

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – DCF

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF –  
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCAR/UNESP

Júlio César Conceição Filho

Tese de Doutorado

**Utilização do laser de baixa intensidade (660nm) na  
hipertensão arterial: uma nova abordagem no tratamento.**

São Carlos

2019

Tese de Doutorado

**Utilização do laser de baixa intensidade (660nm) na hipertensão arterial: uma nova abordagem no tratamento.**

Tese de Doutorado apresentada pelo acadêmico Me. **Júlio César Conceição Filho**, aluno do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) da Universidade Federal de São Carlos. Como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues

**São Carlos**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Júlio César Conceição Filho, realizada em 17/12/2019:



---

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues  
UFSCar



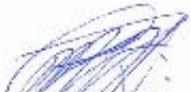
---

Prof. Dr. Guilherme Borges Peretra  
UFSCar



---

Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck  
UFSCar



---

Prof. Dr. Cassio Mascarenhas Rober Pires  
UNIARA



---

Profa. Dra. Luciana de Almeida Lopes  
NUPEN

## Agradecimentos

Quão difícil é agradecer?

Nunca tive muitas dificuldades em dizer obrigado, tão pouco em me sentir agradecido. Mas lembrar de todos que lhe foram importantes para alcançar um objetivo de muitos anos, não é uma tarefa tão fácil.

No momento de finalização desta Tese não tenho dúvidas das forças e pessoas a quem devo tanta gratidão.

Agradeço aos meus pais que tanto lutaram para que eu pudesse crescer de corpo e alma.

Agradeço ao meu pai, que após minha vida adulta aparentemente tão pouco fez. Mas, nunca me esquecerei quem foi a pessoa quem me trouxe à São Carlos pela primeira vez, me ajudando a colocar e tirar do porta malas de seu carro uma mala, uma bicicleta e claro um excelente pacote de papel higiênico, quem me deu o primeiro abraço de despedida assim que em fim, me mudei para São Carlos. Quem em vários momentos me “presenteou” com “alguns” trocados, os quais sempre deram um “salve” no momento certo.

Agradeço é claro à minha mãe, que durante a vida toda me deu o exemplo do estudo e do Ser Humano. Agradeço por várias e várias e várias conversas ao telefone que sempre afagaram nossa distância. Pelos diversos puxões de orelha e pelas cobranças sobre como estavam indo minhas pesquisas. Aos diversos meses em que foi o órgão de fomento dos meus estudos provendo uma “Bolsa Mamis” a qual nunca precisei prestar conta.

Agradeço à Fisiologia do Exercício que com seus encantos e com seus muitos desencantos foi a responsável, junto com o (foguinho) pela minha decisão de me mudar para São Carlos e decisão de iniciar a pós-graduação.

Não seria possível iniciar o Doutorado sem antes passar pelo mestrado. Não poderia mê esquecer nunca de agradecer minha Orientadora de Mestrado Marcia, quem abriu-me as portas para esse mundo tão louco da pesquisa científica.

Agradeço às pessoas que passaram em minha vida durante este período.

Eis que inicio o Doutorado e venho agradecer alguém que mereceria uma página inteira de agradecimentos e xingamentos rsrs.

Agradeço muito ao meu Orientador Gerson Jhonatan Rodrigues por me aceitar como orientando e por sempre exigir muito de mim. Peço desculpas pelas discussões e pelos momentos em que deixei aparentar desânimo ou preguiça (em alguns momentos era

isto mesmo). Aprendi muito com você e desde sentar e buscar soluções de problemas até deixar questões de lado e olhar para frente. Muito obrigado!

Agradeço aos meus amigos de laboratório Luis, Tereza, Grazielle, Cynthia, Camila, Ariane, Jorge e “minha” linda IC Bárbara.

Agradeço aos meus amigos de todas as repúblicas em que morei e que ainda mantemos contato e compartilhamos boas lembranças. Giz, Gustavo, Leu, Danilo (Salsisha), José Campanholi Neto (vulgo diretor da “CAPES”), Tiago (cebola) e Lucas. Aos meus milhares de amigos do DCF incluindo o FFC.

Agradeço a minha companheira de tantas brigas e amores, a mulher que me permitiu viver uma família. Nívea agradeço pelo seu carinho e pela sua paciência comigo. Agradeço a compreensão da rotina que foi necessária para finalizar este trabalho. Junto agradeço ao Joaquim moleque alegre, inteligente e que sempre traz felicidade para nossos dias.

Agradeço a DMC equipamentos por permitir utilizar seus aparelhos e pelos auxílios técnicos que tanto foram necessários durante este doutorado.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de doutorado que me permitiu aprofundar sobre a utilização de uma tecnologia que poderá melhorar muitas vidas e por acreditar que aqui, não estava fazendo balbúrdia.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## Resumo

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são as principais causadoras de mortes em todo mundo, aproximadamente 17 milhões de pessoas ou um terço de todas as mortes anuais. Destes óbitos causados pelas doenças cardiovasculares, aproximadamente 9,4 milhões são causadas pela hipertensão arterial. Na busca de reduzir estes números e melhorar a qualidade de vida e longevidade da população, diversos tratamentos vêm sendo desenvolvidos, sendo que na maioria dos casos o principal tratamento indicado é o farmacológico. Terapias envolvendo a utilização de tipos específicos de luz já são utilizados desde meados de 1971, sendo o laser de baixa intensidade uma das principais fontes de luz para estes tratamentos, utilizado vastamente na odontologia e na medicina para diversos tratamentos como psoríase, acne, úlceras, feridas, etc. Muitos estudos demonstraram que a terapia com fotobiomodulação (PBM) é capaz induzir o relaxamento do músculo liso vascular (MLV) de modo independente do endotélio. Este estudo avaliou o efeito do tratamento crônico com PBM em animais hipertensos, induzida pela obesidade. Foi possível verificar que ao longo de seis semanas de tratamento, a PBM foi capaz de reduzir a pressão arterial em valores próximos aos basais.

Palavras-chave: Laser de baixa intensidade, ILIB, hipertensão arterial sistêmica

## Abstract

According to data from the World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases are the main cause of death worldwide, approximately 17 million people or one third of all annual deaths. Of these deaths caused by cardiovascular diseases, approximately 9.4 million are caused by arterial hypertension. In order to reduce these numbers and improve the quality of life and longevity of the population, several treatments have been developed, and in most cases the main treatment indicated is pharmacological. Therapies involving the use of specific types of light have been used since mid-1971, with low intensity laser being one of the main sources of light for these treatments, widely used in dentistry and medicine for various treatments such as psoriasis, acne, ulcers, wounds, etc. Many studies have shown that photobiomodulation therapy (PBM) is able to induce vascular smooth muscle (MLV) relaxation independently of the endothelium. This study evaluated the effect of chronic treatment with PBM in hypertensive animals, induced by obesity. It was possible to verify that over six weeks of treatment, PBM was able to reduce blood pressure by values close to baseline.

## Lista de abreviaturas

ADMA	Dimetilarginina assimétrica
AHA	American heart association
CT	Controle
CT+L	Controle mais laser de baixa intensidade de baixa intensidade
DCV	Doença cardiovascular
DPH	Dieta palatável hiperlipídica
eNOS	NO sintáse endotelial
FR	Fatores de risco
GCs	Guanilato ciclável solúvel
GKP	Proteína quinase dependente de GMP
GpC	Monofosfato cíclico de guanosina
GTP	Trifosfato de Guanosina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
IL-1 beta	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
MLV	Músculo liso vascular
mm Hg	Milímetros de mercúrio
n	Número de animais
nm	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NUPEN	Núcleo de Pesquisa e Ensino de Fototerapia nas Ciências da Saúde
Ob	Obeso
Ob+L	Obeso mais laser de baixa intensidade de baixa intensidade
Ob+P	Obeso mais placebo
OMS	Organização mundial de saúde
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PBM	fotobiomodulação
PHFD	Dieta palatável hiperlipídica
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
FOX	Ferrous Oxidation-Xylenol Orange
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
SHR	Spontaneous hypertensive rat – ratos espontaneamente hipertensos
TNF- $\alpha$	Tumoral necrosis factor – $\alpha$ (fator de necrose tumoral – $\alpha$ )
NF- $\kappa\beta$	fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$
J	Jaule

CT	controle
----	----------

## Sumário

Agradecimentos .....	1
Resumo.....	3
Abstract .....	4
Lista de abreviaturas e siglas.....	5
1.Introdução.....	9
1.1Disfunção Endotelial.....	9
1.2Hipertensão Arterial.....	11
1.3Tratamentos disponíveis.....	12
1.4Terapia de fotobiomodulação (PBM).....	13
2.Objetivos .....	15
2.1Objetivos gerais.....	15
2.2Objetivos Específicos.....	15
3.Materiais e Métodos .....	16
3.1Animais.....	16
3.2Dieta palatável .....	17
3.3Terapia de fotobiomodulação (PBM).....	18
3.4Medida da pressão arterial .....	19
3.5Teste de resistência à insulina .....	19
3.6Quantificação da gordura corporal .....	19
3.7Quantificação da concentração de nitrito e nitrato (NOx) .....	20
3.8Determinação dos Níveis de Hidroperóxidos de Lipídios (FOX).....	21
3.9Quantificação de citocinas .....	22
3.10Análise de dados .....	22
4.Resultados.....	23
4.1Massa corporal e gordura corporal.....	23
4.2Glicemia de jejum e teste de resistência à insulina .....	24
4.3Respostas hemodinâmicas.....	25
4.4Concentração sérica de óxido nítrico (NO) .....	26
4.5Determinação dos Níveis de Hidroperóxidos de Lipídios (FOX).....	27
4.6Concentração de IL-1beta, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6.....	28
5.Discussão.....	30
6.Conclusões e perspectivas .....	40
7.Desdobramentos desta pesquisa .....	42
8.Referências Bibliográficas .....	45

# 1. Introdução

## 1.1. Disfunção Endotelial

Nos últimos anos o endotélio vascular foi apresentado como o maior órgão endócrino do corpo humano, visto que este apresenta funções autócrinas, endócrinas e parácrinas que são indispensáveis para a manutenção do tônus e homeostase vascular [1]. Qualquer alteração que provoque uma queda contínua da homeostase vascular como, a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) ou aumento de fatores que induzem vasoconstrição é caracterizada como disfunção endotelial [2].

O NO produzido pelas células endoteliais é uma das menores moléculas produzidas pelo organismo que é sintetizado a partir de uma reação na qual um dos dois nitrogênios presentes na L-arginina (2-amino-5-(diaminomethylidene-amino)pentanoic acid) é oxidado formando assim a L-citrulina (ácido 2-amino-5-(carbamoilamino)pentanoico), em uma reação que é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) [3]. Este, se difunde para o lúmen vascular e células do músculo liso vascular (MLV) provocando o relaxamento do músculo liso devido a interação do NO com o íon ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), tornando-a ativa. A alteração conformacional da GCs faz com que ocorra a fosforilação da molécula guanosina trifosfato (GTP), transformando-a em guanosina monofosfato cíclica (GMPc) [4]. A GMPc atua como segundo mensageiro e ativa a proteína quinase dependente de GMP (PKG) que fosforila diversas proteínas e diminui o influxo ou liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular ou aumenta o armazenamento de  $Ca^{2+}$  pelo retículo sarco-plasmático [5].

