

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TEREZA CRISTINA BUZINARI

PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO EFEITO HIPOTENSIVO E
VASODILATADOR INDUZIDO PELA FOTOBIMODULAÇÃO
UTILIZANDO LASER DE 660 nm

SÃO CARLOS
2021

TEREZA CRISTINA BUZINARI

PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO EFEITO HIPOTENSIVO E
VASODILATADOR INDUZIDO PELA FOTOBIMODULAÇÃO
UTILIZANDO LASER DE 660 nm

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP, para obtenção do título de Doutora em Ciências, Área de Concentração Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues

SÃO CARLOS

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Tereza Cristina Buzinari, realizada em 24/03/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues (UFSCar)

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani (UNESP)

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione (UFSCar)

Prof. Dr. Luciana Almeida Lopes (NUPEN)

Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli (USP)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Dedico este trabalho aos meus pais João e Clarinda, ao meu marido Felipe, aos meus irmãos, meus cunhados, cunhadas, e meus amados sobrinhos. Enfim, a esta família que amo, pelo constante incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que por Sua infinita misericórdia me fez merecedora do céu através do sacrifício de Seu Filho Jesus Cristo. A Ele o poder, a honra e a glória para sempre. Agradeço à Maria, mãe de Jesus e nossa, por ser exemplo de mulher em minha existência. Seu sim pela vida, sua força, coragem e fé me impulsionam para o Eterno.

Ao professor Gerson Jhonatan Rodrigues, pela paciência no decorrer destes anos que estive no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e por ser uma constante fonte de motivação e incentivo durante minha pós-graduação. Obrigada pela sua dedicação e por tornar possível a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani, Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli, à Profa. Dra. Luciana Almeida Lopes e Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione, pela disponibilidade para participar desta banca examinadora e pelas contribuições acerca desta Tese de doutorado.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), por oferecer toda estrutura e ferramentas que permitiram a conclusão deste trabalho.

Aos coordenadores, professores e secretários do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/UNESP (PIPGCF), por toda atenção e dedicação.

Agradeço infinitamente aos meus pais, João e Clarinda, meus exemplos de vida, honestidade e sabedoria. É impossível segurar a emoção ao lembrar de tudo o que fizeram para que eu chegasse até aqui. A minha gratidão será eterna. Amo vocês.

Ao meu marido Felipe, amor da minha vida, a pessoa que mais aguentou meu estresse e ansiedade, que se alegrou com minhas conquistas, e me apoiou durante estes anos. Te amo!

Aos melhores irmãos do mundo: Clarice, Claudete, João, Maria e Crislaine. Sou infinitamente grata por todo apoio que me deram para a realização

dos meus sonhos. Agradeço também aos meus cunhados, cunhadas e sobrinhos que tanto amo.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, aos que ainda permanecem no Laboratório e aos que já concluíram alguma etapa: Luís, Camila, Cynthia, Nayara, Bárbara, Gabriel, Bianca, Stefany, José, Thiago, Júlio, Alexandre Kanashiro, Manuela, Thales, Ariane, Izabela, Carla. Sou eternamente grata, não só pela ajuda na realização dos experimentos, mas também, por tornarem meus dias de trabalho mais leves e felizes.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF – UFSCar), em especial, à técnica Grazielle e ao técnico Sérgio, que tanto me ajudaram na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo e todos os alunos do LBBM, que, com todo carinho, me acolheram para realização de alguns experimentos.

Ao Prof. Dr. Helio Cesar Salgado por sua inestimável contribuição para realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Evelin C. Carnio e o técnico Marcelo Batalhão da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (USP), por colaborar com este trabalho nas medidas de óxido nítrico sérico.

Agradeço às agências de fomento CAPES, FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro.

Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e
faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar.

Dê-me, Senhor, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir.

(São Tomás de Aquino)

RESUMO

Introdução: A fotobiomodulação (FBM) é uma modalidade terapêutica não invasiva que tem sido utilizada para o tratamento de várias doenças. Estudos apontam que o óxido nítrico (NO) pode ser liberado de estoques endógenos, por fotólise, permitindo que o NO exerça seus efeitos biológicos. **Objetivos:** Avaliar se a aplicação aguda do laser 660nm pode induzir queda na pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e se este efeito é dependente da liberação de estoque de NO. **Métodos:** Foi realizada a medida direta (basal, sham e pós FBM) dos parâmetros hemodinâmicos de ratos hipertensos L-NAME e SHR. Ratos tratados com L-NAME têm menor produção de NO e, conseqüentemente, menor estoque de NO. O laser vermelho (660 nm) foi aplicado em 6 pontos do abdômen dos animais (parâmetros: 80 mW; 4,5 J; 63 J/cm², 56 segundos por ponto). Ratos normotensos e L-NAME foram eutanasiados e a aorta torácica foi coletada e dissecada para estudo da reatividade vascular. Foram realizadas três aplicações do laser no mesmo anel aórtico: após a contração com fenilefrina, após o teste de integridade endotelial por acetilcolina e após a incubação por 30 minutos com DETA-NO (doador de NO), PBS (controle) ou Hidroxicobalamina (sequestrador de NO). Os parâmetros de irradiação para reatividade vascular foram: laser vermelho (660 nm); 100 mW; 56 segundos; 5,6J; 96 J/cm². Células endoteliais (HUVEC) foram tratadas com DETA-NO ou CuSO₄, com posterior aplicação da FBM 4,5 J e adição de sonda seletiva para NO (DAF-2 DA). **Resultados:** Em SHR, houve queda média de 14 mmHg da pressão arterial sistólica e foi detectado aumento de NO sérico por reação quimioluminescente. Os ratos hipertensos L-NAME não apresentaram queda da pressão arterial pela FBM. A FBM promoveu vasodilatação em aorta isoladas de ratos normotensos, tendo menor efeito em aorta de ratos L-NAME e a adição de DETA-NO, aumentou a vasodilatação pós FBM, entretanto, a adição de Hidroxicobalamina aboliu o efeito vasodilatador da FBM. Em células endoteliais foi detectado aumento de NO pós FBM, porém com a adição de CuSO₄, que catalisa a decomposição dos estoques de NO, não houve detecção de NO pós FBM. **Conclusão:** Nossos resultados mostram que, de forma aguda, a irradiação com laser vermelho (660 nm) promove um efeito hipotensivo e vasodilatador por um mecanismo que envolve a mobilização de estoques de NO. **Palavras-chave:** Fotobiomodulação. Hipertensão arterial. Óxido nítrico. S-nitrosotiois.

ABSTRACT

Introduction: Photobiomodulation (PBM) is a non-invasive therapeutic modality used to treat several pathologies. Studies indicate that nitric oxide (NO) can be released from endogenous “stocks” by photolysis, favoring the biological effects of NO. **Aim:** Evaluate whether the application of red laser induces a decrease in blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) and whether this effect is dependent on the release of NO stock. **Methods:** Direct measurement (Basal, Sham and after FBM) of the hemodynamic parameters of hypertensive L-NAME and SHR rats was performed. Rats treated with L-NAME produce less NO and, consequently, less NO stock. A red laser (660 nm) was used; 80 mW; 56 seconds/point (6 points, abdominal region); 4.5 J; 63 J/cm² per point. Normotensive and L-NAME rats were euthanized by decapitation, and the thoracic aorta was collected dissected for vascular reactivity study. Three laser applications were performed on the same aortic ring: first, after phenylephrine contraction; second, after endothelial integrity testing by acetylcholine; third, after incubation for 30 minutes with the NO donor DETA-NO, PBS or Hydroxycobalamin. The irradiation parameters for vascular reactivity were: red laser (660 nm); 100 mW; 56 seconds; 5.6J; 96 J/cm². Endothelial cells (HUVEC) were treated with DETA-NO or CuSO₄, with subsequent application of PBM (4.5 J) and addition of a selective fluorescent probe for NO (DAF-2 DA). **Results:** there was a decrease in systolic blood pressure in SHR (mean of 14 mmHg) and an increase in serum NO was detected by chemiluminescent reaction. Hypertensive L-NAME rats did not exhibit a decrease in blood pressure after PBM. PBM promoted vasodilation in the aorta isolated from normotensive rats, and less effect in the aorta of L-NAME rats and the addition of the NO donor, DETA-NO, promoted greater vasodilation by PBM in the aorta of L-NAME rats, however, the addition Hydroxycobalamin has abolished the vasodilator effect of PBM. In endothelial cells, an increase in NO, after PBM, was detected, however with the addition of CuSO₄, which catalyzes the decomposition of NO stocks, there was no detection of NO after PBM. **Conclusion:** Our results demonstrate that, acutely, irradiation with red laser (660 nm) promotes a hypotensive and vasodilation effect through a mechanism that involves the mobilization of NO stock.

