI: 10.1161/01.HYP.0000088363.65943.6C.
24. CALLERA, G. E et al. ETA receptor mediates altered leukocyte-endothelial cell interaction and adhesion molecules expression in DOCA-salt rats. **Hypertens.**, v. 43, n. 4, p. 872-879, 2004. DOI: 10.1161/01.HYP.0000117296.30296.14.
25. CALLERA, G. E et al. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. **Clin Sci (Lond).**, (110): 243-253, 2006. DOI: 10.1042/CS20050307.
26. CAMPBELL, D. J et al. Losartan Increases Bradykinin Levels in Hypertensive Humans. **Circul:** (111): 315-320, 2005. DOI: 10.1161/01.CIR.0000153269.07762.3B.
27. CAMPBELL, D. J. Nephilysin Inhibitors and Bradykinin. **Front Med (Lausanne)**, (5): 1-13, 2018. DOI: 10.3389/fmed.2018.00257.
28. CANTERO-NAVARRO, E et al. Renin-angiotensin system and inflammation update. **Mol Cell Endocrinol.**, 1;529:111254, 2021. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111254.
29. CAO, G et al. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease. **Cell Commun Signal.**, 20(1): 1-22, 2022. DOI: 10.1186/s12964-022-00993-2.

30. CAPRIO, M et al. Functional mineralocorticoid receptors in human vascular endothelial cells regulate intercellular adhesion molecule-1 expression and promote leukocyte adhesion. **Circ Res.**, (102): 1359-1367, 2008. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.174235.
31. CHADHA, P. S et al. Endothelium-dependent vasodilation in human mesenteric artery is primarily mediated by myoendothelial gap junctions' intermediate conductance calcium-activated K⁺ channel and nitric oxide. **J Pharmacol Exp Ther.**, (336): 701-718, 2011. DOI: 10.1124/jpet.110.165795.
32. CHAKRABARTI & WU. Milk-derived tripeptides IPP (Ile-Pro-Pro) and VPP (Val-Pro-Pro) promote adipocyte differentiation and inhibit inflammation in 3 T3-F442A cells. **PLoS One.**, (10): 1-15, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0117492.
33. CHANNICK, R. N et al. Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol.**, (43): 62-67, 2004. DOI: 10.1016/j.jacc.2004.02.042.
34. COLLISTER, J. P et al. Lesion of the OVLTL markedly attenuates chronic DOCA-salt hypertension in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, (315): 568-575, 2018. DOI: 10.1152/ajpregu.00433.2017.
35. CROWLEY, S. D. The cooperative roles of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. **Antioxid Redox Signal.**, (20): 102-120, 2014. DOI: 10.1089/ars.2013.5258.
36. da SILVA, A. C. A et al. Moderate Physical Exercise Activates ATR2 Receptors, Improving Inflammation and Oxidative Stress in the Duodenum of 2K1C Hypertensive Rats. **Front Physiol.**, (14): 1-13, 2021. DOI: 10.3389/fphys.2021.734038.
37. DAI, S. Y et al. Brain endogenous angiotensin II receptor type 2 (AT2-R) protects against DOCA/salt-induced hypertension in female rats. **J Neuroinflamm.**, (8): 12-47, 2015. DOI: 10.1186/s12974-015-0261-4.
38. DANNHARDT & KIEFER. Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. **EUR. J. Med. Chem.**, (36): 109-126, 2001. DOI: 10.1016/S0223-5234(01)01197-7.
39. DANSER, A. H. The Role of the (Pro)renin Receptor in Hypertensive Disease. **Am J Hyperten.**, (28): 1187-1196, 2015. DOI: 10.1093/ajh/hpv045.
40. DÁVALOS, A et al. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **J Food Prot.**, 67: 1939-1944, 2004. DOI: 10.4315/0362-028X-67.9.1939.
41. de CAMPOS, S. C et al. Egg and Soy-Derived Peptides and Hydrolysates: A Review of Their Physiological Actions against Diabetes and Obesity. **Nutrien.**, (10): 1-15, 2018. DOI: 10.3390/nu10050549.
42. de SOUZA, R. R et al. Functional anatomy of the perivascular tissue in the adductor canal. **Gegenbaurs Morphol Jahrb.**, (130): 733-738, 1984. DOI: 10.1007/6510664.
43. DENG & SCHIFFRIN. Effects of endothelin-1 and vasopressin on resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens.**, 5(11):817-822, 1992. DOI: 10.1093/ajh/5.11.817.

44. DOS REIS COSTA, D. E. F et al. High-Carbohydrate Diet Enhanced the Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue Through Activation of Renin-Angiotensin System. **Front Physiol.**, 11:628101, 2021. DOI: 10.3389/fphys.2020.628101.
45. DUBOIS-DERUY, E et al. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. **Antioxidants (Basel)**., 9(9):864-879, 2020. DOI: 10.3390/antiox9090864.
46. EELEN G et al. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. **Circ Res.**, 127(2): 310-329, 2020. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316851.
47. ENGELI, S et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? **Int J Biochem Cell Biol**, (35): 807-825, 2003. DOI: 10.1016/s1357-2725(02)00311-4.
48. ERDÖS & DEDDISH. The kinin system: suggestions to broaden some prevailing concepts. **Int Immuno pharmacol.**, (13): 1741-1746, 2022. DOI: 10.1016/s1567-5769(02)00166-2.
49. ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. **Rev Esp Cardiol (Engl Ed)**. 72(2):160, 2018. DOI: 10.1016/j.rec.2018.12.004.
50. ESCOBAR, A et al. Antioxidant Properties of Egg White Hydrolysate Prevent Mercury-Induced Vascular Damage in Resistance Arteries. **Front Phys.**, (11): 1-9, 2020. DOI: 10.3389/fphys.2020.595767.
51. FATTAH et al. Bioactive peptides with ACE-I and antioxidant activity produced from milk proteolysis. **I J of Food Propert.**, 20(12): 3033-3042, 2017. DOI: 10.1080/10942912.2016.1270963.
52. FÉLÉTOU, M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. **San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences**; 2011. DOI:10.4199/C00031ED1V01Y201105ISP019.
53. FÉSÜS, G et al. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. **Cardiovasc Res.**, (75): 719-727, 2007. DOI:10.1016/j.cardiores.2007.05.025.
54. FINK, G. D et al. The area postrema in deoxycorticosterone-salt hypertension in rats. **Hypertens.**, (9): 206-209, 1987. DOI:10.1161/01.hyp.9.6_pt_2.iii206.
55. FLORES-MUÑOZ, M et al. Adenoviral delivery of angiotensin-(1-7) or angiotensin-(1-9) inhibits cardiomyocyte hypertrophy via the mas or angiotensin type 2 receptor. **PLoS One.**, 7(9): 1-6, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0045564.
56. FRIGOLET & GUTIÉRREZ-AGUILAR. The colors of adipose tissue. **Gac Med Mex.**, 156(2):142-149, 2020. DOI:10.24875/GMM.M20000356.
57. FUJITA H et al. Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin. **Pept.**, (16): 785-790, 1995. DOI: 10.1016/0196-9781(95)00054-n.
58. FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ Res.** (53): 557-573, 1983. DOI: 10.1161/01.res.53.5.557.
59. GALIC, S et al. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol.**, (316): 129-139. DOI: 10.1016/j.mce.2009.08.018.