O NO também pode causar relaxamento do MLV por via independente de GMPc, ativando a abertura dos canais de potássio e o influxo dos íons de potássio promovendo a hiperpolarização da membrana celular [6] e ativação da Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático aumentando o armazenamento de Ca<sup>2+</sup> [7].

O termo “disfunção endotelial” refere-se a um desequilíbrio na produção endotelial de mediadores que regulam o tônus vascular, sendo que alguns estudos apresentam a relação do estilo de vida, obesidade e tabagismo com o desenvolvimento da disfunção endotelial [8-10]. Esta, também está associada com diversas doenças metabólicas e cardiovasculares como aterosclerose, síndrome metabólica, dislipidemia, diabetes tipo 2, outras doenças cardiovasculares [11-14] principalmente na hipertensão arterial. A fisiopatologia da disfunção endotelial é complexa e envolve diversos mecanismos, como a diminuição da biodisponibilidade de NO que pode ser causada por aumento na concentração de oxidantes e angiotensina II e a presença de dimetilarginina assimétrica (ADMA) que atua como um competidor com a L-arginina pela eNOS. Alguns dos fatores que podem afetar o endotélio e favorecer o desenvolvimento da disfunção endotelial e as suas consequências estão representados na Figura 1.

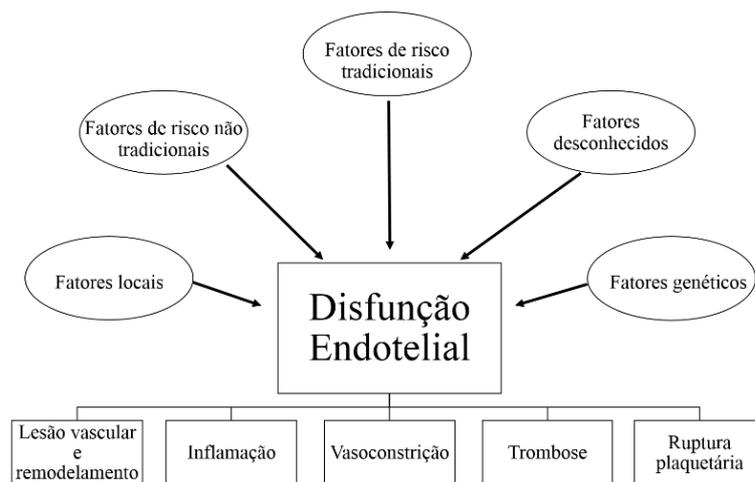


Figura 1. Fatores que podem afetar o endotélio e as consequências da disfunção endotelial. Adaptado de [1].

## 1.2. Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial, que é caracterizada por níveis elevados e sustentados da pressão arterial onde, a pressão arterial sistólica (PAS) é  $\geq 130\text{mmHg}$  e pressão arterial diastólica (PAD) é  $\geq 80\text{mm Hg}$  segundo a Associação Americana do Coração (AHA – American Heart Association)[15, 16]. A HAS é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o principal problema de saúde no mundo [17], levando à morte aproximadamente 9,4 milhões de pessoas por ano [18, 19]. No Brasil, inquéritos populacionais em cidades brasileiras nos últimos 20 anos apontaram uma prevalência de HAS acima de 30% [20, 21]. De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão, a HAS possui uma alta prevalência e baixas taxas de controle, é considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública [22].

Como mencionado anteriormente, diversos fatores podem provocar o desenvolvimento da hipertensão arterial, como predisposição genética, retenção de

sódio, obesidade, enrijecimento prematuro de artérias, diabetes e disfunção endotelial [23] e está geralmente associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) [22]. Os níveis de mortalidade por doenças cardiovasculares eleva-se constantemente à medida que a PA aumenta ou seja, com uma PA a partir de 115/75 mmHg há um crescimento linear no risco de DCV [22].

Logo, para proporcionar um aumento na expectativa de vida de pacientes com HAS, é necessário que a PA seja reduzida, sendo que, qualquer redução adicional da PAS abaixo de 140 mm Hg já é suficiente para diminuir o risco cardíaco [23].

### 1.3. Tratamentos disponíveis

Atualmente existem diversos tratamentos disponíveis para a HAS com o objetivo de abolir os riscos associados ao aumento da PA, implicando diretamente em uma melhora na qualidade de vida. O tratamento é baseado na eficácia em reduzir a PA assim como diminuir os riscos cardiovasculares associados, incluindo infarto agudo de miocárdio e insuficiência cardíaca. Ao mencionar os tratamentos existentes é necessário lembrar que a PA é determinada por três fatores: excreção de sódio pelos rins resultando em alteração no volume plasmático e volume corporal, trabalho cardíaco e tônus vascular [24], estes fatores controlam o volume intravascular, débito cardíaco e resistência vascular sistêmica, que são fatores hemodinâmicos determinantes para a PA. Tanto o sistema nervoso simpático quanto o sistema renina – angiotensina – aldosterona estão intimamente ligados no ajuste dos níveis de PA.

A hipertensão é uma doença com alta prevalência e baixa taxa de controle, com maior prevalência em idosos. Em estudo realizado pela *Nutrition Examination Survey* (NHANES III, 1995)[25], verificou-se que em indivíduos acima de 60 anos, 60% dos brancos e 71% dos negros são hipertensos, dos quais somente 50% estavam em tratamento. Daqueles que estavam em tratamento, somente 50% tinha o controle da pressão arterial [26-29]. A baixa taxa de controle tem diversos motivos incluindo os efeitos colaterais observados para os medicamentos anti-hipertensivos, pacientes não responsivos ao medicamento, erro na dose ingerida, doente não aceita tomar o medicamento [30], sendo que, aproximadamente 50% dos pacientes não tomam a medicação prescrita corretamente [31, 32]. No Brasil, os dados apresentados permitem observar que dois terços da população idosa, acima de 60 anos é hipertensa [33].

Por geralmente se tratar de múltipla medicação, mais de um medicamento de uso contínuo, efeitos colaterais como aumento da fadiga, disfunção sexual e aumento da diurese, o tratamento incomoda mais do que a própria doença, visto que esta é tipicamente assintomática [30]. Desta forma, a utilização do laser de baixa intensidade pode ser uma alternativa não farmacológica para o controle da pressão arterial com maior aceitação, com menos ou nenhum efeito colateral e ainda poderia ser associado ao fármaco em pacientes pouco responsivos aos anti-hipertensivos.

#### 1.4. Terapia por fotobiomodulação (PBM)

A terapia por PBM apresenta como uma alternativa mais barata, sem ou com menos efeitos colaterais, não invasiva e indolor para diversos tratamentos e já é

utilizada desde 1960 para acelerar a cicatrização de feridas e atualmente para o tratamento de vitiligo [34], psoríase, acne, e outras dermatites [35]. Segundo Chavantes e Tomimura, PBM reduz processos inflamatórios e edemas, altera a respostas micro e macro vasculares e promove analgesia [36]

Em 1955 Furchgott et. al. observaram que a luz em certas intensidades pode promover relaxamento do vaso sanguíneo, através de análise em miógrafo. Posteriormente diversos autores demonstraram que há fotorrelaxamento com diferentes tipos de luz em diferentes comprimentos de onda, desde então diversos artigos apresentam múltiplas fontes de luz com capacidade de promover relaxamento do MLV [36-39].

Sendo uma luz que não emite calor, o Laser de baixa intensidade (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), é a fonte de luz mais utilizada para estes experimentos. É importante ressaltar que nem todos os comprimentos de onda são capazes de promover o relaxamento do MLV, assim como, a potência e a intensidade da luz irradiada também é de suma importância, como afirma Plass et. al (ANO) ao demonstrar o relaxamento do MLV utilizando LED e Laser de baixa intensidade em um comprimento de onda de 670 e 680 nm respectivamente [37]. O mesmo trabalho também observou que o relaxamento muscular causado pela irradiação de LED e Laser de baixa intensidade no MLV ocorre independentemente da produção endotelial de NO, porém, ainda dependente da ativação da GCs pelo NO liberado a partir da irradiação com Laser de baixa intensidade ou LED [37].

Em estudo crônico realizado com ratos SHR, foi utilizado PBM (Laser de baixa intensidade diodo 780nm) por 7 semanas totalizando 21 aplicações de laser de baixa

intensidade, que eram realizadas na base da cauda do animal. Observou-se que os animais que tratados com a FBM apresentaram valores significativamente menores na PAD, na pressão arterial média e frequência cardíaca o que poderia representar uma nova alternativa para o tratamento da hipertensão arterial [36].

Apesar de haver diversos estudos sobre a utilização de laser de baixa intensidade em diversos tratamentos [40-42] não se conhece nenhum tratamento clínico que utiliza a PBM na prevenção ou no tratamento da hipertensão arterial. Visto que em estudos preliminares realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da UFSCar [43, 44] foi possível observar uma redução importante na pressão arterial sistólica de ratos hipertensos. Caso seja confirmado que a PBM estimule a redução da pressão arterial de maneira aguda e/ou crônica, isto facilmente poderia ser mais um novo recurso terapêutico na prática clínica, com a grande vantagem da inexistência de efeitos colaterais.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivos gerais

Determinar o efeito do tratamento crônico com laser de baixa intensidade (660 nm) em ratos hipertensos, bem como estudar possíveis mecanismos fisiológicos deste efeito.

### 2.2. Objetivos Específicos

Em ratos com hipertensão induzida por dieta obesogênica realizar a terapia crônica com laser de baixa intensidade de baixa intensidade e avaliar as diferentes

respostas hemodinâmicas, bem como o estudo dos mecanismos de ação do laser de baixa intensidade.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados 32 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos provenientes do biotério central da UFSCar e a partir de 9 semanas de idade foram alocados no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar sob responsabilidade do Prof. Dr. Wladimir Beck. Este trabalho foi realizado sob autorização da CEUA local com o número 8982101215.

Os animais foram divididos em 5 grupos:

- Grupo Controle (CT): alimentado com ração padrão;
- Grupo Obeso (Ob), o qual foi ofertado uma dieta hiperlipídica palatável;
- Controle + Laser de baixa intensidade (CT+L): para este grupo foi ofertado a dieta padrão e a PBM;
- Grupo Obeso + Laser de baixa intensidade (Ob+L): este grupo recebeu dieta hiperlipídica palatável mais a PBM;
- grupo obeso + placebo (Ob+P): este grupo recebeu dieta hiperlipídica palatável e foi submetido ao mesmo protocolo que o grupo Ob+L, no entanto o aparelho permaneceu desligado durante o período de aplicação.

Os animais foram alocados em grupos de quatro animais em cada caixa de polipropileno (dimensões), alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica palatável e água *ad libitum*. O biotério foi programado com ciclo invertido claro/escuro de 12 horas. As intervenções que ocorreram durante as 18 semanas estão descritas na figura 2.