Keywords: Photobiomodulation. Hypertension. Nitric oxide. S-nitrosothiols.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação do tônus vascular pelo óxido nítrico (NO).....	23
Figura 2. Protocolo de fotobiomodulação em SHR.....	36
Figura 3. Protocolo de fotobiomodulação em Ratos Hipertensos L-NAME	39
Figura 4. Protocolo de reatividade vascular.....	41
Figura 5. Imagem representativa da aplicação do laser em anéis de aorta isolados	43
Figura 6. Protocolo de fotobiomodulação em Células endoteliais em cultura	46
Figura 7. Porcentagem de SHR responsivos à fotobiomodulação	51
Figura 8. Efeito da fotobiomodulação na pressão arterial de SHR responsivos à FBM	52
Figura 9. Imagem representativa do registro da pressão arterial de SHR.....	53
Figura 10. Efeito da fotobiomodulação na frequência cardíaca (FC) de SHR	54
Figura 11. Efeito da fotobiomodulação na concentração sérica de óxido nítrico de SHR.....	55
Figura 12. Efeito da fotobiomodulação na pressão arterial de ratos hipertensos L-NAME.....	56
Figura 13. Efeito do fotobiomodulação na concentração sérica de NO de ratos hipertensos L-NAME	57
Figura 14. Relaxamento induzido pela fotobiomodulação em anéis aórticos com endotélio (E+).....	58
Figura 15. Relaxamento induzido pela fotobiomodulação em anéis aórticos sem endotélio (E-).	60
Figura 16. Quantificação do NO intracelular em HUVEC após fotobiomodulação ...	62
Figura 17. Avaliação da viabilidade celular por MTT	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Categorias de Pressão arterial em adultos.....	18
Tabela 2: Parâmetros da fotobiomodulação <i>In vivo</i>	35
Tabela 3: Parâmetros da fotobiomodulação <i>Ex vivo</i>	42
Tabela 4: Parâmetros da fotobiomodulação <i>In vitro</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh - Acetilcolina
AkT - Proteína quinase B
BH4 - Tetraidrobiopterina
BKCa - Canais de K⁺ ativados por Ca²⁺ de grande condutância
CaCl₂ - Cloreto de cálcio
CaM - Complexo Cálcio-calmodulina
Concea - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CuSO₄ - Sulfato de cobre
DAF-2 DA - Diacetato diaminodifluorofluoresceína
DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol
DC - Débito Cardíaco
DCV - Doença Cardiovascular
DETA-NO - Dietilenotriamina/NONOato
DP - Desvio Padrão
eNOS - NO sintase endotelial
FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo
FAK - Quinase de adesão focal
FBM - Fotobiomodulação
FC - Frequência Cardíaca
FMN - Flavina Mononucleotídeo
GCs - Guanilato ciclase solúvel (GCs)
GMPc - Guanosina monofosfato cíclica
GSH-DNIC - Dinitrosil-ferro glutationa
GSNO - S-nitrosoglutationa
GTP - Guanosina trifosfato
IF - Intensidade de Fluorescência
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IL-6 - Interleucina 6
iNOS - NO sintase induzível
IP₃ - Inositol 1,4,5-trifosfato
J - Joule
J/cm² - Joules por centímetro quadrado

KCl - Cloreto de potássio

KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico

Laser - *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

LED - *Light Emitting Diode*

L-NAME - *N(G)-Nitro-L-arginine methyl ester*

MgSO₄ - Sulfato de magnésio

MLCK - Quinase da cadeia leve da miosina

MLCP - Fosfatase da cadeia leve da miosina

mM - Milimolar

mmHg - Milímetro de mercúrio

mN - Mili Newton

MTT - *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*

mW - Miliwatt

N₂O₃ - Trióxido de dinitrogênio

NaCl - Cloreto de sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

nm - Nanômetro

nNOS - NO sintase neural

NO - Óxido nítrico

NO₂⁻ - Nitrito

NOS - NO sintase

NPS - Nitroprussiato de sódio

OMS - Organização Mundial da Saúde

PA - Pressão arterial

PAD - Pressão arterial diastólica

PAM - Pressão arterial média

PAS - Pressão arterial sistólica

PBS - Tampão fosfato-salino (do inglês: *phosphate buffered saline*)

PK1 - Quinase dependente de difosfatidilinositol-1

PK2 - Quinase dependente de difosfatidilinositol -2

Pe - Fenilefrina

PI3-K - Fosfoinositideo-3 quinase

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP3 - Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PKG - Proteína quinase dependente de GMPc

PLC - Fosfolipase C

PMCA - Cálcio ATPase de membrana

RSNO - S-nitrosotióis

RVP - Resistência Vascular Periférica

Ser - Serina

SHR - Rato Espontaneamente Hipertenso

SOD - Superóxido Dismutase

TNG - Nitroglicerina

W/cm² - Watts por centímetro quadrado

•O₂⁻ - Radical Superóxido

2R-1C - 2 Rins - 1 Clipe

μL - Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 ÓXIDO NÍTRICO (NO): SÍNTESE E REGULAÇÃO DO TÔNUS VASCULAR	20
1.2 S-NITROSOTIÓIS (RSNO)	24
1.3 FOTOBIMODULAÇÃO (FBM)	26
2 OBJETIVOS	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 ESTUDOS EXPERIMENTAIS EM RATOS	33
3.2 EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)	34
3.2.1 Procedimento cirúrgico de canulação da artéria femoral	34
3.2.2 Protocolo de fotobimodulação	34
3.2.3 Óxido nítrico (NO) sérico	37
3.3 EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS HIPERTENSOS L-NAME	38
3.3.1 Medida da pressão arterial (método não invasivo)	38
3.3.2 Protocolo de fotobimodulação	39
3.4 REATIVIDADE VASCULAR	39
3.5 DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA APÓS FOTOBIMODULAÇÃO	43
3.6 VIABILIDADE CELULAR	48
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4 RESULTADOS	51
4.1 EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)	51

4.2 EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS HIPERTENSOS L-NAME.	55
4.3 EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA REATIVIDADE VASCULAR	57
4.4 DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA APÓS FOTOBIMODULAÇÃO	60
4. 5 VIABILIDADE CELULAR.....	62
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÃO	73
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão é caracterizada por níveis elevados e sustentados da pressão arterial, e é o principal fator de risco para infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença renal crônica (YUSUF et al., 2004; KANNEL, 1996).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a hipertensão o principal problema de saúde do mundo (JUNG et al., 2013). Em 2015 a prevalência global de hipertensão foi estimada em 1,13 bilhão de pacientes e, de acordo com algumas estimativas, em 2030 o número de mortes por doenças cardiovasculares pode chegar a mais de 23,6 milhões em todo o mundo (MATHERS; LONCAR, 2006; ZHOU et al., 2017). As doenças cardiovasculares (DCV) incluem as doenças do coração e dos vasos sanguíneos como hipertensão, aterosclerose, doenças isquêmicas, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral dentre outras. De 2011 a 2025, estão projetados gastos de \$7,28 trilhões com doenças não comunicáveis em países de renda baixa e média, sendo as DCVs responsáveis por cerca de 50% do total destes gastos (LASLETT et al., 2012).

Segundo a Diretriz de Prática Clínica do Relatório do Colégio Americano de Cardiologia (WHELTON et al., 2018), os valores da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) podem ser divididos em 4 níveis com base na pressão arterial medida em um ambiente de assistência médica:

Tabela 1: Categorias de pressão arterial em adultos

	PAS	PAD
Normal	< 120 mmHg	< 80 mmHg
Elevada	120-129 mmHg	< 80 mmHg
Hipertensão		
Estágio 1	130-139 mmHg	80-89 mmHg
Estágio 2	≥ 140 mmHg	≥ 90 mmHg

Fonte: Whelton et al., 2018

Esta categorização foi realizada baseada em dados observacionais relacionados à associação entre pressão arterial e risco de doenças cardiovasculares. Já está bem estabelecido que indivíduos com hipertensão estágio 2 têm o risco aumentado de desenvolver DCVs, mas um número crescente de estudos individuais e metanálises mostram um gradiente progressivo de risco de DCVs, desde a pressão arterial elevada, hipertensão estágio 1 até a hipertensão estágio 2 (WHELTON et al., 2018), por isso, há ampla discussão sobre o início do tratamento dos pacientes desde a classificação elevada.

A regulação da pressão arterial (PA) é realizada pelas ações integradas dos sistemas cardiovascular, nervoso, renal e endócrino, sendo considerada uma das funções fisiológicas mais complexas do organismo. A pressão arterial é definida pelo produto do débito cardíaco (DC) e da resistência vascular periférica (RVP) (FREIS, 1960). O DC pode ser determinado pelo volume sanguíneo circulante, pela frequência cardíaca e pelo retorno venoso, e a RVP é regulada por mecanismos vasoconstritores e vasodilatadores incluindo a modulação endotelial, a ação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (FROHLICH, et al., 1992).

A pressão, assim como a tensão podem ser definidas como uma força distribuída sobre uma área. O termo pressão arterial é utilizado ao invés de tensão, pois a tensão é determinada em uma única direção, enquanto a pressão pode ser usada sobre as superfícies curvas como as dos vasos sanguíneos. As pressões vasculares são medidas em unidades baseadas em comprimento de milímetros de mercúrio (mmHg) (MAGDER, 2018), isto porque, desde a antiguidade, o manômetro de mercúrio é utilizado como referência para a medida da pressão; quando se diz que a pressão em um vaso é de 100 mmHg, significa que a força exercida é suficiente para impulsionar a coluna de mercúrio até a altura de 100 milímetros contra a gravidade (GUYTON, 2006).

Três tipos de energia estão relacionadas com a pressão arterial: elástica, cinética e gravitacional, sendo a mais significativa a energia elástica. O volume dentro dos vasos distende suas paredes elásticas produzindo uma força de recuo que gera uma pressão. Alterações na relação de elasticidade aórtica requerem alterações na matriz da parede que ocorrem ao longo do tempo com processos crônicos, como hipertensão de longa data e envelhecimento (MAGDER, 2018).

Na hipertensão arterial é observada a presença de disfunção do endotélio, uma monocamada de células que reveste internamente os vasos sanguíneos (RODRIGUES et al., 2008; TOMASONI, 2010; OISHI et al., 2015). A disfunção endotelial é considerada um marcador para a presença de DCVs e é caracterizada pelo desequilíbrio na produção de moléculas vasodilatadoras e vasoconstritoras, principalmente pela diminuição da capacidade das células endoteliais em liberar Óxido nítrico, uma das principais moléculas vasodilatadoras endógenas (VANHOUTE et al., 2009).