60. GALLO, G et al. Endothelial Dysfunction in Hypertension: Current Concepts and Clinical Implications. **Front Med (Lausanne)**., 8: 1-8, 2022. DOI: 10.3389/fmed.2021.798958.
61. GÁLVEZ, B. C et al. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, (26): 1297-1302, 2006. DOI: 10.1161/01.ATV.0000220381.40739.dd.
62. GALVEZ-PIETRO, B et al. Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue and Leptin are Reduced in Hypertension. **Front Pharmacol.**, 3:103-111, 2012. doi: 10.3389/fphar.2012.00103.
63. GAO, Y, J et al. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. **Br J Pharmacol.**, (151):323-331, 2007. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707228.
64. GARCÉS-RIMÓN, M et al. Egg white hydrolysates improve vascular damage in obese Zucker rats by its antioxidant properties. **J Food Biochem.**, (43): 1-4, 2019. DOI: 10.1111/jfbc.13062.
65. GARCÉS-RIMÓN, M et al. Egg white hydrolysates with in vitro biological multiactivities to control complications associated with the metabolic syndrome. **Eur Food Res Technol.**, 242: 61-69, 2016. DOI: 10.1007/s00217-015-2518-7.
66. GARCÉS-RIMÓN, M et al. Pepsin egg white hydrolysate ameliorates obesity-related oxidative stress, inflammation and steatosis in Zucker fatty rats. **PLoS One.**, (11): 1-15, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0151193.
67. GARCÉS-RIMÓN, M et al. Pepsin egg white hydrolysate improves glucose metabolism complications related to metabolic syndrome in Zucker fatty rats. **Nutr.**, (10): 1-10, 2016. DOI: 10.3390/nu10040441.
68. GARCÉS-RIMÓN, M et al. Pepsin egg white hydrolysate ameliorates metabolic syndrome in high-fat/high-dextrose fed rats. **Food Funct**; 9: 78-86, 2018. doi.org/10.1039/c7fo01280b.
69. GARCIA-REDONDO, A et al. Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A₂, Ca²⁺, and superoxide anion levels. **J Pharmacol Exp Ther.**, 328(1):19-27, 2009. DOI: 10.1124/jpet.108.144295.
70. GARCIA-REDONDO, A et al. Vascular effects of egg white-derived peptides in resistance arteries from rats. Structure-activity relationships. **J Sci Food Agric.**, 90: 1988-1993, 2010. DOI: 10.1002/jsfa.4037.7.
71. GHORANI, H et al. Arterial hypertension - Clinical trials update 2021. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, 32(1):21-31, 2022. DOI: 10.1016/j.numecd.2021.09.007.
72. GHOSH, M et al. Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. **Br J Pharmacol.**, (141): 562-573, 2004. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705557.
73. GIL-ORTEGA, M et al. Adaptive nitric oxide overproduction in perivascular adipose tissue during early diet-induced obesity. **Endocrin.**, (151) 3299-3306, 2010. DOI: 10.1210/en.2009-1464.

74. GIRGIH, A. T et al. Reverse-phase HPLC separation of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysate produced peptide fractions with enhanced antioxidant capacity. **Plant Foods Hum Nutr.**, (68):39-46, 2013. DOI: 10.1007/s11130-013-0340-6.
75. GÓMEZ-GUZMÁN, M et al. Epicatechin lowers blood pressure, restores endothelial function, and decreases oxidative stress and endothelin-1 and NADPH oxidase activity in DOCA-salt hypertension. **Free Radic Biol Med.**, (52): 70-79, 2012. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.015.
76. GOROSTIDI, M et al. Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the Spanish Society of Hypertension. **Hipertens Riesgo Vasc.**, 39(4):174-194, 2022. Spanish. DOI: 10.1016/j.hipert.2022.09.002.
77. GORZELNIAK, K et al. Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. **J Hypertens.**, (20): 965-973, 2002. DOI: 10.1097/00004872-200205000-00032.
78. GRATON, M. E et al. Apocynin alters redox signaling in conductance and resistance vessels of spontaneously hypertensive rats. **Free Radic Biol Med.**, (134): 53-63, 2019. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.026.
79. GRIENGLING, K. K et al. Oxidative Stress and Hypertension. **Circ Res.**, (128): 993-1020, 2021. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318063.
80. GROBE, J. L et al. Angiotensinergic signaling in the brain mediates metabolic effects of deoxycorticosterone (DOCA)-salt in C57 mice. **Hypertens.**, (57): 600-607, 2011. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.165829.
81. GROOTAERT, C et al. Egg-derived bioactive peptides with ACE-inhibitory properties: a literature update. **Food Funct.**, 8(11):3847-3855, 2017. DOI: 10.1039/c7fo00839b.
82. GROSS, V et al. Insights into angiotensin II receptor function through AT2 receptor knockout mice. **Acta Physiol Scand.**, (181): 487-494, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-201X.2004.01322.x.
83. GUYTON, A. C et al. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. **Am J Med.**, 52(5): 584-594, 1972. DOI: 10.1016/0002-9343(72)90050-2.
84. GUZIK & TOUYZ. Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension. **Hypertens.**, (70): 660-667, 2017. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802.
85. GUZIK, T. J et al. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. **Cardiovasc Res.**, (113): 1009-1023, 2017. DOI: 10.1093/cvr/cvx108.
86. HARNEDY & FITZGERALD. Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae (1). **J Phycol.**, (47): 218-232, 2011. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2011.00969.x.
87. HAUSMAN & CAMPIONG. Histology of the stroma in developing rat subcutaneous adipose tissue. **J Anim Sci.**, (55):1336-1342, 1982. DOI: 10.2527/jas1982.5561336x.
88. HE, H. L et al. Review on the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitor peptides from marine proteins. *Appl Biochem Biotechnol.*, 169(3):738-749, 2013. DOI: 10.1007/s12010-012-0024-y.