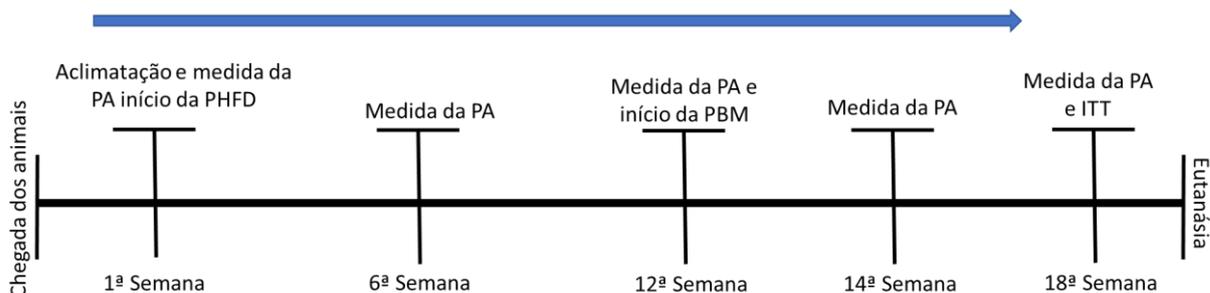


Figura 2. Protocolo realizado ao longo de 18 semanas

### 3.2 Dieta palatável

A dieta palatável hiperlipídica foi preparada conforme descrito por [45]. Foram misturados três partes de ração, duas partes de chocolate ao leite, duas partes de amendoim moído e uma parte de bolachas de maisena. Todos os ingredientes foram moídos, misturados e moldados em *pellets*. Uma nova ração era preparada a cada dois dias. Segundo Estadella esta dieta é composta por 48% de carboidratos, 20% de proteína, 20% de gordura e 4% de fibras. A densidade calórica da dieta palatável hiperlipídica calculada foi de 21,4 kJ/g e 17,0 kJ/g para a dieta padrão [45].

Tabela 1. Descrição dos macro nutrientes presentes na dieta.

Macro nutrientes	Dieta padrão (g/100g)	Primor <sup>®</sup>	Dieta Hiperlipídica (g/100g)
Carboidratos	49		48
Proteínas	23		20
Gorduras totais	4		20
Fibras	5		4
Valor energético	4.07 kcal/g		5.12 kcal/g

### 3.3 Terapia de fotobiomodulação (PBM)

A PBM teve início na décima segunda semana, o período anterior é o período necessário para ocorra um aumento da massa corporal e concomitante elevação da pressão arterial sistólica [46]. Os animais receberam a tratamento duas vezes por semana, às terças e quintas-feiras durante seis semanas conforme descrito na tabela 1, sempre realizado pelas mesmo operador. Para este protocolo foi utilizado um protótipo modificado do aparelho Physio lase II (DMC Equipamentos, São Carlos-SP, Brasil) de diodo alumínio gálio arsênio (AlGaAs) desenvolvido pelo NUPEN (Núcleo de Pesquisa e Ensino de Fototerapia nas Ciências da Saúde, São Carlos-SP, Brasil). Os emissores foram posicionados no abdômen dos animais sendo os principais parâmetros comprimento de ( $\lambda$ ) = 660 nm, potência 100mW por emissor, em modo contínuo e em contato com a pele do animal em um ângulo de 90°.

### 3.4 Medida da pressão arterial

A medida da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada no dia em que se antecedeu o início do experimento em seguida na sexta semana, décima segunda semana, décima quarta e décima oitava semana por pletismografia de cauda (*Powerlab 8/35, AD Instruments, Pty Ltda CO*) como descrito anteriormente por [47]. Então foi calculado a PAS média de 4 medidas sucessivas de cada animal.

### 3.5 Teste de tolerância à insulina

As concentrações sanguíneas de glicose foram mensuradas somente na última semana, 48 horas antes da eutanásia. Para isto, os animais permaneceram em jejum durante 10 horas antes do teste. Desta forma, foi realizado uma pequena incisão no final da cauda de cada animal com uma agulha para coleta de uma gota de sangue e a glicemia de jejum foi medida utilizando-se o glicosímetro Accu-Check® (Roche Diagnostic, Indianapolis, USA). Em seguida foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT), sendo realizada uma injeção intraperitoneal de insulina humana a 1U/kg de peso corporal. As amostras de sangue foram então coletadas 5, 15, 30, 45 e 60 minutos após a injeção de insulina [48].

### 3.6 Quantificação da gordura corporal

Para a quantificação da gordura corporal foram separadas e pesadas as gorduras mesentérica, epididimal e retroperitoneal. Estes tecidos foram extraídos

após eutanásia e pesados separadamente para avaliar a adiposidade central que foi calculada de maneira total e relativa ao peso corporal.

### 3.7 Quantificação da concentração de nitrito e nitrato (NO<sub>x</sub>)

A concentração de óxido nítrico no soro foi obtida por meio da concentração de seus subprodutos nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), conhecidas em conjunto como NO<sub>x</sub>, descrita por Rodrigues *et al.* O método de quimioluminescência NO / ozônio foi realizado utilizando o NO Analyzer 280i (Sievers, Boulder, CO, USA). Para isto foi utilizada uma amostra de 40 µl de soro que em seguida foi diluída em 40 µl de álcool isopropílico, congelada e centrifugada para desproteíntização da amostra.

Das amostras desproteíntizadas, utilizou-se o volume de 5,0 µL que foi injetado na câmara de reação do analisador contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em 1N de HCL a 95° C) que converte o nitrito em NO, em quantidades equimolares. O NO é sugado para a câmara de quimioluminescência do analisador, que por sua vez reage com o ozônio (O<sub>3</sub>) formando dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). O NO<sub>2</sub><sup>-</sup> apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície fotossensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico em que área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de nitrato na amostra. A curva padrão foi preparada com nitrato de sódio nas concentrações 5, 10, 15, 25, 50 e 100 µM [49].

### 3.8 Determinação dos Níveis de Hidroperóxidos de Lipídios (FOX)

Os hidroperóxidos de lipídios são indicadores do processo de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica foi quantificada pelo método FOX (Ferrous Oxidation-Xylenol Orange), como descrito por Jiang et al [50].

O método FOX é baseado na oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  (sulfato ferroso amoniacal) a  $\text{Fe}^{3+}$  pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de um pigmento complexador de  $\text{Fe}^{3+}$ , o alaranjado de xilenol. Cerca de 30  $\mu\text{g}$  de aorta dos ratos (previamente tratada com TCA 10%) foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente com 900  $\mu\text{L}$  de mistura reativa contendo 100  $\mu\text{M}$  de alaranjado de xilenol, 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  (sulfato ferroso amoniacal), 25 mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e 4 mM de butiliato de hidroxitolueno (BHT) em metal 90% (v/v). O  $\text{Fe}^{3+}$  formado na presença de hidroperóxidos reage com o alaranjado de xilenol formando um composto colorido com pico de absorção em 560nm.

Para o cálculo foi utilizado o coeficiente de extinção molar de  $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  do complexo  $\text{Fe}^{3+}$  alaranjado de xilenol para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hidroperóxido linoleico ou butil hidroperóxido.

Os resultados foram expressos em nmol de hidroperóxido por mg de proteína. O método "Xilenol Orange" é simples, não exige equipamentos sofisticados, os resultados avaliam efetivamente o conteúdo de hidroperóxidos de lipídios em extratos de tecidos. O ensaio FOX apresenta boa correlação com o ensaio TBARS.

### 3.9 Quantificação de citocinas

Para a quantificação de citocinas foi utilizado o ensaio multiplex (MILLIPLEX MAP kit, Milliplex®, Merck Millipore, Alemanha) com a tecnologia Luminex® Magpix™ (Austin, TX, EUA). O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante. As concentrações de citocinas / quimiocinas foram calculadas pelo software Milliplex Analyst 5.1® usando uma curva padrão com ajuste de spline cúbico (escala logarítmica).

Tabela 2: Parâmetros do Laser de baixa intensidade (por ponto de aplicação)

	In Vivo
Comprimento de onda	660
Modo de operação	Contínuo
Potência [mW]	100
Polarização	No
Tamanho do spot [cm <sup>2</sup> ]	0,0295
Formato	Elíptico
Irradiância [mW/cm <sup>2</sup> ]	3,4
Tempo de exposição [sec]	56
Fluência [J/cm <sup>2</sup> ]	190,4
Energia [J]	5,6
Número de pontos irradiados	1 - 6
Modo de aplicação	Contato

### 3.10 Análise de dados

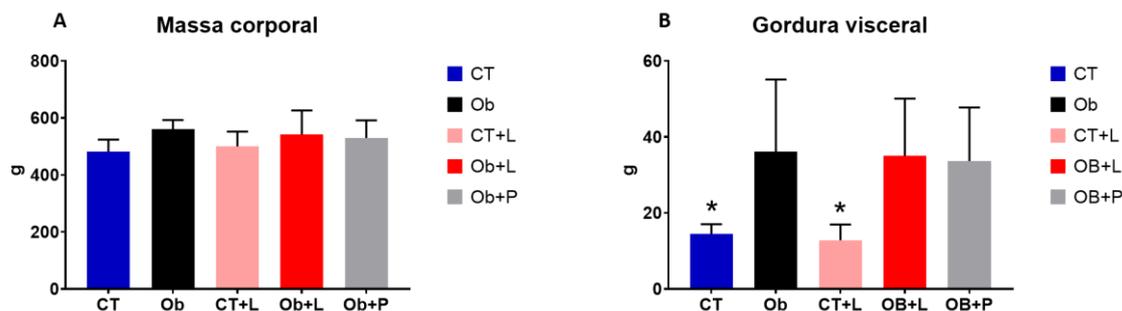
Os dados numéricos obtidos das variáveis analisadas de cada grupo (média ± desvio padrão - D.P.) foram comparados por meio de análise de variância

paramétrica (ANOVA one-way) seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Toda análise foi realizada por meio do software Prisma 8<sup>®</sup> (GraphPad) adotando-se um nível de significância menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. Resultados

### 4.1 Massa corporal e gordura corporal

Ao final do experimento, todos os animais possuíam a mesma massa corporal, conforme apresentado na figura 3A (CT:  $482,4 \pm 41,6$  g,  $n=9$ ; OB:  $560,4 \pm 32,2$  g;  $n=8$ ; CT + L:  $500,3 \pm 52,0$ g,  $n=9$ ; Ob+L:  $541,5 \pm 81,0$ g,  $n=8$ ; Ob+ P:  $529,8 \pm 62,0$ g,  $n=8$ ). No entanto, a dieta palatável proposta por Estadela e colaboradores foi eficaz em promover diferenças na composição corporal dos ratos que a receberam (Ob:  $36,0\text{g} \pm 19,0\text{g}$ ,  $n=8$  : Ob+L:  $35,0\text{g} \pm 15,0$  g,  $n=8$ ; Ob+P:  $31,6\text{g} \pm 14,0\text{g}$ ,  $n=8$  em comparação com os animais que receberam dieta padrão (CT:  $14,4\text{g} \pm 2,5\text{g}$ ,  $n=9$ ; CT+L  $12,8\text{g} \pm 4,1\text{g}$ ,  $n=9$ ), conforme apresentado na figura 3B. Os animais que receberam DPH possuíam em média o dobro de gordura visceral em comparação aos animais do grupo controle.