1.1 ÓXIDO NÍTRICO (NO): SÍNTESE E REGULAÇÃO DO TÔNUS VASCULAR

O óxido nítrico (NO) é uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas, e é considerado um mensageiro biológico que está envolvido em diversos processos fisiológicos, como na regulação do tônus vascular, neurotransmissão, inibição da adesão de monócitos ao endotélio vascular, respostas inflamatórias e imunológicas e na inibição da agregação plaquetária (IGNARRO et al., 1987; MONCADA et al., 1988; KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991; MORO et al., 1996; TUTEJA et al., 2004).

A produção de NO é catalisada pela enzima NO sintase (NOS) a partir da L-arginina. Três isoenzimas catalisam a produção de NO: NOS neuronal (nNOS ou NOS-1), NOS induzível (iNOS ou NOS-2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS-3) (MONCADA, 1997; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

A eNOS pode ser ativada pelo complexo cálcio-calmodulina (CaM) e está localizada em caveolas ligada às caveolinas. As caveolas são pequenas invaginações da membrana plasmática. Na membrana celular, agonistas como a histamina, acetilcolina, trombina, serotonina, substância P e ADP, se ligam a receptores específicos e a ativação da fosfolipase C (PLC) promove a formação do segundo mensageiro, Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), que ao se ligar aos seus receptores localizados no retículo sarcoplasmático, promove a liberação de Ca^{2+} para o citosol. O complexo cálcio-calmodulina formado se associa com a eNOS que desloca a proteína inibitória caveolina e promove a translocação da eNOS para o citosol (VANHOUTTE et al., 2016) (Figura 1).

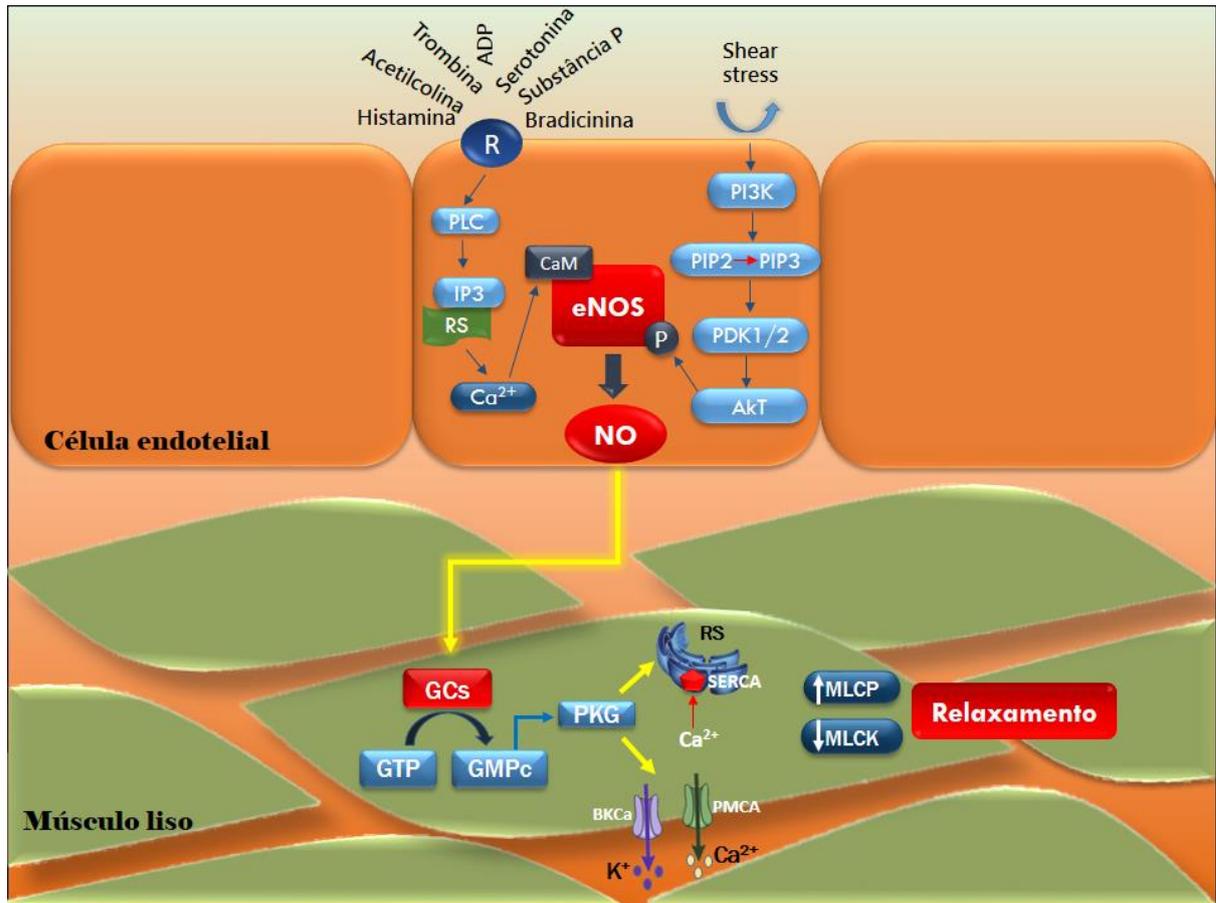
A eNOS também pode ser ativada por estresse de cisalhamento hemodinâmico ou *Shear stress*, que favorece a fosforilação (P) da eNOS. Nesta via, a enzima fosfoinositideo-3 quinase (PI3-K) é ativada por um processo de ligação da

PI3-K à quinase de adesão focal (FAK) através de integrinas que servem como transdutores de força e medeiam o sinal mecânico (GUAN, 1997). PI3-K, por sua vez, aumenta a taxa de fosforilação de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃) no citosol. PIP₃ ao ativar as quinases dependentes de difosfatidilinositol (PDK1 e PDK2), favorece a fosforilação de proteína quinase B (Akt), que fosforila o eNOS em Ser (1177) (BELTOWSKI, 2012; DIETERLE et al., 2014; SRIRAM et al., 2016) (Figura 1).

A eNOS é sintetizada como monômero, mas necessariamente deve formar dímeros para a produção de NO. Cada monômero é dividido em dois domínios principais: 1) domínio C-terminal redutase, que possui locais de ligação para flavina adenina dinucleotídeo (FAD), fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH) e flavina mononucleotídeo (FMN); 2) domínio N-terminal oxidase, que contém locais para a ligação do cofator tetraidrobiopterina (BH₄), para o ferro heme, e para L-arginina (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; FÖRSTERMANN; SESSA, 2011; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). A FAD e a FMN no domínio redutase aceitam elétrons do NADPH e os passam para a protoporfirina de ferro IX (Heme), permitindo a ligação do oxigênio (O₂) no ferro reduzido (Fe²⁺) do grupo heme e a conversão da L-arginina em *NG*-hidroxi-L-arginina (NHA), seguida de oxidação deste intermediário para formação de L-citrulina e NO (KORTH et al., 1994; FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018).

O óxido nítrico produzido nas células endoteliais, difunde-se livremente para as células do músculo liso, onde se liga ao ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), ativando-a. A GCs catalisa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc) que ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG). A PKG contribui para diminuir os

níveis intracelulares de Ca^{2+} , estimulando sua recaptação por ação da SERCA (do inglês *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium-ATPase*) e seu efluxo através da Cálcio ATPase de membrana (PMCA). A PKG também favorece o efluxo de K^+ pelos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de grande condutância (BKCa, do Inglês *big conductance*) promovendo uma hiperpolarização da célula. Com a depleção de cálcio ocorre a diminuição da atividade da enzima quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que é responsável por fosforilar as cadeias leves da miosina aumentando a tensão muscular, além disso, a diminuição da concentração de Ca^{2+} aumenta a atividade da enzima fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) que promove a desfosforilação da cadeia leve da miosina, diminuindo a atividade da miosina ATPase, promovendo a redução da tensão muscular. Tomadas em conjunto, essas modificações favorecem a vasodilatação com consequente diminuição da pressão arterial (RAPOPORT; DRAZNIN; MURAD, 1983; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015; FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018) (Figura 1).

Figura 1. Regulação do tônus vascular pelo óxido nítrico (NO)

Fosfolipase C (PLC); Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3); Retículo sarcoplasmático (RS); Complexo cálcio-calmodulina (CaM); Fosfoinositídeo-3 quinase (PI3-K); Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2); Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3); Quinases dependentes de difosfatidilinositol (PDK1 e PDK2); Proteína quinase B (Akt); Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS); Guanilato ciclase solúvel (GCs); Guanosina trifosfato (GTP); Guanosina monofosfato cíclica (GMPC); Proteína quinase dependente de GMPC (PKG); *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium-ATPase* (SERCA); Cálcio ATPase de membrana (PMCA); Canais de K⁺ ativados por Ca²⁺ de grande condutância (BKCa); Quinase da cadeia leve da miosina (MLCK). Fonte: próprio autor.

A nitroglicerina (TNG) e o nitroprussiato de sódio (NPS) são os doadores de NO mais utilizados atualmente na emergência hipertensiva. A nitroglicerina, ou trinitrato de glicerina (TNG) é um potente vasodilatador, capaz de causar diminuição da pressão arterial e diminuição no trabalho cardíaco, reduzindo os sintomas de isquemia miocárdica. No entanto, o tratamento prolongado com nitroglicerina causa tolerância em grandes artérias (FEELISH; KELM, 1991; MÜNZEL et al., 1996) além de induzir uma disfunção endotelial, redução na

atividade da superóxido dismutase (SOD) e aumento de radicais superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) (MÜNZEL et al., 1999). O nitroprussiato de sódio (NPS) é um outro doador de NO que exerce efeito vasodilatador sobre os leitos arteriais e venosos produzindo diminuição da pressão arterial e tem sido utilizado desde 1974 (FRIEDERICH; BUTTERWORTH, 1995). No entanto, existem muitas restrições para o seu uso prolongado, pois, doses supraterapêuticas de NPS ou o seu uso crônico, foi associado com acumulação de cianeto (ARNOLD; LONGNECKER; EPSTEIN, 1984) além de disfunção endotelial (FUKATSU et al., 2007).