89. HERNANZ R. et al. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. **Clin Sci (Lond)**., 126(2):111-121, 2014. DOI: 10.1042/CS20120651.
90. HILLOCK-WATLING & GOTLIEB. The pathobiology of perivascular adipose tissue (PVAT), the fourth layer of the blood vessel wall. **Cardiovasc Pathol.**, 61: 1-13, 2022. DOI: 10.1016/j.carpath.2022.107459.
91. HRENAK, J et al. Angiotensin A/Alamandine/MrgD Axis: Another Clue to Understanding Cardiovascular Pathophysiology. **Int J Mol Sci.**, 17(7):1098-1107, 2016. DOI: 10.3390/ijms17071098.
92. HU, H et al. Roles of Perivascular Adipose Tissue in Hypertension and Atherosclerosis. **Antioxid Redox Signal.**, (34): 736-749, 2021. DOI: 10.1089/ars.2020.8103.
93. ICHIKI, T. Regulation of angiotensin II receptor expression. **Curr Pharm Des.**, 19(17): 3013-3021, 2013. DOI: 10.2174/1381612811319170007.
94. INCALZA, M. A et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascul Pharmacol.**, 100:1-19, 2018. DOI: 10.1016/j.vph.2017.05.005.
95. IDBORG & PAWELZIK. Prostanoid Metabolites as Biomarkers in Human Disease. **Metab.**, (12): 1-25, 2022. DOI: 10.3390/metabo12080721.
96. JACOB, F et al. Role of renal nerves in development of hypertension in DOCA-salt model in rats: a telemetric approach. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 289(4):H1519-529, 2005. DOI: 10.1152/ajpheart.00206.2005.
97. JAHANDIDEH, F et al. A comprehensive review on the glucoregulatory properties of food-derived bioactive peptides. **Food Chem X.**, 2022 Feb 2;13:100222. DOI: 10.1016/j.fochx.2022.100222.
98. JAKALA, P et al. Cardiovascular activity of milk casein-derived tripeptides and plant sterols in spontaneously hypertensive rats. **J Physiol Pharmacol.**, (60): 11-20, 2009. DOI: 20065492.
99. JIA, L et al. Bioactive peptides from foods: production, function, and application. **Food Funct.**, 2021 Aug 21;12(16):7108-7125. DOI: 10.1039/d1fo01265g.
100. JIEHUI, Z et al. Immunomodulating effects of casein-derived peptides QEPVL and QEPV on lymphocytes in vitro and in vivo. **Food Funct.**, (5): 2061-2069, 2014. DOI: 10.1039/C3FO60657K.
101. JOVANOVIĆ, J. R et al. Ultrasound Pretreatment as an Useful Tool to Enhance Egg White Protein Hydrolysis: Kinetics, Reaction Model, and Thermodynamics. **J Food Sci.**, (81): 2664-2675, 2016. DOI: 10.1111/1750-3841.13503.
102. KATUNARIC, B et al. S1P (Sphingosine-1-Phosphate)-Induced Vasodilation in Human Resistance Arterioles During Health and Disease. **Hypertens.**, 79(10): 2250-2261, 2022. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.19862.

103. KINGWELL, B. A et al. Antiatherosclerotic Effects of CSL112 Mediated by Enhanced Cholesterol Efflux Capacity. **J Am Heart Assoc.**, 11(8): 1-9, 2022. DOI: 10.1161/JAHA.121.024754.
104. KONDO, M et al. Xanthine Oxidase Inhibition by Febuxostat in Macrophages Suppresses Angiotensin II-Induced Aortic Fibrosis. **Am J Hypertens.**, (32): 249-256, 2019. DOI: 10.1093/ajh/hpy157.
105. KONUKOGLU & UZUN. Endothelial Dysfunction and Hypertension. **Adv Exp Med Biol.**, (956): 511-540, 2017. DOI: 10.1007/5584_2016_90.
106. KOPINCOVÁ, J et al. L-NAME in the cardiovascular system - nitric oxide synthase activator? **Pharmacol Rep.**, (64): 511-520, 2012. DOI: 10.1016/s1734-1140(12)70846-0.
107. KRAUSE & MOHAN. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 13ª Edição, Editora: GEN Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2021.
108. KRISHNAN, S. M et al. Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. **Br J Pharmacol.**, (173): 752-765, 2016. DOI: 10.1111/bph.13230.
109. KRISHNAN, S. M et al. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension. **Cardiovasc Res.**, 2019 Mar 15;115(4):776-787. DOI: 10.1093/cvr/cvy252.
110. KRZEMIŃSKA, J et al. Arterial Hypertension-Oxidative Stress and Inflammation. **Antioxidants (Basel)**., 2022 Jan 17;11(1):172. DOI: 10.3390/antiox11010172.
111. LABAT, C et al. Inflammatory mediators in saliva associated with arterial stiffness and subclinical atherosclerosis. **J Hypertens.**, 31(11):2251-2258, 2013. DOI: 10.1097/HJH.0b013e328363dccc.
112. LÄNGST, N et al. Cyclic GMP-Dependent Regulation of Vascular Tone and Blood Pressure Involves Cysteine-Rich LIM-Only Protein 4 (CRP4). **Int J Mol Sci.**, 22(18): 1-23, 2021. DOI: 10.3390/ijms22189925.
113. LAUTNER, G et al. Feedback-controlled photolytic gas phase nitric oxide delivery from S-nitrosothiol-doped silicone rubber films. **J Control Release.**, 318:264-269, 2020. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.11.030.
114. LEE, R. M et al. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. **J Hypertens.**, 27(4):782-790, 2009. DOI: 10.1097/HJH.0b013e328324ed86.
115. LERMAN, L. O et al. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Hypertens.**, (73): 87-120, 2019. DOI: 10.1161/HYP.0000000000000090.
116. LI, Y et al. Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. **Food Chem.**, (122): 1159-1163, 2010. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.03.108.