**Figura 3. A** - massa corporal na 18ª semana. Não houve diferença entre os grupos tratados com dieta padrão e DPH ( $p > 0,05$ ). **B** - massa de gordura visceral total (somatório das gorduras mesentérica, epididimal e retroperitoneal). Os animais tratados com ração padrão apresentaram menor acúmulo de gordura quando comparados aos animais que receberam DPH. Os animais que receberam DPH apresentaram maior acúmulo de massa gorda no tecido visceral, em comparação com os grupos controles. \* = estatisticamente diferente de CT e CT+L ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2 Glicemia de jejum e teste de resistência à insulina

Além do ganho de peso, no final de 18 semanas, a DPH foi capaz de elevar os níveis de glicose no sangue em jejum dos grupos Ob ( $130 \pm 12$  mg/dL,  $n = 8$ ), Ob+P e Ob+L (Ob:  $130$  mg/dl  $n=8$ ; Ob+P:  $126$  mg/dl  $\pm 9$   $n=8$ ; Ob+L  $127$  mg/dl  $\pm 11$ ,  $n=8$ ) comparado ao grupo CT ( $91$  mg/dl  $\pm 7$   $n=9$ ) com valor de  $p < 0,05$ . Ao analisar no gráfico a área sob a curva, é possível observar que a resistência à insulina também permaneceu diferente entre os grupos Ob, Ob+P e Ob+L quando comparados ao grupo CT (Ob:  $4933 \pm 429$ ,  $n=8$ ; Ob+P:  $4868 \pm 209$ ,  $n=8$ ; Ob+L:  $4933 \pm 642$ ,  $n=8$ ; CT:  $3496 \pm 347$   $n=9$ ).

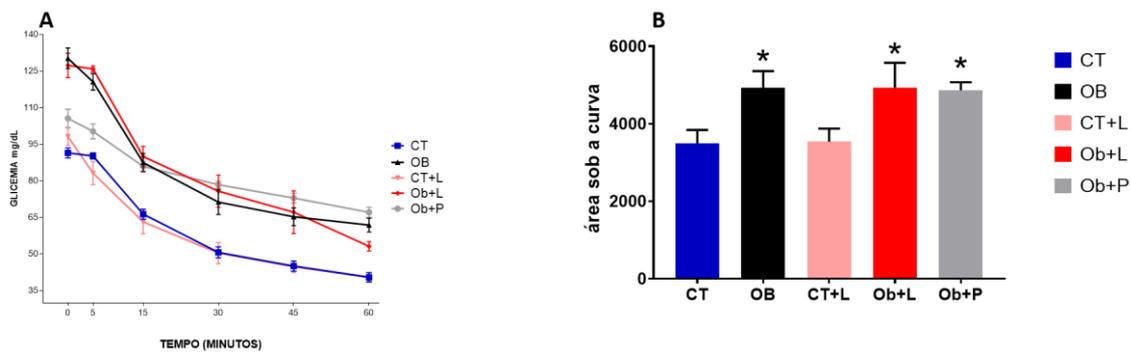


Figura 4. A - teste de tolerância à insulina. Os grupos tratados com DPH mostraram uma pequena diminuição da concentração de glicose no sangue ao longo do tempo, quando comparados aos grupos que receberam dieta padrão. B - Área sob a curva. Os animais tratados com DPH tiveram uma área maior em comparação com CT e CT+L. Também demonstra que a terapia PBM não foi capaz de reverter a resistência à insulina promovida pela DPH.

### 4.3 Respostas hemodinâmicas

Após seis semanas recebendo a DPH, foi possível observar um aumento significativo da PAS (Ob:  $126,3 \pm 2$  mmHg, n=8; Ob+L:  $126,2 \pm 2$  mmHg, n=8; Ob+P:  $124,6 \pm 4$  mmHg, n=8) entre a 1ª semana até a 12ª semana (Ob:  $149,1 \pm 2$  mmHg, n=8; Ob+L:  $150,2 \pm 4$  mmHg, n=8; Ob+P:  $147 \pm 3$  mmHg, n=8), enquanto o grupo que recebeu dieta padrão não teve alterações significativas nos valores de pressão arterial no mesmo período (CT:  $125,0 \pm 1$  mmHg, n=9, 1ª semana:  $125,1 \pm 2$  mmHg, n=9, 12ª semana), dados presentes na figura 5. Entre os objetivos do trabalho estava responder se a terapia com PBM duas vezes por semana seria capaz de promover alguma alteração da PAS em animais não obesos. Desta maneira as respostas hemodinâmicas observadas no grupo CT+L foram similares as respostas do grupo controle, não mostrando diferenças durante todo o experimento (figura 5). Após o início da terapia com PBM na 12ª semana é possível observar que a PAS dos grupos Ob e Ob+P continuou a aumentar durante as semanas subsequentes (Ob:  $152,7 \pm 3$  mmHg, n=8 na 14ª semana;  $154,3 \pm 2$  mmHg,

na 18ª semana; Ob+P:  $152,3 \pm 6$  mmHg n=8 na 14ª semana e  $153,1 \pm 7$  mmHg na 18ª semana). No entanto, os animais tratados com PBM (grupo Ob+L) tiveram uma redução da pressão arterial de  $10$  mmHg  $\pm 7$  entre a 12ª e a 14ª semana. Contudo, uma maior redução da pressão arterial foi observada entre a 12ª e a 18ª semana, com uma redução total da PAS de  $18$  mmHg ( $\pm 6$ ). Demonstrando eficácia da terapia com PBM na redução da pressão arterial de ratos com obesidade induzida por dieta palatável.

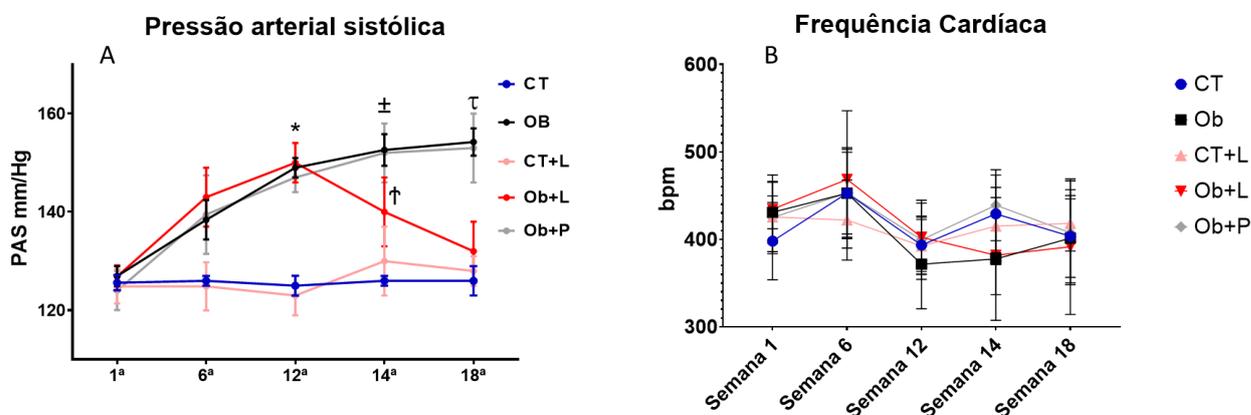


Figura 5. A - Evolução da PAS durante 18 semanas. Os animais tratados com DPH apresentaram aumento da PAS na 6ª semana, enquanto os grupos CT e CT + Laser de baixa intensidade mantiveram o valor basal da PAS durante todo o experimento. Na 12ª semana, o grupo Ob+L iniciou a terapia com PBM e apresentou uma diminuição ao longo das semanas subsequentes, enquanto os grupos com Ob e Ob+P apresentam tendência de aumento da PAS. \*, Ob, Ob+L e Ob+P diferentes de CT e CT+L.  $\pm$ , Ob e Ob+P diferentes de CT e CT + L.  $\dagger$ , Ob+L diferente de CT e Ob.  $\tau$ , Ob e Ob+P diferentes de Ob+L, CT + L e CT. ( $p < 0,05$ ) B - Registro da frequência cardíaca ao longo de 18 semanas. Não foi encontrado diferenças estatísticas.

#### 4.4 Concentração sérica de óxido nítrico (NO)

Por meio da análise da quantificação da concentração sérica de NO, medida à partir da concentração de nitrito e nitrato, foi possível avaliar que após quatro dias desde a última aplicação do laser de baixa intensidade ou da realização do placebo não houve diferença na concentração de NO presente no soro dos animais (CT:

$37,1 \pm 7 \mu\text{M}$  n=9; CT+L:  $41,4 \pm 9 \mu\text{M}$  n=9; Ob:  $38,3 \pm 11 \mu\text{M}$  n=8; Ob+L:  $45,6 \pm 6 \mu\text{M}$  n=8; Ob+P:  $45,1 \pm 13 \mu\text{M}$  n=8).

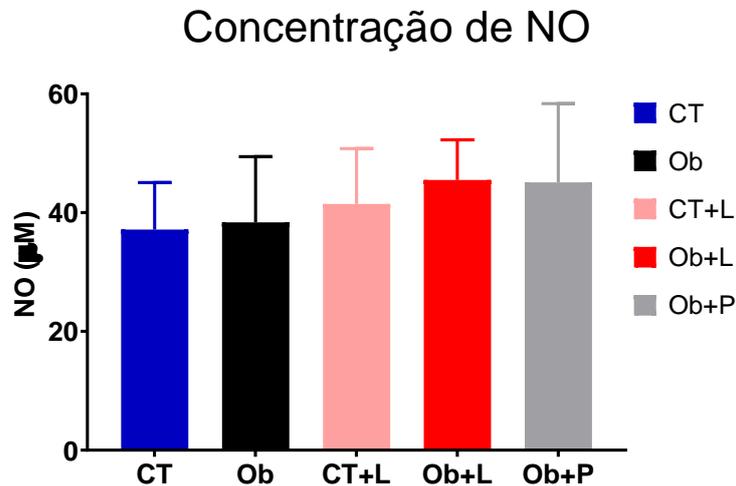


Figura 6. Concentração sanguínea de óxido nítrico.

#### 4.5 Determinação dos Níveis de Hidroperóxidos de Lipídios

Os hidroperóxidos de lipídios são indicadores do processo de peroxidação lipídica, o qual é capaz de transformar macrófagos em células espumosas, aumentando a adesão, ativação e migração dos monócitos, propiciando a formação das placas de ateromas que estão envolvidas no desenvolvimento de algumas comorbidades [51]. O tratamento com laser de baixa intensidade não foi eficaz em diminuir a lipoperoxidação (figura 7). Em trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa, foi observado que a dieta hiperlipídica também aumentou a lipoperoxidação em artéria aorta [46], mostrando-se um modelo eficaz para estudar estresse oxidativo induzido pela lipoperoxidação.