Por ser uma molécula de sinalização reativa e gasosa com meia-vida muito curta de 0,09 a 2 segundos (THOMAS et al., 2001), o NO pode ser armazenado reagindo com tióis para formar S-nitrosotióis (RSNO) em um processo chamado S-nitrosilação, preservando assim, sua bioatividade (HESS et al., 2005).

1.2 S-NITROSOTIÓIS (RSNO)

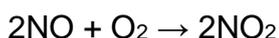
A S-nitrosilação é um processo fisiológico relevante para a função cardiovascular (STAMLER, 1994; WINK et al., 1998; MARON; TANG; LOSCALZO, 2013) e regula vários mecanismos celulares, incluindo a apoptose, a atividade de enzimas e a manutenção do equilíbrio redox celular (HESS et al., 2005).

A Nitrosilação é a reação que liga o NO a um metal de transição ou a um grupo tiol. Se a nitrosilação ocorrer no grupo tiol de uma cisteína, a reação é chamada S-nitrosilação. No entanto, se a nitrosilação ocorre em um metal de transição, é denominada nitrosilação de metal (FERNANDO et al., 2019). Na nitrosilação de metais, o NO interage com os centros metálicos do grupo heme. A ligação do NO ao Fe^{2+} do grupo heme da sGC ocasiona alterações conformacionais

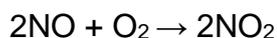
que promovem sua ativação (MURAD, 1994), no entanto, a ligação do NO no grupo heme da citocromo c oxidase, na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ocasiona inativação (CLEETER et al., 1994; SARTI et al., 2012).

Diferentes reações intermediárias foram propostas para a formação de S-nitrosotióis (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2013):

1) O NO reage com o O₂ para formar uma série de óxidos de nitrogênio com estados crescentes de oxidação até a formação do composto nitrogenado Trióxido de dinitrogênio (N₂O₃), o qual reage um tiol (-SH) para produzir nitrito (NO₂⁻) e um nitrosotiol (RSNO):



2) Primeiramente, o NO reage com O₂ para formar NO₂ que reage com um tiol (-SH) para produzir um radical tiol e um nitrito. O NO, então, reage com o radical tiol para formar um nitrosotiol:



3) O NO reage diretamente com o radical tiol para formar um nitrosotiol:



Os S-nitrosotióis agem como doadores de NO através da denitrosilação que é a clivagem homolítica da ligação S-Nitrosil, que pode ocorrer

espontaneamente na presença de agentes redutores como o ascorbato, íons metálicos (Cu^{2+}), aumento da temperatura, luz ultravioleta (UV), (MANOJ et al., 2009; ZHANG et al., 2017; FERNANDO et al., 2019) e também por fotobiomodulação utilizando laser ou LED (OISHI et al., 2017; KESZLER et al., 2018). A fotólise é um meio alternativo de obter a clivagem da ligação S-Nitrosil (HUNTER; SCHOENFISCH, 2015).

1.3 FOTOBIMODULAÇÃO (FBM)

A fotobiomodulação (FBM) consiste na aplicação de LED (*LED - Light Emitting Diode*) ou laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) operando em baixa potência que, quando absorvidas por cromóforos específicos, provocam reações biológicas nos tecidos, estimulando ou inibindo processos intracelulares. A luz utilizada para a FBM pode emitir uma radiação visível ou invisível (infravermelho) e o tipo de radiação está relacionado com a via de ação pretendida com a aplicação (VLADIMIROV; OSIPOV; KLEBANOV, 2004).

A luz já é utilizada para fins terapêuticos desde as civilizações antigas. Na Grécia, utilizavam a luz solar para benefícios à saúde, técnica chamada Helioterapia (uma referência ao deus Hélios, que significa sol). Em 1903, o uso de luz para fins terapêuticos ganhou reconhecimento internacional quando Niels Ryberg Finsen ganhou o Prêmio Nobel de medicina pelo tratamento do Lúpus vulgaris com base na aplicação da luz. O conceito de emissão estimulada, proposta por Albert Einstein em 1916, gerou pesquisas aprofundadas sobre o aproveitamento de fótons para aumentar a energia da luz, permitindo a criação do laser. Em 1960, Theodore Maiman desenvolveu o primeiro dispositivo a laser, um laser de rubi (MAIMAN, T. H., 1960). A primeira indicação de

que a luz laser operando em baixa potência poderia gerar efeitos benéficos para a saúde, foi relatada por Endre Mester em 1966 ao apresentar seus primeiros relatos de casos clínicos sobre bioestimulação com laser, utilizando laser de rubi e argônio em úlceras crônicas de membros inferiores. Em 1988, Tiina Karu revelou um mecanismo molecular da laserterapia, identificando o citocromo c oxidase na cadeia respiratória mitocondrial como um cromóforo primário da luz. Pesquisas com fotobiomodulação utilizando LED, foram desenvolvidas principalmente pela *National Aeronautics and Space Administration* (NASA). A NASA investigou o uso de terapia LED na cicatrização de feridas de astronautas que apresentaram nível deficiente de cicatrização de feridas em condições espaciais de gravidade zero, e obteve resultados positivos (WHELAN et al., 2001). Em 2008 a OMS recomendou a FBM para tratamento de dor no pescoço (coluna) e em 2010 a Associação Americana de Fisioterapia (APTA), recomendou a FBM para o tratamento de tendinopatia do tendão de Aquiles (HAMBLIN; HUANG, 2014).

A FBM tem sido foco de pesquisas e vem sendo empregada mundialmente para o tratamento de diversas patologias (HUANG et al., 2009), com efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, cicatrizantes, de bioestimulação, dentre outros (MEZAWA et al., 1988; VINCK et al., 2003; ALBERTINI et al., 2004).

Oron et al. (2001) demonstraram que a FBM com laser (803 nm) foi capaz de reduzir o tamanho do infarto do miocárdio, indicando um efeito cardioprotetor da FBM. A terapia com laser (804 nm) foi capaz de promover a proliferação de células estaminais mesenquimais (MSCs) e células-tronco cardíacas (CSCs) *in vitro* (TUBY et al., 2007). A FBM utilizando laser de 632 nm promoveu a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em células endoteliais em cultura após 24 horas de exposição a luz (CHEN; HUNG; HSU, 2008). Em

trabalhos com animais, foi observado o efeito antioxidante do laser infravermelho, sendo efetivo no controle de espécies reativas de oxigênio (EROS) (AVNI et al., 2005).

A FBM também se demonstra eficaz no controle da inflamação. Pires et al. (2011) demonstraram que a FBM modula a expressão do mRNA de citocinas anti-inflamatórias em um modelo de tendinite em ratos. Derkacz et al. (2014) observaram uma diminuição nos níveis de interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) em pacientes com intervenção coronária percutânea, após aplicação da FBM, o que pode resultar em diminuição do risco de reestenose. A laserterapia (650- 660nm) também foi capaz de reduzir a expressão de TNF- α após lesão pulmonar aguda em ratos (AIMBIRE et al., 2006) e de diminuir de 30% a 40% a expressão de mRNA de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 após indução aguda da inflamação em patas de ratos (ALBERTINI et al., 2004). Outros autores observaram redução de TNF- α causada por irradiação com laser 632 e 810 nm (NOVOSELOVA et al., 2006; YAMAURA et al., 2009;).

Existem evidências do efeito na pressão arterial gerado pela FBM. A aplicação do laser vermelho (660nm) foi capaz de provocar um efeito hipotensivo notável, por meio do aumento dos níveis de NO, em modelo de ratos hipertensos 2 rins - 1 clipe (2R-1C) (OISHI et al., 2017). Além disso, a FBM utilizando laser (780 nm) de forma sistêmica, com aplicações de forma crônica durante sete semanas, três vezes por semana, provocou a diminuição da pressão arterial média e diastólica em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (TOMIMURA et al., 2014).

Os fotorreceptores (ou cromóforos), tais como o citocromo-C, melanina, porfirina, hemoglobina e outros, apresentam configuração atômica capaz de ser

excitados pela incidência de um fóton específico e têm sido o foco de discussões significativas (KARU T, 1999; DE FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Muitos efeitos da FBM parecem estar relacionados ao aumento do óxido nítrico, sobretudo, ainda não está claro de que modo estes efeitos da FBM podem ser alcançados via NO. Desta forma, considerando as evidências do efeito da FBM por laser na diminuição da pressão arterial, a hipótese do presente trabalho é que a FBM utilizando laser 660 nm promove a liberação de NO de estoques por fotólise, ocasionando vasodilatação com conseqüente diminuição da pressão arterial.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a fotobiomodulação (FBM), utilizando laser vermelho (660 nm) de forma aguda, pode induzir um efeito hipotensivo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e se este efeito é dependente da liberação de óxido nítrico (NO) de estoques.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a FBM utilizando laser de 660 nm induz diminuição da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) em um modelo experimental de hipertensão, utilizando ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

- Avaliar se a FBM utilizando laser de 660 nm induz efeito hipotensivo em ratos hipertensos L-NAME, um modelo experimental com baixa produção de NO e, conseqüentemente, baixo estoque de NO.