117. LI, C et al. Neuron-specific (pro)renin receptor knockout prevents the development of salt-sensitive hypertension. **Hipert.**, 63(2):316-23, 2014. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02041.
118. LIANG, M et al. Identification of New Anti-inflammatory Peptides from Zein Hydrolysate after Simulated Gastrointestinal Digestion and Transport in Caco-2 Cells, **J. Agric. Food Chem.**, (66):1114-1120, 2018. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04562.
119. LISOWSKI, P et al. Mitochondria and the dynamic control of stem cell homeostasis. **EMBO Rep.**, (19): 1-12, 2018. DOI: 10.15252/embr.201745432.
120. LIU, Y et al. Effect of neutrase, alcalase, and papain hydrolysis of whey protein concentrates on iron uptake by Caco-2 cells. **J Agric Food Chem.**, 58(8): 4894-900, 2010. DOI: 10.1021/jf100055y.
121. LÖHN, M et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **FASEB J.**, 16(9):1057-1063, 2002. DOI: 10.1096/fj.02-0024com.
122. LÓPEZ-MARTÍNEZ, M. I et al. Protein and Sport: Alternative Sources and Strategies for Bioactive and Sustainable Sports Nutrition. **Front Nutr.**, 2022 Jun 17;9:926043. DOI: 10.3389/fnut.2022.926043.
123. LU, J et al. One-week antihypertensive effect of Ile-Gln-Pro in spontaneously hypertensive rats. **J Agric and F Chem.**, (59): 559-563, 2011. DOI: 10.1021/jf104126a.
124. LUDBROOK, J et al. The effect of pyridinolcrbamate on vasodilator action of bradykinin in the human forearm. **Immun C Biol.**, (51): 405-409. DOI: 10.1038/icb.1973.37.
125. MAJUMDER & WU. Molecular targets of antihypertensive peptides: understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. **Int J Mol Sci.**, (16): 256-283, 2014. DOI: 10.3390/ijms16010256.
126. MAN, A. W.C et al. Perivascular Adipose Tissue as a Target for Antioxidant Therapy for Cardiovascular Complications. **Antioxidants (Basel).**, 9(7):574-599, 2020. DOI: 10.3390/antiox9070574.
127. MANSO, M. A et al. Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. **Food Chem.**, 109:361-36, 2008. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.12.049.
128. MARÍN & SÁNCHEZ-FERRER. Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular responses. **Gen Pharmacol.**, 21(5):575-587, 1990. DOI: 10.1016/0306-3623(90)91002-9.
129. MARÍN & RODRÍGUEZ. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. **J Auton Pharmacol.**, 15(4):279-307, 1995. DOI: 10.1111/j.1474-8673.1995.tb00311.x.
130. MARTINEZ, C. S et al. Dietary Egg White Hydrolysate Prevents Male Reproductive Dysfunction after Long-Term Exposure to Aluminum in Rats. **Metab.**, (12): 1-19, 2022. DOI: 10.3390/metabo12121188.
131. MARTINEZ, C. S et al. Egg White Hydrolysate as a functional food ingredient to prevent cognitive dysfunction in rats following long-term exposure to aluminum. **Sci Rep.**, (9): 1881, 2019. DOI: 10.1038/s41598-018-38226-7.4

132. MARTINEZ, C. S et al. Egg White Hydrolysate as a new bioactive food ingredient in the prevention of gastrointestinal effects induced by aluminum exposure in rats. **Med. Balear.**, ():76-83, 2022. DOI: 10.3306/AJHS.2022.37.03.18.
133. MARTINEZ, C. S et al. Egg White Hydrolysate: A new putative agent to prevent vascular dysfunction in rats following long-term exposure to aluminum. **Food Chem.**, (133): 1-14, 2019. DOI: 10.1016/j.fct.2019.110799.
134. MARTINEZ-QUINONES, P et al. Hypertension Induced Morphological and Physiological Changes in Cells of the Arterial Wall. **Am J Hypertens**; (31):1067-1078, 2018. DOI: 10.1093/ajh/hpy083.
135. MARZIANO C, GENET G, HIRSCHI KK. Vascular endothelial cell specification in health and disease. **Angiogenesis**. 2021 May;24(2):213-236. DOI: 10.1007/s10456-021-09785-7.
136. MATIN, N et al. DOCA-salt hypertension impairs artery function in rat middle cerebral artery and parenchymal arterioles. **Microcircul.**, (23): 571-579, 2016. DOI: 10.1111/micc.12308.
137. MATOBA, N et al. A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. **FEBS Lett.**, (452): 181-184, 1999. DOI: 10.1016/s0014-5793(99)00587-6.
138. MATOBA, N et al. Design and production of genetically modified soybean protein with anti-hypertensive activity by incorporating potent analogue of ovokinin(2-7). **FEBS Lett.**, (497): 50-54, 2001. Doi: 10.1016/s0014-5793(01)02434-6.
139. MATTOS, B. R et al. TNF- α inhibition decreases MMP-2 activity, reactive oxygen species formation and improves hypertensive vascular hypertrophy independent of its effects on blood pressure. *Biochem Pharmacol.*, (180): 114-121, 2020. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114121.
140. MIGUEL & ALEIXANDRE. Antihypertensive peptides derived from egg proteins. **J Nutr.**, (136):1457-1460, 2006. DOI: 10.1093/jn/136.6.1457.
141. MIGUEL, M. C et al. Angiotensin-converting enzyme activity in plasma and tissues of spontaneously hypertensive rats after the short- and long- term intake of hydrolysed egg white. **Mol Nutr Food Res.**, 51: 555-563, 2007. DOI: 10.1002/mnfr.200700012.
142. MIGUEL, M. C et al. Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.**, 78: 2960-2966. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.11.025.
143. MIGUEL, M. C et al. R. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **J Food Prot.**, 67: 1914-1920, 2004. DOI: 10.4315/0362-028X-67.9.1914.
144. MIGUEL, M. C et al. Vascular effects, angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, and antihypertensive properties of peptides derived from egg white. **J Agric Food Chem.**, 55: 10615-10621, 2007. DOI: 10.1021/jf072307o.
145. MIGUEL, M. C et al. M, Alvarez Y, López-Fandiño R, Alonso MJ, Salaices M. Vasodilator effects of peptides derived from egg white proteins. **Regul Pept.**, 140: 131-135, 2007. DOI: 10.1016/j.regpep.2006.11.029.