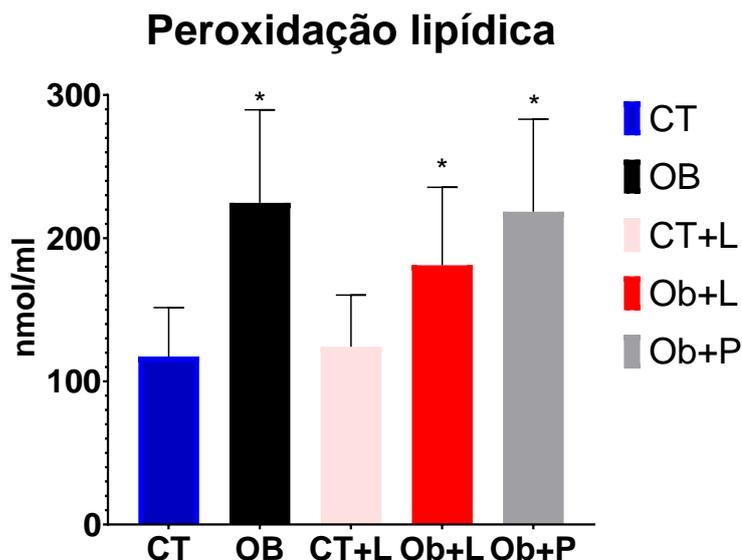


Figura 7. Peroxidação lipídica de aortas. Os animais que receberam DPH apresentaram maior nível de peroxidação lipídica na aorta em comparação aos animais que receberam a dieta padrão. \*indica diferença CT e CT+L  $p > 0,05$ .

#### 4.6 Concentração de IL-1beta, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6

Após quantificação utilizando o kit de análises MILLIPLEX<sup>®</sup>, não foram encontradas diferenças significativas entre a concentração de IL-1 beta, uma citocina pró inflamatória, quando comparado entre os grupos CT, Ob, CT+L, Ob+L e Ob+P respectivamente (CT:  $24,4 \pm 12$  pg/ml n=9; Ob:  $19,0 \pm 7$  pg/ml n=8; CT+L:  $26,8 \pm 8$  pg/ml n=9; Ob+L:  $18,6 \pm 11$  pg/ml n=8; Ob+P:  $18,9 \pm 10$  pg/ml n= 8) (figura 8A).

A IL-10 possui ação citocina anti-inflamatória e neste estudo sua concentração no soro ficou muito elevada nos animais do grupo CT ( $366,5 \pm 111,7$  pg/ml n=9) em comparação aos demais grupos (Ob:  $20,1 \pm 11,9$  pg/ml n=8; CT+L:  $61,4 \pm 18,6$  pg/ml n=9; Ob+L:  $25,2 \pm 16,2$  pg/ml n=8; Ob+L:  $22,9 \pm 16,8$  pg/ml n=8) onde o valor de  $p < 0,0001$  (figura 8B).

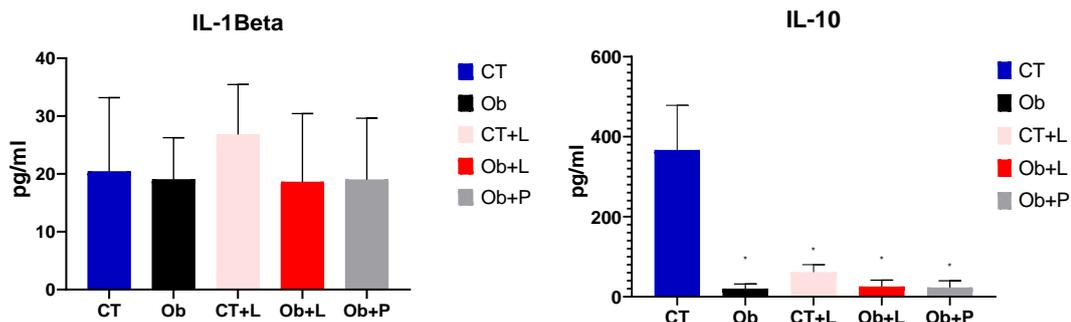


Figura 8. A – Concentração plasmática de IL-1 Beta. Não houve diferenças entre as concentrações de IL-1 Beta entre os grupos. B – Concentração plasmática de IL-10. A concentração de IL-10 foi maior no grupo CT em comparação aos demais grupos. \* = diferente de CT  $p < 0,05$

A concentração plasmática de IL-6, citocina com atividade pró inflamatória, foi diferente entre os grupos Ob ( $64,2 \pm 21$  pg/ml) apresentando uma resposta inflamatória maior que a dos grupos CT, CT+L e Ob+L ( $28,1 \pm 24$  pg/ml  $n=9$ ;  $26,4 \pm 5$  pg/ml  $n=9$ ;  $5,8 \pm 4$  pg/ml  $n=8$ ) respectivamente, com valor de  $p < 0,0001$ . Assim como o grupo Ob+L apresentou uma resposta inflamatória menor que a do grupo Ob+P ( $39,6 \pm 13$  pg/ml  $n=8$ ) com valor de  $p < 0,0001$ . Este resultado demonstra que a terapia por laser de baixa intensidade (660 nm) foi capaz de promover uma redução da resposta inflamatória mediada por IL-6 (Figura 9A).

Por fim, a quantificação da concentração de TNF-  $\alpha$  foi menor no grupo Ob+L ( $0,86 \pm 0,38$  pg/ml,  $n=8$ ) enquanto os grupos CT, Ob, CT+L e Ob+P apresentaram respectivamente concentrações de  $1,7 \pm 0,3$  pg/ml,  $n=9$ ;  $1,6 \pm 0,3$  pg/ml  $n=8$ ;  $1,7 \pm 0,5$  pg/ml,  $n=9$ ;  $1,7 \pm 0,4$  pg/ml,  $n=8$  e o valor de  $p < 0,01$ . Todos os grupos, com exceção do Ob+L apresentaram valores elevados de TNF- $\alpha$  em comparação ao grupo Ob+L. Esta redução demonstra que assim como os níveis circulantes de IL-6,

a terapia de PBM também foi capaz de reduzir os níveis circulantes de TNF- $\alpha$ , reduzindo as respostas inflamatórias mediadas pelo mesmo conforme apresentado na figura 9.

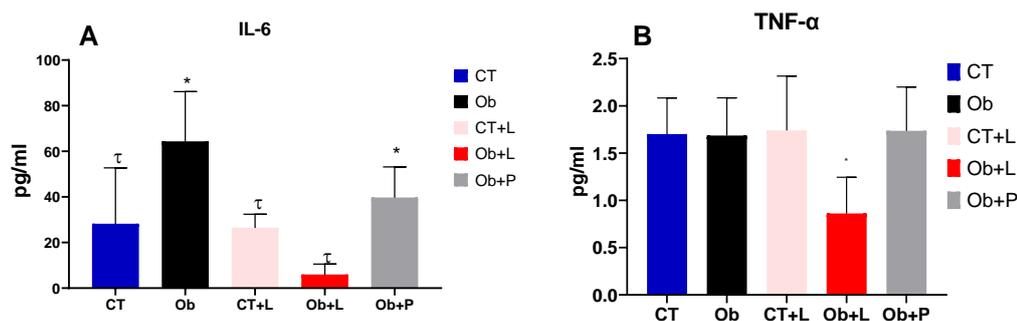


Figura 9. A – concentração plasmática de interleucina-6. Os grupos Ob e Ob+P apresentaram maior concentração comparado aos animais dos grupos CT, CT+L e Ob+L. Sendo o laser de baixa intensidade capaz de reduzir a concentração de IL-6 \*, diferente de Ob+L;  $\tau$ , diferente de Ob. B – Concentração plasmática de TNF- $\alpha$ . Todos os grupos apresentaram valores elevados de TNF- $\alpha$  com exceção do grupo Ob+L que apresentou uma redução destes valores. \*, diferente de CT, CT+L, OB e Ob+P.

## 5. Discussão

A obesidade traz com ela diversos fatores que podem influenciar diretamente no desenvolvimento da hipertensão, entre estes fatores estão o aumento do estresse oxidativo, fatores inflamatórios, fatores de estresse do ambiente e a resistência à insulina [52], assim como o aumento da adiposidade visceral que possui uma relação direta com a hipertensão [53].

Neste estudo, ao contrário do que foi observado por Estadella e colaboradores, a dieta palatável hiperlipídica não foi capaz de induzir o aumento da massa corporal (Erro! Fonte de referência não encontrada.) dos animais comparados

com o grupo controle [45], no entanto, o trabalho apresentado Estadella e colaboradores teve duração de 8 semanas, período em que a DPH foi fornecida aos animais, ao passo que neste estudo os animais permaneceram recebendo a DPH durante 18 semanas.

Apesar de não induzir alterações no peso final dos animais, a dieta palatável hiperlipídica foi capaz de promover alterações na composição corporal dos animais, ao longo das 18 semanas de experimento, como demonstrado na figura 2. Este aumento da gordura visceral que pode estar relacionado com o aumento da pressão arterial, está em consonância com outros trabalhos nos quais a mesma dieta foi utilizada [46, 54], e que demonstraram aumento do acúmulo de gordura visceral nos animais alimentados com a DPH quando comparados com os animais alimentados com a dieta padrão.

Entretanto, o tratamento com PBM não foi capaz de induzir alterações na massa corporal e tão pouco reduzir o acúmulo de gordura visceral dos animais que receberam a DPH, uma vez que não houve diferença entre o grupo Ob e o grupo Ob+L, assim como, também não foi capaz de promover alterações no acúmulo de gordura visceral dos animais que foram alimentados com dieta padrão, tendo em vista que o peso da gordura visceral dos animais do grupo CT foi similar ao do grupo CT+L.

Ao comparar as diferenças de PAS entre os grupos que receberam dieta padrão e os grupos que receberam DPH, é possível observar que houve um aumento significativo da pressão arterial dos animais que foram alimentados com DPH

enquanto os grupos que foram alimentados com dieta padrão permaneceram todo o experimento com valores similares da PAS.

Oishi *et al.* observaram um aumento semelhante na pressão arterial, com a mesma dieta [46], assim como Singh, que em 2011 demonstrou um aumento similar ao encontrado neste estudo, também usando DPH [55]. Analisando e comparando estes resultados, é possível afirmar que o modelo escolhido para promover o aumento da pressão arterial foi assertivo, levando a um aumento significativo da PAS ao longo de 12 semanas, valor este, que permaneceu elevado ao longo de 18 semanas nos grupos Ob e Ob+P.

Assim como a obesidade, a resistência à ação da insulina também possui um papel importante para o desenvolvimento da hipertensão [52, 56, 57] mediado pelo aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, aumento do tônus simpático e aumento da sensibilidade ao sódio, todos estes, promovendo o desenvolvimento da disfunção endotelial [56] e geralmente está associada à obesidade.