- Investigar se a FBM induz aumento de NO em células endoteliais (HUVEC) em cultura, utilizando sonda fluorescente seletiva para NO, e se a detecção é diminuída quando há a decomposição dos estoques de NO.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTUDOS EXPERIMENTAIS EM RATOS

Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Animais da Universidade Federal de São Carlos (nº 7936070618).

Os animais foram agrupados em caixas de polipropileno forradas com maravalha e mantidos em ciclo claro-escuro (10 horas claro, 14 horas escuro) e em condições de temperatura controlada (22 °C), no biotério de experimentação do laboratório de Fisiologia Endócrina e Exercício Físico do Departamento de Ciências Fisiológicas-DCF (Responsável: Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck). Foram alimentados somente com ração padrão para roedores e água mineral *ad libitum* (Água mineral da marca Bonafont, Danone®, Jacutinga, MG, Brasil. Composição química (mg/L): bicarbonato 8,33; nitrato 4,16; potássio 1,220; cálcio 1,480; sódio 1,429; magnésio 0,586; cloreto 0,60; fosfato 0,06; fluoreto 0,04.

Para garantir um trabalho ético e de qualidade, todos os pesquisadores envolvidos participaram de um curso de capacitação para uso e manejo de animais de laboratório, promovido pela Universidade Federal de São Carlos, garantindo que os animais fossem manipulados com cuidado e respeito, tomando as devidas precauções a fim de garantir o mínimo de estresse ao animal durante sua manipulação e contenção.

3.2 EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)

Objetivo: determinar se uma única aplicação do laser vermelho (660 nm) apresenta efeito hipotensivo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Para isso, foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, com 9 a 10 semanas de idade.

3.2.1 Procedimento cirúrgico de canulação da artéria femoral

Após duas semanas da chegada dos animais ao biotério de experimentação da UFSCar (tempo de aclimatação), os ratos foram submetidos ao implante de uma cânula na artéria aorta abdominal através da artéria femoral, para medida direta dos parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) (Figura 2). Os ratos foram anestesiados com Cetamina (100 mg/Kg) + Xilazina (10 mg/Kg), para o implante da cânula de polietileno (PE10 conectada a PE50) que foi preenchida com solução salina heparinizada a 2% e exteriorizada no dorso do animal.

3.2.2 Protocolo de Fotobiomodulação

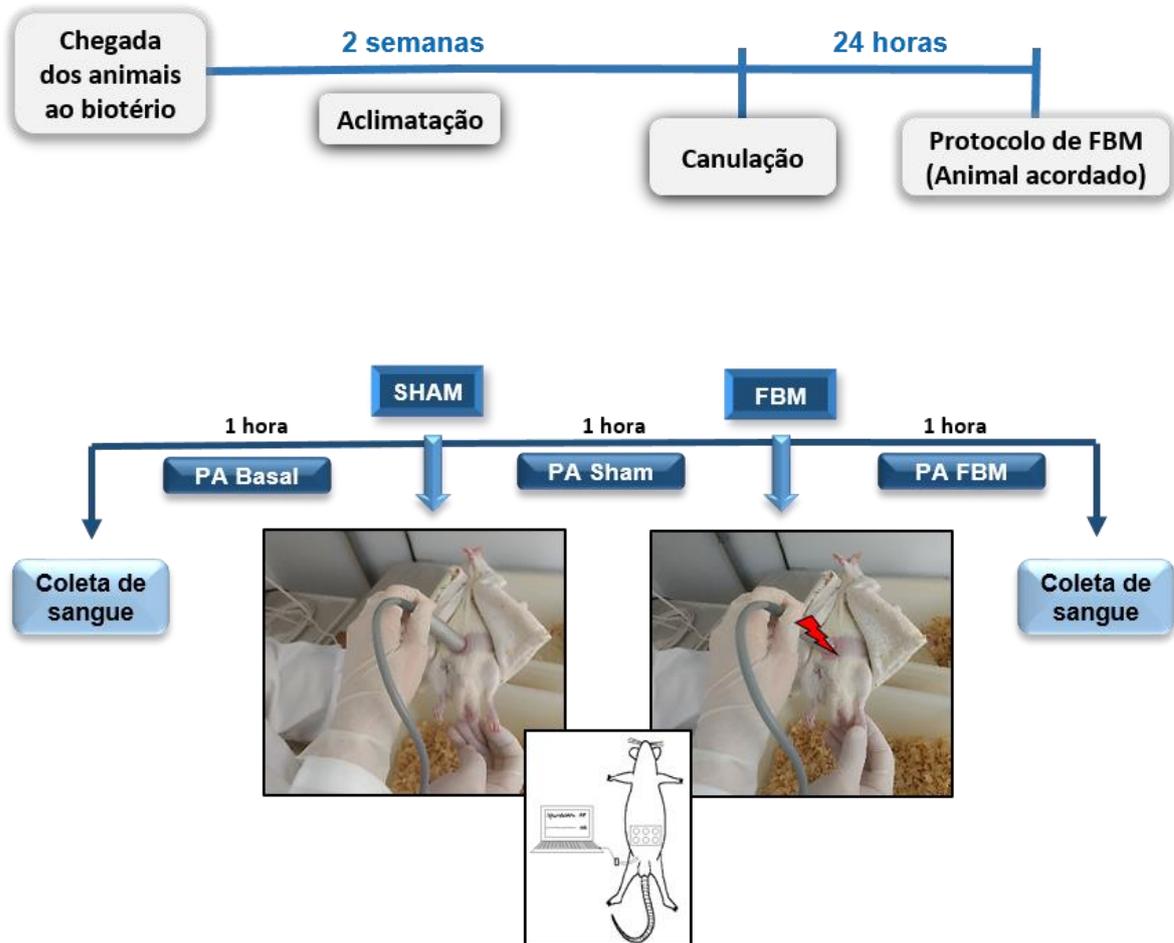
Para o protocolo de fotobiomodulação, foi utilizado um laser de diodo de arseneto de alumínio e gálio (AlGaAs) Photon Lase III (DMC Equipamentos, São

Carlos, SP, Brasil). O laser foi aplicado por via transcutânea na região abdominal do rato, em contato com a pele previamente depilada, em 6 pontos diferentes. Os parâmetros de irradiação estão descritos na tabela 2:

Tabela 2: Parâmetros da fotobiomodulação *In vivo*

Parâmetros do laser (<i>In vivo</i>)	
Comprimento de Onda (λ)	660 nm
Modo de operação	Contínuo
Ângulo de aplicação	90°
Técnica de aplicação	Em contato
Número de pontos irradiados	6 (1 sessão)
Área do spot	0,071 cm ²
Forma do feixe	Circular
Irradiância	1,13 W/cm ²
Potência óptica	80 mW
Energia	4,5 Joules
Tempo de exposição	56 segundos
Fluência	63 J/cm ²

Figura 2: Protocolo de fotobiomodulação em SHR



Fonte: próprio autor.

Vinte e quatro horas após a canulação da artéria femoral, com o animal acordado, a medida direta da pressão arterial foi iniciada. A cânula intra-arterial foi conectada ao transdutor de pressão e a um amplificador (PowerLab 4/S; AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Austrália), e as medições da linha de base dos parâmetros hemodinâmicos: PAS, PAM, PAD e FC, foram realizadas durante 1 hora. Após 1 hora, foi realizada uma aplicação simulada do laser (Sham), onde o aparelho desligado foi encostado em 6 pontos da região abdominal do rato, permanecendo o mesmo tempo da FBM. Os parâmetros hemodinâmicos foram registrados por 1 hora. Em seguida, no mesmo animal, o laser foi aplicado na região abdominal em 6 pontos

e os parâmetros hemodinâmicos foram registrados por 1 hora ou até o final do efeito hipotensivo (Figura 2). Este protocolo foi realizado somente no período matutino de cada dia.

O resultado foi calculado levando em consideração a diferença (Δ) entre os valores da pressão arterial coletados antes (valor basal) e depois da FBM ou da simulação (Sham). Foi considerado como responsiva à FBM uma redução de pelo menos 5 mmHg. Menos de 5 mmHg foi considerado não responsivo à FBM.

3.2.3 Óxido nítrico (NO) sérico

Para medir os níveis de NO sérico, foram coletados 300 μ L de sangue, através da cânula, antes do início do registro e imediatamente após o término do efeito hipotensivo provocado pela FBM. A fim de evitar a interferência no registro da pressão arterial, o sangue não foi coletado em nenhum momento durante a coleta de dados. As amostras foram protegidas da luz e centrifugadas a 3.500 RPM por 15 minutos, e o soro foi armazenado em freezer a -80 °C. Para a análise, as amostras foram descongeladas e desproteinizadas com etanol a 95% (4 °C) durante 30 minutos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para medir indiretamente os níveis séricos de NO, pela concentração sérica de nitrato. A técnica de quimioluminescência NO/ozônio foi realizada conforme descrito anteriormente por Archer et al. (1993), utilizando o analisador de óxido nítrico Sievers 280i (Sievers NOA 280i; Sievers, Boulder, CO).