146. MIGUEL.M. C et al. Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. **Br J Nutr.**, 94: 731-737, 2005. DOI: 10.1079/BJN20051570.
147. MINE,Y. Egg proteins and peptides in human health--chemistry, bioactivity and production. **Curr Pharm Des.**, (13): 875-884, 2007. DOI: 10.2174/138161207780414278.
148. MITCHELL & KIRKBY. Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. **Br J Pharmacol.**, (176): 1038-1050, 2019. DOI: 10.1111/bph.14167.
149. MITCHELL, J. A et al. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. **Exp Physiol.**, (93): 141-147, 2008. DOI: 10.1113/expphysiol.2007.038588.
150. MOHAMMED, M. M. J et al. Vasodilator effects of leptin on canine isolated mesenteric arteries and veins. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, (34):771-774, 2007. Doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04648x.
151. MÖHRING, J et al. Vasopressor role of ADH in the pathogenesis of malignant DOC hypertension. **Am J Physiol.**, 232(3): F260-269, 1977. DOI: 10.1152/ajprenal.1977.232.3.F260.
152. MÖLLER, N. P et al. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **Eur J Nutr.**, 47(4):171-182, 2008. DOI: 10.1007/s00394-008-0710-2.
153. MOMBOULI & VANHOUTTE. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol.**, 31(1):61-74, 1999. DOI: 10.1006/jmcc.1998.0844.
154. MONTEZANO, A. C. I et al. Endothelin-1 contributes to the sexual differences in renal damage in DOCA-salt rats. **Pept.**, 26 (8): 1454-1462, 2005. DOI: 10.1016/j.peptides.2005.03.038.
155. MONCADA S, PALMER R. M, & HIGGS E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, 43(2):109-142, 1991. PMID: 1852778.
156. MORA & TOLDRÁ. Advanced enzymatic hydrolysis of food proteins for the production of bioactive peptides. **Cur. Opin. in Food Sci.**, 49: 1-9, 2023. DOI: 10.1016/j.cofs.2022.100973.
157. MORAES, P. Z et al. Multi-functional egg white hydrolysate prevents hypertension and vascular dysfunction induced by cadmium in rats. **J Funct Foods.**, (94):105-131, 2022. DOI: 10.1016/j.jff.2022.105131.
158. MORENO-FERNÁNDEZ, S et al. Expression enhancement in brown adipose tissue of genes related to thermogenesis and mitochondrial dynamics after administration of pepsin egg white hydrolysate. **Food Funct.**, 9: 6599-6607, 2018 DOI: 10.1039/C8FO01754A.
159. MOUGHAN, P. J et al. Dietary protein and amino acids-consideration of the undigestible fraction. **Poult Sci.**, (93): 2400-2410, 2014. DOI: 10.3382/ps.2013-03861.
160. MUÑOZ, M et al. Hydrogen peroxide derived from NADPH oxidase 4- and 2 contributes to the endothelium-dependent vasodilatation of intrarenal arteries. **Redox Biol.**, 19:92-104, 2018. DOI: 10.1016/j.redox.2018.08.004.

161. NELSON & QUAYLE. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am J Physiol.**, 68(4 Pt 1):C799-822, 1995. DOI: 10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799.
162. NGUYEN & MULLER. The biology of the (pro)renin receptor. **J Am Soc Nephrol.**, 21(1):18-23, 2010. DOI: 10.1681/ASN.2009030300.
163. NGUYEN DINH CAT & TOUYZ. Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanisms. **Curr Hypertens Rep.**, 13(2):122-128, 2011. DOI: 10.1007/s11906-011-0187-x.
164. NICE. The National Institute for Health and Care Excellence. Endorsed Clinical Guidelines 2016.
165. NITA & GRZYBOWSKI. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. **Oxid Med Cell Longev**; (2016): 1-23, 2016. DOI: 10.1155/2016/3164734.
166. NÓBREGA, N et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide induce anticontractile effect of perivascular adipose tissue via renin angiotensin system activation. **Nitr. Oxi.**, 1(84): 50-59, 2019. DOI: 10.1016/j.niox.2018.12.011.
167. NOSALSKI, R et al. T-Cell-Derived miRNA-214 Mediates Perivascular Fibrosis in Hypertension. **Circ Res.**, 126(8):988-1003, 2020. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315428.
168. OBST, M et al. Nitric oxide synthase expression in AT2 receptor-deficient mice after DOCA-salt. **Kidney Int**; (65): 2268-2278, 2004. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00646.x.
169. OBST, M et al. Pressure natriuresis in AT(2) receptor-deficient mice with L-NAME hypertension. **J Am Soc Nephrol**, (14): 303-310, 2003. doi: 10.1097/01.asn.0000043904.26730.11.
170. O'DONAUGHY & BROOKS. Deoxycorticosterone acetate-salt rats: hypertension and sympathoexcitation driven by increased NaCl levels. **Hypertens.**, (47): 680-685, 2006. DOI: 10.1161/01.HYP.0000214362.18612.6e.
171. OKAMOTO, E et al. Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries. **Circulation.**, 104(18):2228-2235, 2001. DOI: 10.1161/hc4301.097195.
172. OSBORN, J. W et al. Effect of subfornical organ lesion on the development of mineralocorticoid-salt hypertension. **Brain Res**; (1109): 74-82, 2006. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.06.073.
173. PACURARI, M et al. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. **Int J Inflamm.**, (2014): 1-13, 2014. DOI: 10.1155/2014/689360.
174. PADILLA, J et al. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, (304): 543-552, 2013. DOI: 10.1152/ajpregu.00567.2012.
175. PAHLAVANI, M et al. Regulation and Functions of the Renin-Angiotensin System in White and Brown Adipose Tissue. **Compr Physiol.**, (4):1137-1150, 2020. DOI: 10.1002/cphy.c160031