Neste estudo os animais que foram alimentados com dieta padrão apresentaram valores de glicemia de jejum de 10 horas menores quando comparados com os animais que receberam a DPH. Tal diferença implica na eficácia da DPH em promover alterações da concentração de glicose sanguínea de jejum após 18 semanas. Em estudo onde os animais receberam a mesma dieta durante um período de 15 semanas, Duarte *et al.* não observaram alterações na glicemia de jejum [54], assim como em seu trabalho, um estudo em que os animais foram alimentados com a DPH durante um período de 8 semanas, Estadella *et al.*

também não observaram alterações na concentração de glicose sanguínea. Estes dados levam a crer que para que ocorra uma alteração na glicemia de jejum utilizando-se a dieta proposta é necessário um período maior que 15 semanas. Tal afirmação necessita de mais dados para oriundos de futuras pesquisas para que possa ser comprovada ou refutada.

A PBM aparentemente possui uma ação benéfica em relação ao metabolismo da glicose. Em um estudo conduzido por Silva *et. al.* demonstrou, em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica de 8 semanas, a melhora no metabolismo da glicose e redução da resistência à insulina após 4 semanas de tratamento com PBM, utilizando laser infravermelho com comprimento de onda de 780nm [58] e aplicação realizada no quadríceps, membros superiores e no abdome dos animais. Infelizmente, até o presente momento não foi encontrado nenhum outro trabalho que avaliou valores da glicemia de jejum e a resistência à ação da insulina de ratos hipertensos sob tratamento crônico com PBM, seja em um comprimento de onda de 660nm ou outros comprimentos e outros espectros como vermelho, infravermelho próximo e infravermelho. Desta maneira, este é o primeiro trabalho a demonstrar tais efeitos, embora a terapia com PBM (680nm) não tenha sido capaz de promover redução da glicemia de jejum no grupo Ob+L assim como não foi eficaz em causar um aumento da sensibilidade à insulina no mesmo grupo quando comparado com os grupos Ob e Ob+P como apresentado nas figuras 3 e 4. Tão pouco o grupo CT+L não apresentou nenhuma diferença do grupo CT.

Ao comparar as respostas deste trabalho e as observadas por Silva *et al.*, é necessário levar em consideração as diferenças entre o comprimento de onda e as

espécies utilizadas em cada estudo. Mesmo assim, quando observado os resultados apresentados por Silva, boa parte deles está relacionada com alterações musculares relacionadas à captação de insulina pela célula muscular, visto que o sistema muscular é um o principal captador e estocador de glicose mediado ou não pela ação da insulina [59], como o aumento da quantidade de transportadores de insulina (GLUT4) no grupo que recebeu PBM com laser de baixa intensidade 780nm quando comparados ao grupo que recebeu a dieta hiperlipídica. Neste trabalho o laser de baixa intensidade (660nm) foi aplicado somente na região abdominal o que pode explicar a diferença entre os resultados. Dessa maneira seria interessante a realização de novos estudos comparando a aplicação da PBM (660nm) sobre grandes grupos musculares e as respostas relacionadas ao metabolismo da glicose e ação da insulina.

Alguns estudos buscaram avaliar as respostas hemodinâmicas induzidas pela PBM. Em estudo anterior realizado por nosso grupo, Oishi et al. demonstrou um efeito agudo da PBM em animais hipertensos, usando um modelo de hipertensão renovascular e comprimento de onda de 660 nm (fluência = 119 J / cm<sup>2</sup> e potência = 100 mW) [43]. Oishi e colaboradores demonstraram neste trabalho uma redução na PAS de 24,5 ± 3,4mmHg. Tomimura *et al.*, por meio de aplicação crônica com laser de baixa intensidade no comprimento de onda de 780nm (fluência = 30 J/cm<sup>2</sup>, potência = 40mW e 21 aplicações) observaram uma redução na PAD de 14 mmHg e manutenção da PAS em SHR [36] após 7 semanas de aplicação na base da cauda dos animais. Em nosso estudo, uma redução semelhante de 18 ± 6 mmHg foi observada na PAS. Este resultado demonstra que a terapia com PBM foi eficaz em

promover uma redução da pressão arterial, no entanto, com quase metade das aplicações realizadas por Tomimura e uma semana a menos. Essa comparação demonstra uma possível otimização do protocolo, obtendo melhores resultados em um menor tempo de tratamento, possivelmente causado por uma maior eficácia do laser de baixa intensidade vermelho de 660 nm e o local de aplicação.

Os mecanismos de ação relacionados a essa redução da PAS promovida pela PBM ainda não são completamente compreendidos, algumas das alterações metabólicas observadas neste trabalho podem influenciar estas reduções como por exemplo a pressão arterial, que, pode ser reduzida pela diminuição do acúmulo da gordura corporal [60]. Infelizmente, não foram observadas diferenças na soma das gorduras visceral, mesentérica e epididimal dos animais Ob, Ob+L e Ob+P. Isso demonstra que a terapia com PBM sozinha foi capaz de alterar a PAS dos ratos, independentemente do acúmulo de gordura visceral nestes animais. Por outro lado, nossos dados demonstram que a PBM é capaz de promover uma redução significativa da PAS em ratos hipertensos, mesmo sem alteração significativa da gordura corporal.

Tomimura et al. sugeriram que um dos mecanismos que podem estar promovendo estes resultados é a redução da PAS causada por uma diminuição da frequência cardíaca (FC) observada no estudo. No entanto, em nosso estudo, não houve diferenças significativas na frequência cardíaca entre nenhum dos grupos (figura 5). Buzinari e colaboradores demonstraram que a aplicação aguda com laser de baixa intensidade 660 nm foi capaz de induzir a queda da pressão arterial em ratos SHR [44]. Contudo não foi observado diferença entre a frequência

cardíaca entre os grupos placebo e os que receberam irradiação do laser de baixa intensidade.

De maneira controversa, De Moraes e colaboradores [61], em um estudo que avaliou respostas a aplicação aguda da PBM (660nm) em animais também submetidos ao protocolo de hipertensão renal, ao avaliar o efeito de diferentes quantidades de energia aplicada nos animais, similar a um efeito dose resposta, observou uma redução da frequência cardíaca destes animais quando aplicadas energias entre 28,2 J e 55,8 J e um aumento da frequência cardíaca a partir de 111,6 J. Na presente pesquisa, a energia total em cada aplicação era de 33,6 J por ponto o que ao final de seis semanas de tratamento não influenciou na frequência cardíaca dos animais. Logo, a frequência cardíaca apresentou redução em dois dos trabalhos discutidos aqui, assim como não apresentou diferenças no trabalho publicado por Buzinari e col. o que indica que as possíveis alterações na frequência cardíaca podem não ser o principal determinante para a redução da pressão arterial.

A vasodilatação é um outro fator que pode ter induzido a redução da pressão arterial e que também foi investigada neste trabalho. A vasodilatação induzida pelo NO ocorre principalmente pela ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs), enzima que catalisa a produção de guanosina-3', 5'-monofosfato cíclica (GMPc) [4]. Em menor concentração, o NO modula algumas respostas fisiológicas, como o relaxamento de células musculares lisas vasculares (VSMC) que requer níveis entre 10 e 30 nM de NO [62]. Desta forma, um incremento de na concentração de NO

pode induzir maior efeito hipotensor, o que poderia explicar a hipotensão mais acentuada sob o efeito da PBM em ratos hipertensos.

Em um estudo realizado por Vladimirov et al. em 2000 [63], foi demonstrado que a hemoglobina age como um fotoceptor, promovendo a liberação de NO pela hemoglobina (NO-Hemoglobina) induzida pela PBM. Assim como Buzinari e col., que também observaram aumento na concentração plasmática de NO em uma sessão aguda com PBM (660nm). De maneira controversa, ao final de 6 semanas de tratamento com laser de baixa intensidade, não foram observadas alterações na concentração plasmática de NO entre os diferentes grupos (figura 6), o que nos leva a crer que os mecanismos crônicos de redução da pressão arterial podem ser diferentes dos os mecanismos agudos.

É importante ressaltar que no trabalho apresentado por Vladimirov, os dados apresentados foram resultados de uma experimentação *in vitro*, com respostas imediatas à aplicação do laser de baixa intensidade, assim como Buzinari realizou a coleta de sangue logo após o término da coleta de dados da pressão arterial. Em ambos os casos os efeitos na concentração de NO era medida logo após a irradiação com laser de baixa intensidade. Os dados da concentração de NO apresentados nesta tese foram de amostras de sangue coletadas quatro dias após a última aplicação do laser de baixa intensidade, tempo este suficiente para se degradar toda a concentração de nitrato/nitrito.

Alguns estímulos como a superalimentação, principalmente à custa de alimentos ricos em gorduras saturadas, e também influências ambientais como estresse crônico poderiam, somados, causar um aumento de secreção de citocinas

como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  [64], que levariam à resistência à insulina e ao agrupamento de fatores de risco cardiovascular associado com a adiposidade (síndrome metabólica). A síndrome metabólica, a junção de anormalidades metabólicas onde seu diagnóstico é realizado a partir da determinação da existência de três fatores, que incluem a baixa concentração de HDL-c, alta concentração de triglicerídeos, obesidade abdominal, glicemia de jejum elevada e hipertensão [65].

Ao analisar o quadro metabólico dos animais deste estudo é possível afirmar que há presença de síndrome metabólica, visto que os animais que receberam a DPH apresentam, em relação ao grupo controle, valores elevados de triglicerídeos, maior acúmulo de gordura abdominal, pressão arterial elevada e glicemia de jejum também elevada.

Alguns estudos demonstram alta relação positiva entre a concentração de IL-6 e a hipertensão [66, 67]. Aparentemente o processo inflamatório induzido pela alta concentração de IL-6 leva ao desenvolvimento da disfunção endotelial. Outros estudos demonstram que a concentração plasmática de IL-6 é diretamente proporcional aos níveis de angiotensina II [68, 69] demonstrando a importância da concentração de IL-6 na manutenção da hipertensão particularmente mediada pela angiotensina II. Desta forma, há uma forte relação da concentração de IL-6 e início, progressão e manutenção da hipertensão também pela redução da concentração de NO [68]. A figura 10, adaptada de Didion apresenta as principais respostas da IL-6 induzidas pela angiotensina II.