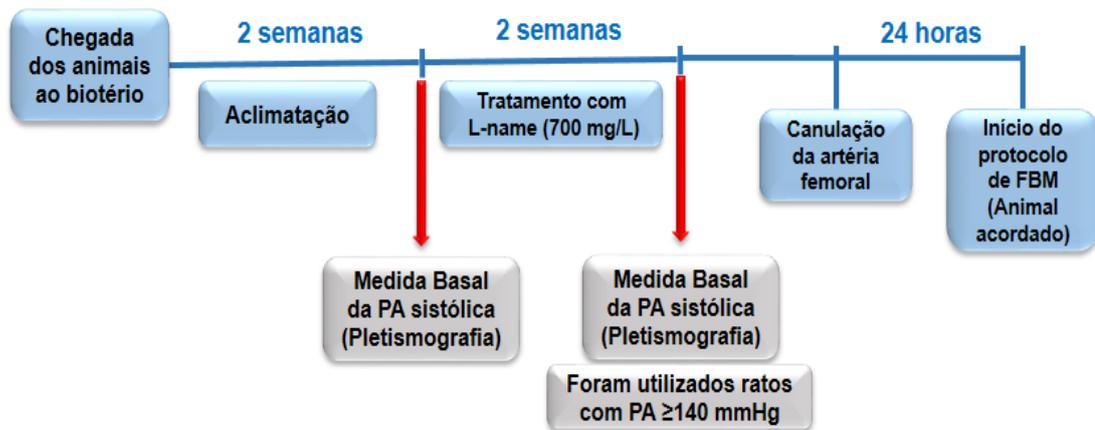
3.3 EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS HIPERTENSOS L-NAME.

Objetivo: determinar se uma única aplicação do laser vermelho (660 nm) apresenta efeito hipotensivo em ratos com baixa produção de NO.

Ratos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos-SP, com 9 a 10 semanas de idade, foram tratados com o inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), N(G)-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), 700 mg/L, diluído em água mineral, *ad libitum*, por duas semanas, para o aumento da pressão arterial.

3.3.1 Medida da pressão arterial (método não invasivo)

Após duas semanas da chegada dos animais ao biotério de experimentação (tempo de aclimação), a pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida pela técnica de pletismografia de cauda (NIBP System-ADinstruments). Posteriormente a esta primeira medida da PA, os animais foram tratados com L-NAME (700 mg/mL) na água de beber por duas semanas e, então, foi realizada uma nova aferição da PAS por pletismografia de cauda e somente os animais com PAS ≥ 140 mmHg foram selecionados.

Figura 3. Protocolo de fotobiomodulação em Ratos Hipertensos L-NAME.

Fonte: próprio autor.

3.3.2 Protocolo de fotobiomodulação

Os ratos hipertensos L-NAME, foram submetidos à canulação da artéria femoral (vide item 3.2.1) e, 24 horas após, com o animal acordado, foi iniciado o protocolo de fotobiomodulação com coleta de sangue para medida de óxido nítrico sérico, como descrito anteriormente nos itens 3.2.2 e 3.2.3 (Figura 2).

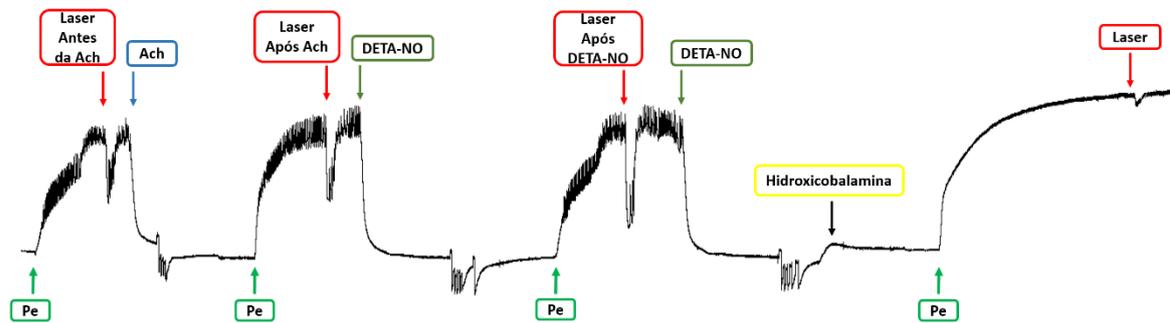
3.4 REATIVIDADE VASCULAR

Objetivo: Verificar se a fotobiomodulação promove dilatação de anéis de aorta provenientes de ratos normotensos e hipertensos L-NAME.

Após o protocolo de fotobiomodulação, os ratos hipertensos L-NAME foram eutanasiados por decapitação e a aorta torácica foi dissecada e cortada em anéis de 4 mm de comprimento que foi colocado entre dois ganchos metálicos em um miógrafo (modelo Mulvany-Halpern 610 DMT-EUA, Marietta, GA), contendo solução de Krebs (mM: NaCl 130, KCl 4,7, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 14,9,

Glicose 5,5 e CaCl_2 1,6), pH 7,4 a 37 °C, com 95% de O_2 e 5% de CO_2 . O sinal adquirido foi gravado por um sistema de aquisição de dados PowerLab8/SP (ADInstruments Pty Ltd., Colorado Springs, CO). O mesmo protocolo foi realizado com anéis de aorta de ratos Wistar normotensos.

A tensão nos anéis foi estabilizada a 15 mN e, então, foram contraídos com fenilefrina (0,1 μM). Obtida a estabilização da contração, o laser foi aplicado por 56 segundos, em uma dose de 5,6 J. Como os anéis aórticos estavam submersos em líquido (solução de Krebs), a aplicação se deu a 1 cm de distância. Após nova estabilização da contração, a integridade endotelial foi testada pelo relaxamento induzido por acetilcolina (1 μM). Este anel foi lavado 4 vezes e uma nova contração com fenilefrina foi realizada e o laser foi aplicado com os mesmos parâmetros. A aplicação do laser antes e depois da acetilcolina foi realizada para verificar se há aumento do relaxamento promovido pela fotobiomodulação após a administração de acetilcolina. Para promover o acúmulo de óxido nítrico, os anéis aórticos foram incubados durante 30 minutos com o doador de NO, Dietilenotriamina/NONOato (DETA-NO, 100 μM). Após esse período, seis lavagens com solução de Krebs foram realizadas para remover o excesso de DETA-NO. Uma nova contração com fenilefrina foi executada e o laser foi aplicado. Outro tratamento com DETA-NO foi realizado por 30 minutos, os anéis aórticos foram lavados por 6 vezes e depois incubado com o sequestrador de NO, Hidroxicobalamina (50 μM) durante 30 minutos. Uma nova contração com fenilefrina foi realizada e o laser foi incidido (figura 4). A Hidroxicobalamina contém um núcleo de corina centrado em cobalto que pode interagir com o NO para formar um novo complexo (JIANG; LI; RAND, 1997).

Figura 4. Protocolo de reatividade vascular.

Os anéis aórticos foram contraídos com fenilefrina (Pe) e o laser foi aplicado. Posteriormente, a integridade endotelial foi testada pelo relaxamento induzido por acetilcolina (ACh). Este anel aórtico foi lavado por 4 vezes e uma nova contração com fenilefrina foi realizada. O laser foi aplicado novamente com os mesmos parâmetros. Os anéis aórticos foram incubados com DETA-NO para promover o estoque de óxido nítrico. Seis lavagens com solução de Krebs foram realizadas para remover o excesso de DETA-NO. Foi realizada nova contração com fenilefrina e o laser foi aplicado novamente. Outro tratamento com DETA-NO foi realizado, lavado e depois incubado com Hidroxicobalamina, um sequestrador de NO. Uma nova contração com fenilefrina foi realizada e o laser foi aplicado. Fonte: próprio autor.

Foi utilizado o laser de diodo de arseneto de alumínio e gálio (AlGaAs)

Photon Lase III (DMC Equipment, São Carlos, SP, Brasil). Os parâmetros de irradiação estão descritos na tabela 3:

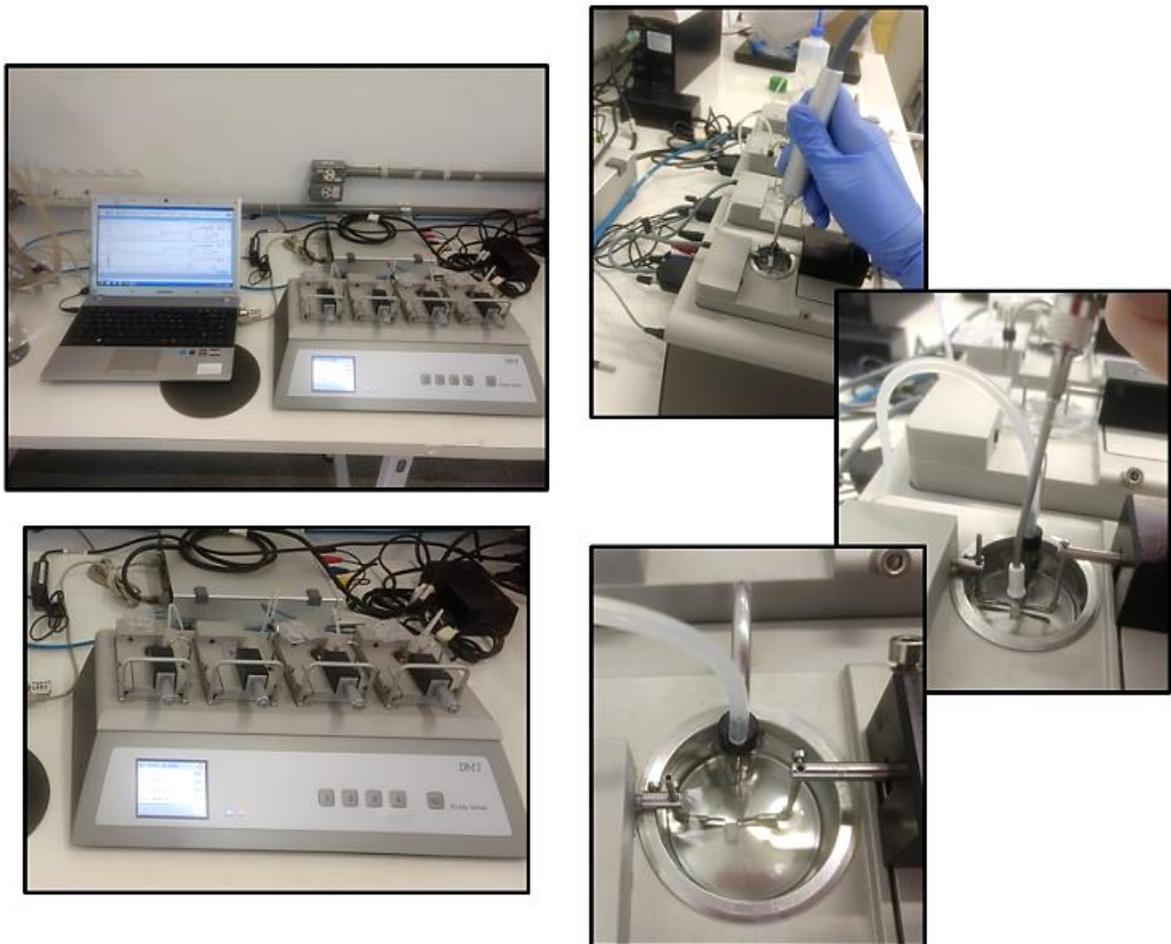
Tabela 3: Parâmetros da fotobiomodulação *Ex vivo*