176. PANTHIYA, L et al. Hexahydrocurcumin mitigates angiotensin II-induced proliferation, migration, and inflammation in vascular smooth muscle cells. **EXCLI J.**, 22:466-481, 2023. DOI: 10.17179/excli2023-6124.
177. PATEL S, et al. Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. **Biomed Pharmacother.**, 94:317-325, 2017. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.091.
178. PATIL, P. J et al. Exploring bioactive peptides as potential therapeutic and biotechnology treasures: A contemporary perspective. **Life Sci.**, 301: 1-17, 2022 DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120637.
179. PÉREZ-RIVERA, A. A et al. Alpha-1B adrenoceptors mediate neurogenic constriction in mesenteric arteries of normotensive and DOCA-salt hypertensive mice. **Auton Neurosci**; (121): 64-73, 2005. DOI: 10.1016/j.autneu.2005.07.004.
180. PESTANA-OLIVEIRA, N et al. Development of the Deoxycorticosterone Acetate (DOCA)-salt Hypertensive Rat Model. **Bio Protoc**; (10): 1-50, 2020. DOI:10.21769/BioProtoc.3708.
181. PIAGETTE, J et al. Pretreatment with egg white hydrolysate protects resistance arteries from damage induced after treatment with accidental cadmium exposure values. **J Funct. Foods**; 104():1-9, 2023. DOI: 10.1016/j.jff.2023.105529.
182. PINHEIRO, J. E. et al. Egg white hydrolysate prevents reproductive impairments induced by cadmium in rats. **J Funct Foods**; (67): 1-10, 2020. DOI: 10.1016/j.jff.2020.103823.
183. PIRES, P. W et al. The effects of hypertension on the cerebral circulation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, (304):1598-1614, 2013. DOI: 10.1152/ajpheart.00490.2012.
184. QUILLON & FROMY. Endothelium microenvironment sensing leading to nitric oxide mediated vasodilation: a review of nervous and biomechanical signals. **Nitric Oxide**, (25): 20-26, 2015. DOI: 10.1016/j.niox.2015.01.006.
185. RAI, M et al. Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. **J Food Sci Technol.**, 53(9):3381-3394, 2016. DOI: 10.1007/s13197-016-2318-5.
186. RANJIT, A et al. Update on Angiotensin II Subtype 2 Receptor: Focus on Peptide and Nonpeptide Agonists. **Mol Pharmacol.**, 99(6):469-487, 2021. DOI: 10.1124/molpharm.121.000236.
187. RICCIARDOLO, F. L. M et al. Bradykinin in asthma: Modulation of airway inflammation and remodelling. **Eur J Pharmacol.**, 827:181-188, 2018. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.03.017.
188. RIGSBY, C. S et al. Effects of spironolactone on cerebral vessel structure in rats with sustained hypertension. **Am J Hypertens**; (24): 708-715, 2011. DOI: 10.1038/ajh.2011.20.
189. RIZZETTI, D et al. Egg white hydrolysate promotes neuroprotection for neuropathic disorders induced by chronic exposure to low concentrations of mercury. **B Res.** 1646, 482-489, 2016. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.06.037.
190. RIZZETTI, D et al. Egg white-derived peptides prevent cardiovascular disorders induced by mercury in rats: Role of angiotensin-converting enzyme (ACE) and NADPH oxidase. **Toxic Lett**; (281): 158-174, 2017. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.10.001.

191. RIZZETTI, D et al. Egg white-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. **Food Chem.**, (100): 253-264 2017. DOI:10.1016/j.fct.2016.12.038.
192. RIZZETTI, D et al. Potential benefits of egg white hydrolysate in the prevention of Hg-induced dysfunction in adipose tissue. **Food & Funct.**; (13): 3-15, 2022. DOI:10.1039/D2FO00561A.
193. RIZZI, E et al. Nitrite treatment downregulates vascular MMP-2 activity and inhibits vascular remodeling in hypertension independently of its antihypertensive effects. **Free Radic Biol Med.** (130): 234-243, 2019. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.002.
194. RIZZONI, D et al. Hypertrophic remodeling of subcutaneous small resistance arteries in patients with Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.**, (94): 5010-5018, 2009. DOI: 10.1210/jc.2009-1588.
195. ROMBOUTS, K. B et al. The role of vascular smooth muscle cells in the development of aortic aneurysms and dissections. **Eur J Clin Invest.**, 52(4): 1-24, 2022. DOI: 10.1111/eci.13697.
196. ROSSI G.P et al. Practice Recommendations for Diagnosis and Treatment of the Most Common Forms of Secondary Hypertension. **High Blood Press Cardiovasc Prev.**, 27(6): 547-560, 2020. DOI: 10.1007/s40292-020-00415-9.
197. RUAN, C. C et al. Complement-mediated macrophage polarization in perivascular adipose tissue contributes to vascular injury in deoxycorticosterone acetate-salt mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, 35(3): 598-606, 2015. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.304927.
198. RUDEMILLER & CROWLEY. Interactions Between the Immune and the Renin-Angiotensin Systems in Hypertension. **Hyperten.**, 68(2): 289-296, 2016. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06591.
199. SÁNCHEZ & VÁZQUEZ. Bioactive peptides: A review. **F Quality & Safety.**, (1): 29-46, 2017. DOI: 10.1093/fqsafe/fyx006.
200. SANDOO, A et al. The endothelium and its role in regulating vascular tone. **Open Cardiovasc Med J**; (4): 302-312, 2010. DOI: 10.2174/1874192401004010302.
201. SANTILLO, M et al. NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis. **Front Physiol.**, (6): 1-8, 2015. DOI: 10.3389/fphys.2015.00194.
202. SANTOS-PARKER, J. R et al. Curcumin supplementation improves vascular endothelial function in healthy middle-aged and older adults by increasing nitric oxide bioavailability and reducing oxidative stress. **Aging (Albany NY).**, (9): 187-208, 2017. DOI:10.18632/aging.101149.
203. SARATHY, H et al. Evaluation and Management of Secondary Hypertension. **Med Clin North Am.**, 106(2): 269-283, 2022. DOI: 10.1016/j.mcna.2021.11.004.
204. SCHIFFRIN & ST-LOUIS. Decreased density of vascular receptors for atrial natriuretic peptide in DOCA-salt hypertensive rats. **Hypertens.**, 9(5):504-512, 1987. DOI: 10.1161/01.hyp.9.5.504.
205. SCHIFFRIN, E. L. Vascular endothelin in hypertension. **Vascul Pharmacol.**, 43(1):19-29, 2005. DOI: 10.1016/j.vph.2005.03.004.