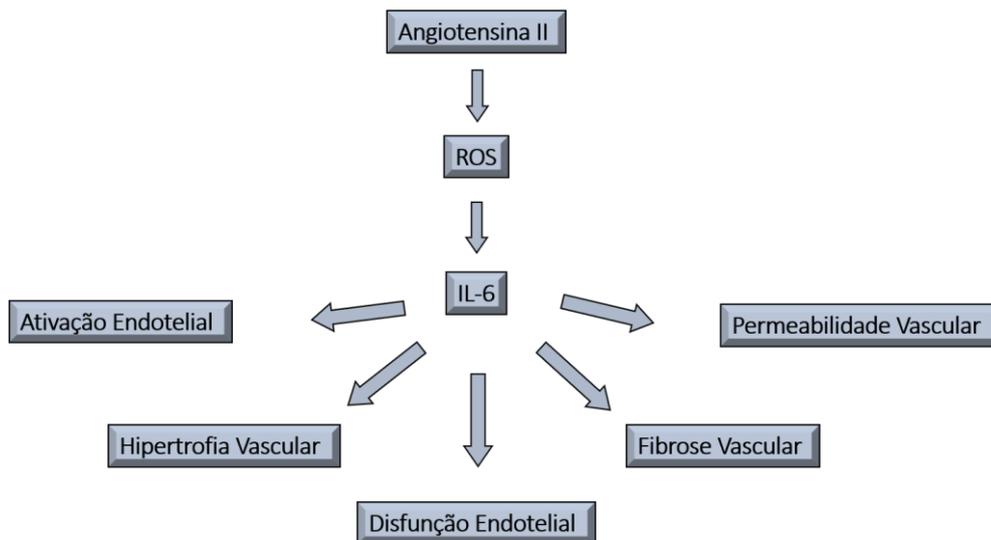


Figura 10 Ações da IL-6 mediada pela angiotensina II. Adaptado de [68]

Os animais avaliados neste estudo, apresentaram valores distintos na concentração de IL-6. O grupo Ob apresentou alta concentração de IL-6 circulante ao passo que os valores observados nos grupos CT, CT+L e Ob+L foram menores. Em um estudo realizado com inflamação promovida por queimaduras em ratos, Kim et. al. observou a redução da concentração de IL-6 após tratamento com PBM (808nm) durante 14 dias [70], outros estudos demonstraram a redução de IL-6 frente a PBM utilizando diversos comprimentos de onda [71-73] no entanto este parece ser o primeiro trabalho que apresenta respostas da concentração de IL-6 em ratos obesos e hipertensos frente a PBM em 660nm.

Na obesidade humana e em modelos animais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica ocorre uma hiperexpressão de TNF- $\alpha$  ao nível do tecido adiposo, secundário a um aumento de síntese e a uma estabilização da citocina no adipócito com aumento de sua vida média. Além disto, o nível circulante de receptores solúveis de TNF- $\alpha$  correlaciona-se com o índice de massa corpórea e a cintura

abdominal e é seis vezes maior em indivíduos obesos [74, 75]. O TNF- $\alpha$  também pode ativar o fator de transcrição nuclear kB (NF-kB), promovendo diversas alterações inflamatórias no tecido vascular, induzir a diminuição da expressão de eNOS. Essas alterações inflamatórias do tecido vascular resultam em ativação endotelial, com disfunção endotelial e hipertensão [76-78]. Outras evidências sugerem que o TNF- $\alpha$  prejudica a vasodilatação em vários leitos vasculares como arteríolas de camundongos e coronárias de ratos [79, 80]. A alta concentração de TNF- $\alpha$  parece estar ligada a diminuição da biodisponibilidade de NO por meio de dois mecanismos distintos, o primeiro é a redução da síntese de NO e o segundo é aumentando a remoção do NO [79-82]. Neste estudo não foi observado diferença entre a concentração de TNF- $\alpha$  dos grupos CT e Ob, o que demonstra que o TNF- $\alpha$  não foi o único responsável pelo aumento da pressão arterial nos grupos que receberam a DPH, contudo, a PBM foi capaz de reduzir a concentração de TNF- $\alpha$  circulante, o que seguramente reduziu atividade pró-inflamatória e demais efeitos que promovem a disfunção endotelial, degradação do NO e redução da síntese de NO. Novamente, os dados relacionados à concentração de NO, ficaram prejudicados devido ao longo tempo entre a última aplicação do laser de baixa intensidade e coleta do sangue dos animais.

## 6. Conclusões e perspectivas

A hipertensão arterial é uma doença que pode ser provocada por diversos fatores que promovem a disfunção endotelial, geralmente relacionados com processos inflamatórios na parede do leito vascular como processos ateroscleróticos. Fatores como obesidade, aumento do acúmulo de gordura na

região abdominal, estresse e resistência à insulina entre outros também são capazes de promover um processo de degradação da função endotelial, gerando um desbalanço entre a produção de fatores vasoconstritores e vasodilatadores.

Neste trabalho foi avaliado primariamente as respostas pressóricas frente a aplicação fotobiomodulação (660nm) duas vezes por semana em ratos com hipertensão induzida pela obesidade. Os animais induzidos a obesidade com DPH apresentaram constante aumento da pressão arterial ao longo das 18 semanas de experimento, enquanto os animais que receberam dieta padrão permaneceram com a pressão em valores constantes durante o mesmo período.

A aplicação de laser de baixa intensidade vermelho (660nm) duas vezes por semana foi capaz de promover redução da pressão arterial dos animais logo a partir da segunda semana de tratamento sendo esta redução mais pronunciada ao final da sexta semana de tratamento. Contudo, pouco pode se observar sobre as principais causas da redução da pressão arterial, visto que as principais hipóteses deste trabalho não puderam ser confirmadas. Dentre todas a hipóteses acerca das razões para a redução da pressão arterial promovida pelo tratamento com PBM testadas neste trabalho, a única em que foi possível observar uma ação positiva da PBM foi a redução de fatores inflamatórios, representados pelo TNF- $\alpha$  e pela IL-6, ambos apresentaram concentrações plasmáticas reduzidas no grupo Ob+L em comparação ao grupo Ob.

Este estudo demonstra a capacidade da terapia por PBM, laser de baixa intensidade 660nm, em promover redução da pressão arterial em animais obesos e

hipertensos, o qual pode estar diretamente relacionado à redução da concentração de fatores inflamatórios.

Por fim, faz-se necessário repensar algumas etapas do protocolo, com objetivo de auxiliar futuros trabalhos.

Em primeiro lugar ao realizar um experimento crônico que envolve um número grande de animais, reorganizaria a chegada dos animais e a distribuição dos grupos de modo a ter um grupo pequeno de animais nos dias do teste de tolerância a glicose, nos dias de medição da PA e no dia da eutanásia. Isto diminuiria o tempo necessário para realizar as medidas da PA que duravam uma manhã inteira e em alguns dias, um pouco mais. Assim, todos os animais teriam suas medidas de PA em horários bem mais próximos. Esta reorganização no número de animais também reduziria o tempo gasto nos dias da eutanásia, permitindo por exemplo realizar o ensaio de reatividade vascular, resultado que auxiliaria compreender melhor o processo da disfunção endotelial.

Outra alteração significativa no protocolo seria a data da eutanásia, que não deveria ter mais do que 48 horas de intervalo entre a última aplicação do laser de baixa intensidade e a coleta dos tecidos. Isto porque alguns dos marcadores plasmáticos considerados essenciais, talvez ainda estivessem presentes no sangue, como por exemplo o NO.

## 7. Desdobramentos desta pesquisa

Ao observar os resultados iniciais relacionados a redução da pressão arterial, decidiu-se iniciar um projeto paralelo à terapia de PBM em animais. Tal projeto

constituiu-se em realizar uma sessão aguda de PBM, laser de baixa intensidade 660nm, em humanos normotensos e hipertensos.

Este projeto foi aceito pelo CONEP com o protocolo número 52005315.2.0000.5504 e intitulado Utilização do laser de baixa intensidade de baixa intensidade na hipertensão arterial: uma nova abordagem no tratamento.

Neste projeto após triagem dos participantes, ocorrem dois encontros para a realização de ensaio agudo. No primeiro dia de coleta é realizada a uma coleta de sangue pré e uma hora pós aplicação do laser de baixa intensidade para quantificação da concentração de NO. Também é realizada colocação do aparelho Dyna Mapa+ para que seja realizada a medida e registro dos valores de PAS, PAD, MAP e PP durante 12 minutos em repouso e durante 24 horas após a aplicação do laser de baixa intensidade. Em seguida é realizada a aplicação do laser de baixa intensidade (660nm, 30J) ou placebo, durante cinco minutos. Após o período de uma hora após a aplicação do laser de baixa intensidade é realizada a coleta de uma segunda amostra de sangue e em seguida o avaliado é liberado para suas atividades diárias habituais. Na semana seguinte os avaliados realizam novamente o mesmo procedimento para a aplicação do laser de baixa intensidade ou placebo.

Todas as coletas são realizadas no Hospital Universitário sob aprovação da Gerência de Ensino e Pesquisa ofício número 031-2018/GERÊNCIA DE ENSINO E PESQUISA/EBSER/MEC.

Apesar de ser um projeto promissor, não foi possível realizar todas as coletas necessárias para conclusão da pesquisa. Tivemos muita dificuldade para recrutar

indivíduos hipertensos que não estavam sob uso de medicação uma vez que o projeto foi divulgado por meio de cartazes e mídias sociais. Também foi realizada uma tentativa de contato com mais de 20 médicos cardiologistas e especialidades afins da cidade de São Carlos-SP, os quais não retornaram nenhuma das tentativas de contato. Desta forma, o projeto segue em andamento sob regência do Prof. Dr. Gerson J. Rodrigues e permanecerá em execução até finalização do projeto.

## 8. Referências

1. Hadi, H.A., C.S. Carr, and J. Al Suwaidi, *Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome*. Vasc Health Risk Manag, 2005. **1**(3): p. 183-98.
2. Lerman, A. and J.C. Burnett, Jr., *Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion*. Circulation, 1992. **86**(6 Suppl): p. III12-19.
3. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication*. Biochem Pharmacol, 1989. **38**(11): p. 1709-15.
4. Rapoport, R.M., M.B. Draznin, and F. Murad, *Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation*. Nature, 1983. **306**(5939): p. 174-6.
5. Gewaltig, M.T. and G. Kojda, *Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential*. Cardiovasc Res, 2002. **55**(2): p. 250-60.
6. Bolotina, V.M., et al., *Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle*. Nature, 1994. **368**(6474): p. 850-3.
7. Cohen, R.A., et al., *Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase and inhibition of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx*. Circ Res, 1999. **84**(2): p. 210-9.
8. Raitakari, M., et al., *Weight reduction with very-low-caloric diet and endothelial function in overweight adults: role of plasma glucose*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 124-8.
9. Green, D.J., et al., *Exercise-induced improvement in endothelial dysfunction is not mediated by changes in CV risk factors: pooled analysis of diverse patient populations*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(6): p. H2679-87.
10. Oida, K., et al., *Effect of cilostazol on impaired vasodilatory response of the brachial artery to ischemia in smokers*. J Atheroscler Thromb, 2003. **10**(2): p. 93-8.
11. Taddei, S., et al., *Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients*. Circulation, 1996. **94**(6): p. 1298-303.
12. Celermajer, D.S., et al., *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis*. Lancet, 1992. **340**(8828): p. 1111-5.
13. Schiekofer, S., et al., *Endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. Semin Thromb Hemost, 2000. **26**(5): p. 503-11.
14. Engler, M.M., et al., *Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY) Trial*. Circulation, 2003. **108**(9): p. 1059-63.
15. Malachias, M., et al., *7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 3 - Clinical and Complementary Assessment*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2016. **107**: p. 14-17.
16. Bakris, G., W. Ali, and G. Parati, *ACC/AHA versus ESC/ESH on hypertension guidelines: JACC guideline comparison*. Journal of the American College of Cardiology, 2019. **73**(23): p. 3018-3026.
17. Organization, W.H., *A global brief on Hypertension: Silent killer, global public health crisis*, 2013, World Health Organization. p. 40.
18. Bauer, U.E., et al., *Prevention of chronic disease in the 21st century: elimination of the leading preventable causes of premature death and disability in the USA*. Lancet, 2014. **384**(9937): p. 45-52.
19. Dodhia, H., et al., *Modelling the impact on avoidable cardiovascular disease burden and costs of interventions to lower SBP in the England population*. J Hypertens, 2012. **30**(1): p. 217-26.