Parâmetros do laser (<i>Ex vivo</i>)	
Comprimento de Onda (λ)	660 nm (vermelho)
Modo de operação	Contínuo
Ângulo de aplicação	90°
Técnica de aplicação	1 cm do alvo
Número de pontos irradiados	1
Área do spot	0,0586 cm ²
Forma do feixe	Circular
Irradiância	1,71 W/cm ²
Potência óptica	100 mW
Energia	5,6 Joules
Tempo de exposição	56 segundos
Fluência	96 J/cm ²

Todos os protocolos de reatividade vascular foram realizados em aorta de ratos normotensos e ratos hipertensos L-NAME. Foram utilizados tanto anéis aórticos com endotélio íntegro (E+ normotenso, E+ L-NAME), quanto anéis aórticos onde o endotélio foi removido mecanicamente (E- normotenso, E- L-NAME). Como há uma significativa redução da resposta vasodilatadora por acetilcolina em ratos tratados com L-NAME, todos os anéis de aorta foram considerados com endotélio se exibissem um relaxamento à acetilcolina (1 μ M) de 40 a 50%. Para ratos normotensos, foi considerado endotélio íntegro aquele que apresentasse relaxamento maior que 80% da contração máxima induzida por fenilefrina (0,1 μ M) (RODRIGUES et al., 2010). A efetividade da remoção do endotélio (anéis de aorta

sem endotélio, E-) foi demonstrada pela ausência total (0%) de relaxamento à acetilcolina.

Figura 5. Imagem representativa da aplicação do laser em anéis de aorta isolados.



Fonte: próprio autor.

3.5 DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA APÓS FOTOBIMODULAÇÃO

Objetivo: Avaliar a liberação do NO dos estoques celulares, induzida pela fotobiomodulação.

Foram utilizadas células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), cultivadas em meio Dulbecco MEM (DMEM) com pH 7,4, suplementado

com soro fetal bovino (10%), estreptomicina (100 μ M) e penicilina (100 U/mL) e mantidas a 37°C em estufa de com 5% de CO₂. Para a realização deste experimento foi utilizada a estrutura (estufa e fluxo laminar) disponível no Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF - UFSCar).

As células endoteliais (HUVEC) foram plaqueadas em *black plates* de 96 poços com concentração de 10⁴ células por poço, e mantidas em estufa por 24 horas. No plaqueamento, as células foram distribuídas em poços alternados a fim de impedir que houvesse interferência em outros poços durante a aplicação do laser. Os experimentos foram realizados em 3 dias distintos, ou seja, 3 placas diferentes e em cada placa foi realizado a triplicata de cada grupo.

Grupos:

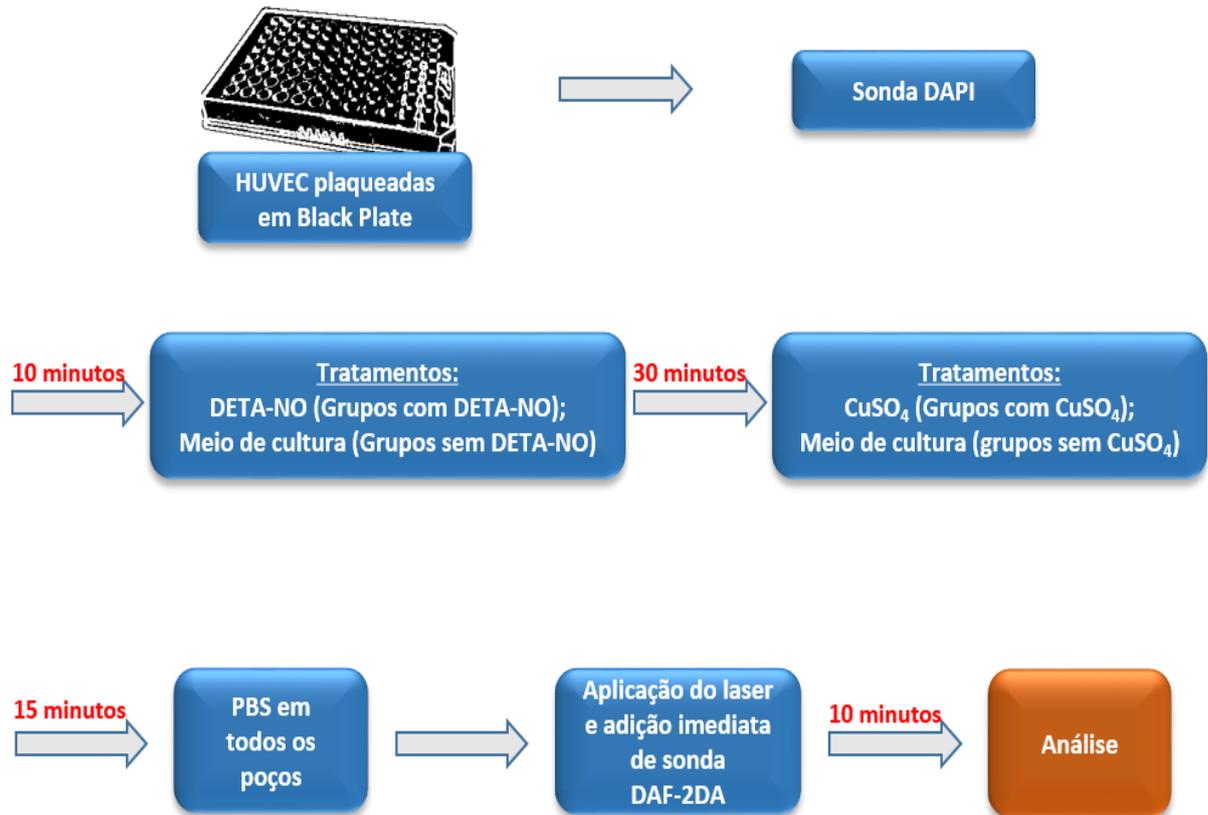
- 1) Controle
- 2) Laser 4,5 J
- 3) DETA-NO
- 4) DETA-NO + laser 4,5 J
- 5) DETA-NO + laser 1,6 J
- 6) DETA-NO + laser 0,8 J
- 7) CuSO₄
- 8) CuSO₄ + laser 4,5 J
- 9) DETA-NO + CuSO₄
- 10) DETA-NO + CuSO₄ + Laser 4,5 J

Após 24 horas do plaqueamento, os núcleos das células foram marcados com o fluoróforo 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI, Thermo Scientific; 2,3 μ M) por 10 minutos. Após este tempo a sonda DAPI foi retirada e adicionado o doador de NO DETA-NO (100 μ M) diluído em meio DMEM, que permaneceu nos poços durante 30 minutos a fim de gerar estoques de NO. Decorrido este tempo, o

DETA-NO foi removido e todos os poços foram lavados com Tampão fosfato-salino (PBS) por 4 vezes. Foi adicionado Sulfato de Cobre (CuSO_4 – 1 mM) nos poços correspondentes a este grupo, permanecendo durante 15 minutos. O Cobre catalisa a decomposição dos estoques de NO (GORREN et al., 1996; KOLESNIK et al., 2013). Após retirar o CuSO_4 , e lavar os poços por 4 vezes com PBS, foi adicionado 100 μL de PBS em todos os poços e, então o laser foi aplicado nos grupos laser. Imediatamente após a aplicação do laser, foi adicionada a sonda fluorescente seletiva para NO, diacetato diaminodifluorofluoresceína (DAF-2 DA – 10 μM) que permaneceu em contato com as células durante 10 minutos. A sonda foi retirada dos poços e a análise iniciada (figura 6). Por estarem as células submersas em líquido (PBS), a distância na aplicação do laser foi de 1 cm.

As imagens foram adquiridas utilizando um sistema automatizado de microscopia epifluorescente de alta resolução (ImageXpress XLS System, Molecular Devices) em aumento de 40x. A quantificação da fluorescência foi realizada pelo mesmo aparelho. A quantificação da fluorescência obtida pela sonda DAF, foi relativizada pela quantidade de células em cada imagem.

Figura 6. Protocolo de fotobiomodulação em Células endoteliais em cultura.



Fonte: próprio autor.