206. SCHLEIFENBAUM, J et al. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. **J Hypertens.**, (28): 1875-1882, 2010. DOI: 10.1097/HJH.0b013e32833c20d5.
207. SCOTLAND, R. S et al. Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo. **Circul.**, (111): 796-803, 2005. DOI: 10.1161/01.CIR.0000155238.70797.4E.
208. SEIFI, B et al. Pro-inflammatory cytokines of rat vasculature in DOCA-salt treatment. **Mol Biol Rep.**, (37): 2111-2115, 2010. DOI: 10.1007/s11033-009-9676-2.
209. SELYE & STONE. Pathogenesis of the cardiovascular and renal changes which usually accompany malignant hypertension. **J Urol.**, (56): 399-419, 1946. DOI: 10.1016/S0022-5347(17)69823-9.
210. SERPA, F. S et al. Hereditary angioedema: how to approach it at the emergency department? **Einstein (Sao Paulo)**, (19): 1-10, 2021. DOI: 10.31744/einstein_journal/2021RW5498.
211. SIEGEL-AXEL & HÄRING. Perivascular adipose tissue: An unique fat compartment relevant for the cardiometabolic syndrome. **Rev Endocr Metab Disord**; (17): 51-60, 2016. DOI: 10.1007/s11154-016-9346-3.
212. SILVA, G. C et al. Endothelial dysfunction in DOCA-salt-hypertensive mice: role of neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide. **Clin Sci (Lond)**., 130(11): 895-906, 2016. DOI: 10.1042/CS20160062.
213. SMOLINSKA, S et al. Bradykinin Metabolism and Drug-Induced Angioedema. **Int J Mol Sci.**, 24(14):11649, 2023. DOI: 10.3390/ijms241411649.
214. SOLTIS & CASSIS. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. **Clin Exp Hypertens A.**, (13): 277-296, 1991. DOI: 10.3109/10641969109042063.
215. SOROKIN, V et al. Role of Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Interactions in Vessel Wall Inflammation. **Front Immunol.**, (20), 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.599415.
216. ŠPIRANEC, K et al. Endothelial C-Type Natriuretic Peptide Acts on Pericytes to Regulate Microcirculatory Flow and Blood Pressure. **Circulat.**, 138(5):494-508, 2018. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033383.
217. STOCLET, J. C et al. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. **Eur J Pharmacol.**, 375(1-3):139-155, 1999. DOI: 10.1016/s0014-2999(99)00221-6.
218. SUDANO, I et al. Secondary hypertension as a cause of treatment resistance. **Blood Press.**, 32(1): pg, 2023. DOI: 10.1080/08037051.2023.
219. SUN, X et al. Low-molecular-weight fractions of Alcalase hydrolyzed egg ovomucin extract exert anti-inflammatory activity in human dermal fibroblasts through the inhibition of tumor necrosis factor-mediated nuclear factor κ B pathway. **Nutr Res.**, 36(7):648-57, 2016 DOI: 10.1016/j.nutres.2016.03.006.

220. SZASZ & WEBB. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. **Clin Sci (Lond)**, (122):1-12, 2012. DOI: 10.1042/CS20110151.
221. SZASZ, T et al. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. **Vasc Health Risk Manag.**, (9): 105-116, 2013. DOI: 10.2147/VHRM.S33760.
222. TAKEDA, K et al. Central attenuation of baroreflex precedes the development of hypertension in DOCA-salt-treated rats. **Am J Hypertens.**, (3): 23-25, 1988. DOI: 10.1093/ajh/1.3.23s.
223. TAKEDA, K et al. Effects of salt and DOCA on hypothalamic and baroreflex control of blood pressure. **Clin Exp Hypertens A.**, (10): 289-299, 1988. DOI: 10.3109/10641968809075982.
224. TANAKA, M et al. Vasodilating effect of di-peptides in thoracic aortas from spontaneously hypertensive rats. **Biosci Biotechnol Biochem.**, 70(9): 2292-2295, 2006. DOI: 10.1271/bbb.60119.
225. TEDLA, Y. G et al. Association Between Long-Term Blood Pressure Variability and 10-Year Progression in Arterial Stiffness: The Multiethnic Study of Atherosclerosis. **Hypertens.**, 69(1): 118-127, 2017. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08427.
226. THANG et al. Macrophage depletion lowers blood pressure and restores sympathetic nerve α 2-adrenergic receptor function in mesenteric arteries of DOCA-salt hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, (309): 1186-1197, 2015. DOI: 10.1152/ajpheart.00283.2015.
227. THANG L. V et al. Macrophage depletion lowers blood pressure and restores sympathetic nerve α 2-adrenergic receptor function in mesenteric arteries of DOCA-salt hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 2015 Oct;309(7):H1186-97. DOI: 10.1152/ajpheart.00283.2015.
228. TOMAZELLI, C. A et al. Small artery remodeling and stiffening in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats involves the interaction between endogenous ouabain/Na + K + -ATPase/cSrc signaling. **J Hypertens.**, 41(10):1554-1564, 2023. DOI: 10.1097/HJH.0000000000003502.
229. TOMIOKA, H et al. Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions. **J Vasc Res.**, 36(4):311-320, 1999. DOI: 10.1159/000025659.
230. TORJESEN, A et al. Relations of Arterial Stiffness With Postural Change in Mean Arterial Pressure in Middle-Aged Adults: The Framingham Heart Study. **Hypertens.**, 69(4): 685-690, 2017. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08116.
231. TOSTES, R. C et al. Deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats display gender-related differences in ETB receptor-mediated vascular responses. **Br J Pharmacol.**, 130: 1092-1098, 2000. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703389.
232. TOUYZ, R. M et al. Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. **Can J Cardiol.**, 36(5): 659-670, 2020. DOI: 10.1016/j.cjca.2020.02.081.
233. TOUYZ, R. M et al. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovasc Res.**, 114(4):529-539, 2018. DOI: 10.1093/cvr/cvy023.
234. VALINSKY, W. C et al. Aldosterone, SGK1, and ion channels in the kidney. **Clin Sci (Lond)**, 132(2): 173-183, 2018. DOI: 10.1042/CS20171525.