20. Cesarino, C.B., et al., *Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto - SP*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2008. **91**: p. 31-35.
21. Gus, I., et al., *Prevalência, reconhecimento e controle da hipertensão arterial sistêmica no estado do Rio Grande do Sul*. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2004. **83**: p. 424-428.
22. *Apresentação: Diretrizes Brasileiras de Hipertensão VI*. Jornal Brasileiro de Nefrologia, 2010. **32**: p. III-III.
23. Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert, C., et al., *Treatment of hypertension*. Can J Diabetes, 2013. **37 Suppl 1**: p. S117-8.
24. Gradman, A.H., et al., *Combination therapy in hypertension*. J Am Soc Hypertens, 2010. **4(1)**: p. 42-50.
25. Hicks, L.S., et al., *Association of region of residence and immigrant status with hypertension, renal failure, cardiovascular disease, and stroke, among African-American participants in the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)*. Ethn Dis, 2003. **13(3)**: p. 316-23.
26. Prencipe, M., et al., *Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in the elderly: results from a population survey*. J Hum Hypertens, 2000. **14(12)**: p. 825-30.
27. Stergiou, G.S., et al., *Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in Greece: the Didima study*. Am J Hypertens, 1999. **12(10 Pt 1)**: p. 959-65.
28. Tugay Aytekin, N., et al., *Distribution of blood pressures in Gemlik District, north-west Turkey*. Health Soc Care Community, 2002. **10(5)**: p. 394-401.
29. Gu, D., et al., *Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in the Chinese adult population: International Collaborative Study of Cardiovascular Disease in Asia (InterASIA)*. Diabetologia, 2003. **46(9)**: p. 1190-8.
30. Krousel-Wood, M., *Hypertension and Health Behaviors in Females Across the Lifespan*. Am J Med Sci, 2015. **350(1)**: p. 36-41.
31. Haynes, R.B., H.P. McDonald, and A.X. Garg, *Helping patients follow prescribed treatment: clinical applications*. JAMA, 2002. **288(22)**: p. 2880-3.
32. Krousel-Wood, M.A., et al., *Barriers to and determinants of medication adherence in hypertension management: perspective of the cohort study of medication adherence among older adults*. Med Clin North Am, 2009. **93(3)**: p. 753-69.
33. Picon, R.V., et al., *Prevalence of hypertension among elderly persons in urban Brazil: a systematic review with meta-analysis*. American journal of hypertension, 2013. **26(4)**: p. 541-548.
34. Byun, J.W., et al., *A successful helium-neon laser de baixa intensidade and topical tacrolimus combination therapy in one child with vitiligo*. Dermatol Ther, 2015.
35. Erceg, A., et al., *The efficacy of pulsed dye laser de baixa intensidade treatment for inflammatory skin diseases: a systematic review*. J Am Acad Dermatol, 2013. **69(4)**: p. 609-615 e8.
36. Tomimura, S., et al., *Hemodynamic effect of laser de baixa intensidade therapy in spontaneously hypertensive rats*. Arq Bras Cardiol, 2014. **103(2)**: p. 161-4.
37. Plass, C.A., et al., *Light-induced vasodilation of coronary arteries and its possible clinical implication*. Ann Thorac Surg, 2012. **93(4)**: p. 1181-6.
38. Furchgott, R.F., S.J. Ehrreich, and E. Greenblatt, *The photoactivated relaxation of smooth muscle of rabbit aorta*. J Gen Physiol, 1961. **44**: p. 499-519.
39. Matsunaga, K. and R.F. Furchgott, *Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta*. J Pharmacol Exp Ther, 1989. **248(2)**: p. 687-95.
40. Figueiredo, A.L., et al., *Laser de baixa intensidade therapy in the control of oral mucositis: a meta-analysis*. Rev Assoc Med Bras, 2013. **59(5)**: p. 467-74.
41. Sgolastra, F., et al., *Laser de baixa intensidades for the treatment of dentin hypersensitivity: a meta-analysis*. J Dent Res, 2013. **92(6)**: p. 492-9.

42. Jin, R., et al., *Laser de baixa intensidade therapy for prevention and treatment of pathologic excessive scars*. *Plast Reconstr Surg*, 2013. **132**(6): p. 1747-58.
43. Oishi, J.C., et al., *Hypotensive acute effect of photobiomodulation therapy on hypertensive rats*. *Life Sci*, 2017.
44. Buzinari, T.C., et al., *Photobiomodulation induces hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats*. *Laser de baixa intensidades Med Sci*, 2019.
45. Estadella, D., et al., *Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats*. *Nutrition*, 2004. **20**(2): p. 218-24.
46. Oishi, J.C., et al., *Endothelial Dysfunction and Inflammation Precedes Elevations in Blood Pressure Induced by a High-Fat Diet*. *Arq Bras Cardiol*, 2018. **110**(6): p. 558-567.
47. Rodrigues, G.J., et al., *Long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012. **60**(2): p. 193-8.
48. Ropelle, E.R., et al., *Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation*. *J Physiol*, 2006. **577**(Pt 3): p. 997-1007.
49. Pereira, F.H., M.E. Batalhao, and E.C. Carnio, *Correlation between body temperature, blood pressure and plasmatic nitric oxide in septic patients*. *Rev Lat Am Enfermagem*, 2014. **22**(1): p. 123-8.
50. Jiang, Z.Y., A.C. Woollard, and S.P. Wolff, *Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method*. *Lipids*, 1991. **26**(10): p. 853-6.
51. Lima, S.C., et al., *[Plasma lipid profile and lipid peroxidation in overweight or obese children and adolescents]*. *J Pediatr (Rio J)*, 2004. **80**(1): p. 23-8.
52. Levy, E., et al., *The Epigenetic Machinery in Vascular Dysfunction and Hypertension*. *Curr Hypertens Rep*, 2017. **19**(6): p. 52.
53. de Simone, G., et al., *Obesity and hypertensive heart disease: focus on body composition and sex differences*. *Diabetol Metab Syndr*, 2016. **8**: p. 79.
54. Duarte, A.C.G.d.O., et al., *Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos*. *Revista de Nutrição*, 2006. **19**: p. 341-348.
55. Singh, R., et al., *Impact of obesity on hypertension-induced cardiac remodeling: role of oxidative stress and its modulation by gemfibrozil treatment in rats*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **50**(2): p. 363-70.
56. D'Elia, L. and P. Strazzullo, *Excess Body Weight, Insulin Resistance and Isolated Systolic Hypertension: Potential Pathophysiological Links*. *High Blood Press Cardiovasc Prev*, 2018. **25**(1): p. 17-23.
57. Han, T., et al., *Temporal Relationship Between Hyperuricemia and Insulin Resistance and Its Impact on Future Risk of Hypertension*. *Hypertension*, 2017. **70**(4): p. 703-711.
58. Silva, G., et al., *Infrared photobiomodulation (PBM) therapy improves glucose metabolism and intracellular insulin pathway in adipose tissue of high-fat fed mice*. *Laser de baixa intensidades Med Sci*, 2018. **33**(3): p. 559-571.
59. Argiles, J.M., et al., *Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk: Roles in Health and Disease*. *J Am Med Dir Assoc*, 2016. **17**(9): p. 789-96.
60. Malachias, M.V.B., et al., *7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 3 - Clinical and Complementary Assessment*. *Arq Bras Cardiol*, 2016. **107**(3 Suppl 3): p. 14-17.
61. De Moraes, T., et al., *Energy-dependent effect trial of photobiomodulation on blood pressure in hypertensive rats*. *Laser de baixa intensidades in Medical Science*, 2019: p. 1-6.
62. Thomas, D.D., et al., *The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling*. *Free Radic Biol Med*, 2008. **45**(1): p. 18-31.

63. Vladimirov, Y., et al., *NO-hemoglobin may be a light-sensitive source of nitric oxide both in solution and in red blood cells*. J Photochem Photobiol B, 2000. **59**(1-3): p. 115-22.
64. Pickup, J.C. and M.A. Crook, *Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?* Diabetologia, 1998. **41**(10): p. 1241-8.
65. Rochlani, Y., et al., *Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds*. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2017. **11**(8): p. 215-225.
66. Fernandez-Real, J.M., et al., *Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 1154-9.
67. Esteve, E., et al., *Serum interleukin-6 correlates with endothelial dysfunction in healthy men independently of insulin sensitivity*. Diabetes Care, 2007. **30**(4): p. 939-45.
68. Didion, S.P., *Cellular and Oxidative Mechanisms Associated with Interleukin-6 Signaling in the Vasculature*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(12).
69. Gomolak, J.R. and S.P. Didion, *Angiotensin II-induced endothelial dysfunction is temporally linked with increases in interleukin-6 and vascular macrophage accumulation*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 396.
70. eun-Jeong Kim , S.-H.K., *Anti-inflammatory effects of low-level laser de baixa intensidade in burn wound models in rats*. Physical Therapy Rehabilitation Science, 2017. **6**.
71. Mojarad, N., et al., *The role of low level laser de baixa intensidade therapy on neuropathic pain relief and interleukin-6 expression following spinal cord injury: An experimental study*. J Chem Neuroanat, 2018. **87**: p. 60-70.
72. Fernandes, M.R.U., et al., *Photobiomodulation increases intrusion tooth movement and modulates IL-6, IL-8 and IL-1beta expression during orthodontically bone remodeling*. J Biophotonics, 2019. **12**(10): p. e201800311.
73. Lee, J.H., et al., *Anti-inflammatory effects of low-level laser de baixa intensidade therapy on human periodontal ligament cells: in vitro study*. Laser de baixa intensidades Med Sci, 2018. **33**(3): p. 469-477.
74. Lopez, H.F., *Hypertension and inflammation: contribution of obesity*. Revista brasileira de hipertensão, 2007.
75. Zhang, H., et al., *Role of TNF-alpha in vascular dysfunction*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(3): p. 219-30.
76. Lyon, C.J., R.E. Law, and W.A. Hsueh, *Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis*. Endocrinology, 2003. **144**(6): p. 2195-200.
77. Zhang, J., et al., *Proinflammatory cytokines downregulate gene expression and activity of constitutive nitric oxide synthase in porcine pulmonary artery endothelial cells*. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997. **96**(1): p. 71-87.
78. Seidel, M., H. Billert, and M. Kurpisz, *Regulation of eNOS expression in HCAEC cell line treated with opioids and proinflammatory cytokines*. Kardiologia, 2006. **64**(2): p. 153-8; discussion 159-60.
79. Gao, X., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in Lepr(db) mice*. Circulation, 2007. **115**(2): p. 245-54.
80. Picchi, A., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome*. Circ Res, 2006. **99**(1): p. 69-77.
81. Goodwin, B.L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(2): p. H1115-21.
82. Greenberg, S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelium-dependent relaxation*. J Appl Physiol (1985), 1993. **74**(5): p. 2394-403.

Anexos