235. VANHOUTTE, P. M et al. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. **Acta Physiol (Oxf)**. 2017 Jan;219(1):22-96. DOI: 10.1111/apha.12646.
236. VERANO-BRAGA, T et al. Time-resolved quantitative phosphoproteomics: new insights into Angiotensin-(1-7) signaling networks in human endothelial cells. **J Proteome Res.**, (11): 3370-3381, 2012. DOI: 10.1021/pr3001755.
237. VERMOT, A et al. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. **Antioxidants (Basel)**., 10(6): 1-55, 2021. DOI: 10.3390/antiox10060890.
238. VICTORIO, J. A et al. Spironolactone Prevents Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Vascular Dysfunction Induced by β -Adrenergic Overstimulation: Role of Perivascular Adipose Tissue. **Hypertens.**, 68(3): 726-735, 2016. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07911.
239. VICTORIO & DAVEL. Perivascular Adipose Tissue Oxidative Stress on the Pathophysiology of Cardiometabolic Diseases. **Curr Hypertens Rev.**, 16(3): 192-200, 2020. DOI: 10.2174/1573402115666190410153634.
240. VIEL. E. C et al. Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, (295): 281-288, 2008. DOI: 10.1152/ajpheart.00304.2008.
241. VINSON, G. P. The mislabelling of deoxycorticosterone: making sense of corticosteroid structure and function. **J Endocrinol.**, (211): 3-16, 2011. DOI: 10.1530/JOE-11-0178.
242. WANG, R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? **FASEB J.**, (16): 1792-1798, 2002. DOI: 10.1096/fj.02-0211hyp.
243. WENCESLAU & ROSSONI. Rostafuroxin ameliorates endothelial dysfunction and oxidative stress in resistance arteries from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: the role of Na⁺K⁺-ATPase/ cSRC pathway. **J Hypertens.**, (32): 542-554, 2014. DOI: 10.1097/HJH.000000000000059.
244. WU, R et al. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **J Hypertens.**, (19): 741-748, 2001. DOI: 10.1097/00004872-200104000-00011.
245. XIAO & HARRISON. Inflammation in Hypertension. **Can J Cardiol.**, (36): 635-647, 2020. DOI: 10.1016/j.cjca.2020.01.013.
246. YAMADA, Y et al. Hypotensive activity of novokinin, a potent analogue of ovokinin(2-7), is mediated by angiotensin AT(2) receptor and prostaglandin IP receptor. **Peptides**, (29):412-418, 2008. DOI: 10.1016/j.peptides.2007.11.017.
247. YAO, M et al. Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer. **Br J Cancer.**, (90): 712-719, 2004. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601489.
248. YEMANE, H et al. Neurohumoral mechanisms in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension in rats. **Exp Physiol.**, (95): 51-55, 2010. DOI: 10.1113/expphysiol.2008.046334.

249. YU, Z et al. Novel peptides derived from egg White protein inhibiting alpha-glucosidase. **Food Chem.**, (129):1376-1382, 2011. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.067.
250. YUAN, X. J et al. A mitochondrial uncoupler increases KCa currents but decreases KV currents in pulmonary artery myocytes. **Am J Physiol.**, 270(1 Pt 1): C321-331, 1996. DOI: 10.1152/ajpcell.1996.270.1.C321.
251. ZENG, Z. H et al. Control of vascular changes by renin-angiotensin-aldosterone system in salt-sensitive hypertension. **Eur J Pharmacol.**, (53): 129-133, 2004. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.09.022.
252. ZEWINGER, S et al. Apolipoprotein C3 induces inflammation and organ damage by alternative inflammasome activation. **Nat Immunol.**, 21(1): 30-41, 2020. DOI: 10.1038/s41590-019-0548-1.
253. ZHANG, L et al. Endothelial sodium channel activation mediates DOCA-salt-induced endothelial cell and arterial stiffening. **Metab.**, 130: 1-20, 2022. DOI: 10.1016/j.metabol.2022.155165.
254. ZHAO, Y et al. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **J Pharmacol Sci.**, (129): 83-94, 2015. DOI: 10.1016/j.jphs.2015.09.002.
255. ZHOU, N et al. Antioxidant Stress and Anti-Inflammatory Activities of Egg White Proteins and Their Derived Peptides: A Review. **J Agric Food Chem.**, (70): 5-20, 2022. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c04742.
256. ZICHA, J et al. Antidiuretic and pressor actions of vasopressin in age-dependent DOCA-salt hypertension. **Am J Physiol.**, (56): 138-145, 1989. DOI: 10.1152/ajpregu.1989.256.1.R138.

ANEXO I



CERTIDÃO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM ENSINO/PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 003/2020

Título: Uso de hidrolisado da clara do ovo como potencial protetor dos efeitos cardiovasculares da hipertensão arterial em modelo DOCA-sal em ratos

Data da aprovação: 25/03/2020

Período de vigência do projeto: 31/07/2022

Pesquisadores(a): Giulia Alessandra Wiggers Peçanha

Campus: Uruguaiana

Telefone: (55) 99914-7174

E-mail: giuliapecanha@unipampa.edu.br

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie / Linhagem / Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	92
Peso / Idade	200-300 g / 7 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFSM



Documento assinado eletronicamente por **CATIA ALINE VEIVERBERG, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 25/03/2020, às 10:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0273595 e o código CRC AAA413A5.