Foi utilizado o laser arseneto de gálio-alumínio (AlGaAs) Photon Lase III (DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil), com os seguintes parâmetros de irradiação:

Tabela 4: Parâmetros da fotobiomodulação *In vitro*

Parâmetros do laser (<i>In vitro</i>)	
Modo de operação	Contínuo
Ângulo de aplicação	90°
Técnica de aplicação	1 cm do alvo
Número de pontos irradiados	1
Área do spot	0,071 cm ²
Forma do feixe	Circular
Irradiância	1,13 W/cm ²
Potência óptica	80 mW
GRUPOS 2, 4, 8 e 10	
Energia	4,5 Joules
Tempo	56 segundos
Fluência	63 J/cm ²
GRUPO 5	
Energia	1,6 Joules
Tempo	20 segundos
Fluência	22,5 J/cm ²
GRUPO 6	
Energia	0,8 Joules
Tempo	10 segundos
Fluência	11 J/cm ²

3.6 VIABILIDADE CELULAR

Objetivo: verificar se os protocolos utilizados no item 3.5 não afetariam a viabilidade das células.

As células foram plaqueadas em *black plates* de 96 poços a uma concentração de 10^4 células por poço e foram mantidas a 37 °C em uma estufa contendo 5% de CO₂. Após 24 horas, o doador de NO DETA-NO (100 µM) diluído em meio DMEM foi adicionado em todos os poços permanecendo durante 30 minutos. Após este tempo, o DETA-NO foi removido e os poços foram lavados com PBS por 4 vezes. Depois da remoção do DETA-NO, foi adicionado Sulfato de Cobre (CuSO₄ - 1 mM) nos poços correspondentes a este grupo, que permaneceu durante 15 minutos. Decorrido este tempo, o CuSO₄ foi removido, os poços foram lavados com PBS e foi adicionado 100 µL de PBS em todos os poços e, então o laser foi aplicado. Após 10 minutos da aplicação do laser, foi adicionado 5 mg/mL de 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) que permaneceu em contato com as células durante 4 horas a 37 °C em uma estufa contendo 5% de CO₂. As desidrogenases mitocondriais convertem o MTT acumulando cristais de formazan de cor púrpura no interior da célula. Esta conversão só ocorre em células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). Após este tempo, o MTT foi retirado e então foi adicionado Dimetilsulfóxido (DMSO) 100% (100 µL por poço). Após 10 minutos, a absorbância foi determinada no comprimento de onda 550 nm utilizando o espectrofotômetro SpectraMax I3x (Molecular Devices, San José, CA, EUA). O grupo chamado Controle, são células que não receberam nenhum tipo de tratamento, sendo o grupo controle de células viáveis. O grupo controle para células inviáveis (Triton), foi o grupo onde as células foram tratadas com Triton-X 10%. A toxicidade ao Triton-X se deve a ação desreguladora da bicamada lipídica da célula,

o que favorece a destruição da compactação e integridade da membrana lipídica (KOLEY; BARD, 2010).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (Graphpad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Os dados são expressos como média \pm DP. A significância estatística das médias da PAS, PAD, PAM e NO entre sham e FBM foram comparadas pelo teste t de Student. A significância estatística entre os grupos da Reatividade vascular; Detecção de NO; Viabilidade celular, foi testada por ANOVA de uma via (teste post hoc: Newman - Keuls). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

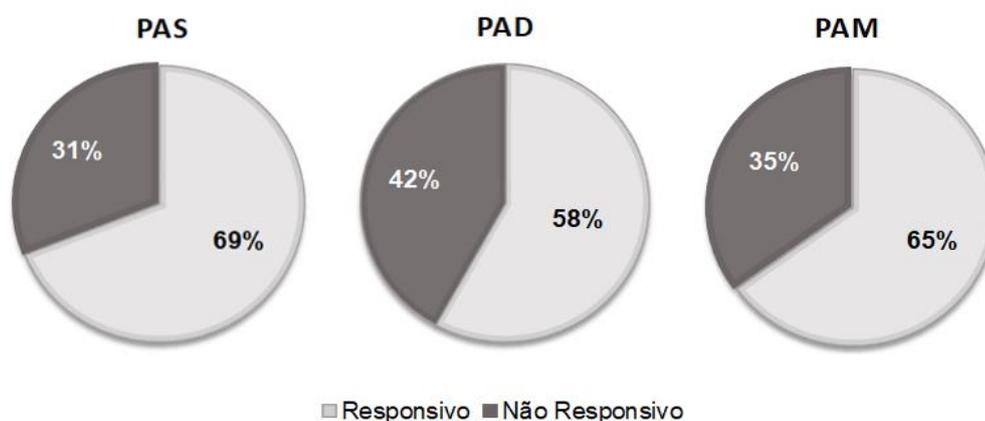
RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)

A fotobiomodulação, utilizando laser de 660 nm de forma aguda, foi capaz de reduzir a pressão arterial sistólica em 69% do total de SHR, a pressão arterial diastólica em 58% e a pressão arterial média em 65% (Figura 7).

Figura 7. Porcentagem de SHR responsivos à fotobiomodulação.

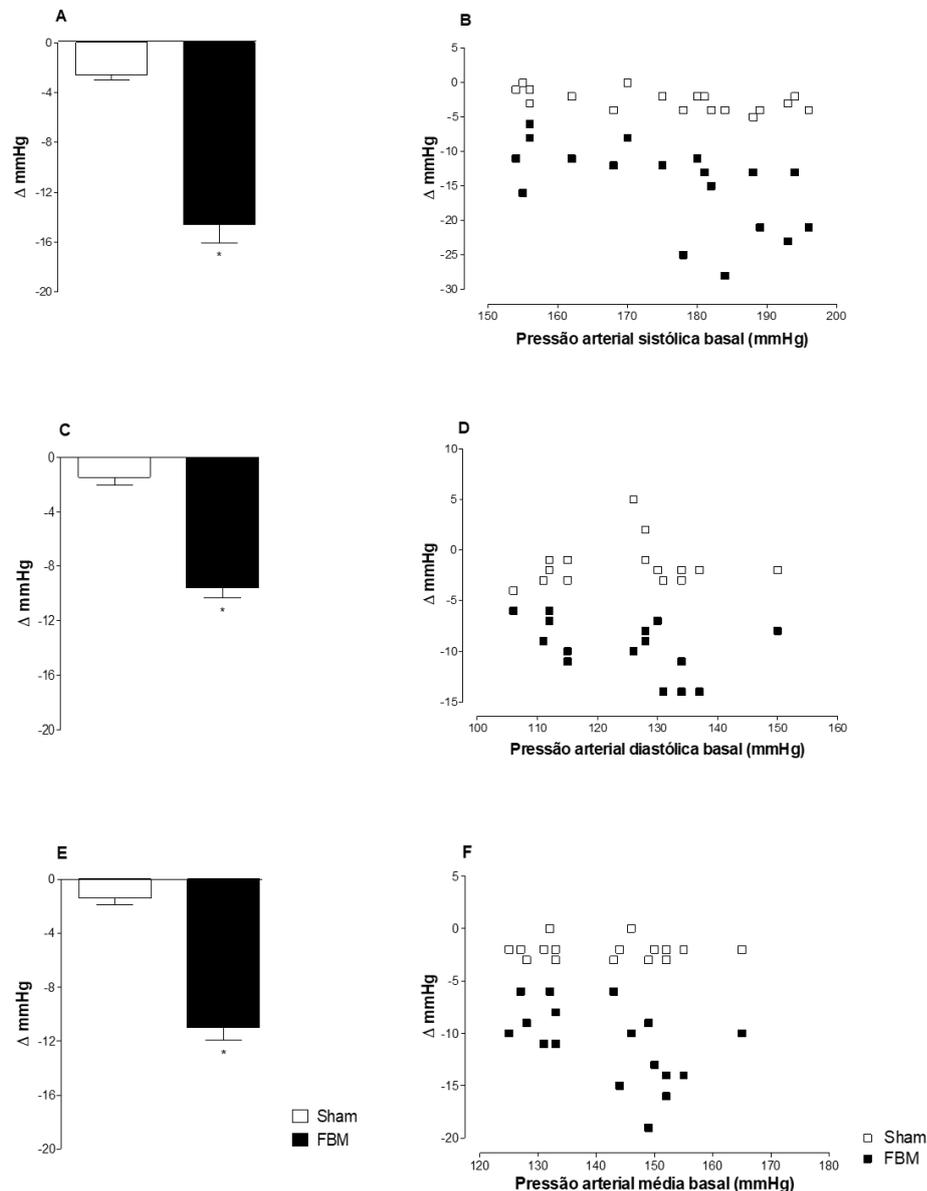


Pressão arterial sistólica (PAS): dezoito (69%) ratos exibiram uma diminuição da PAS; pressão arterial diastólica (PAD): Quinze (58%) ratos exibiram uma diminuição da PAD; pressão arterial média (PAM): dezessete (65%) ratos exibiram uma diminuição da PAM. Total de ratos utilizados: 26

Avaliando somente os SHR responsivos, a magnitude do efeito hipotensivo gerado pela FBM, foi maior do que a provocada no procedimento Sham em relação à pressão arterial sistólica (Δ PAS FBM: $-14,5 \pm 6,3$ mmHg; Δ PAS Sham: $-2,6 \pm 1,5$, $n=18$, $p<0,05$) (figura 8A e 8B); pressão arterial diastólica (Δ PAD FBM: $-9,6 \pm 2,7$ mmHg; Δ PAD Sham: $-1,5 \pm 2,2$ mmHg, $n=15$, $p<0,05$) (figura 8C e 8D); e pressão arterial média (Δ PAM FBM: $-11 \pm 3,73$ mmHg; Δ PAM Sham: $-1,4 \pm 1,87$ mmHg, $n=17$, $p<0,05$) (figura 8E e 8F).

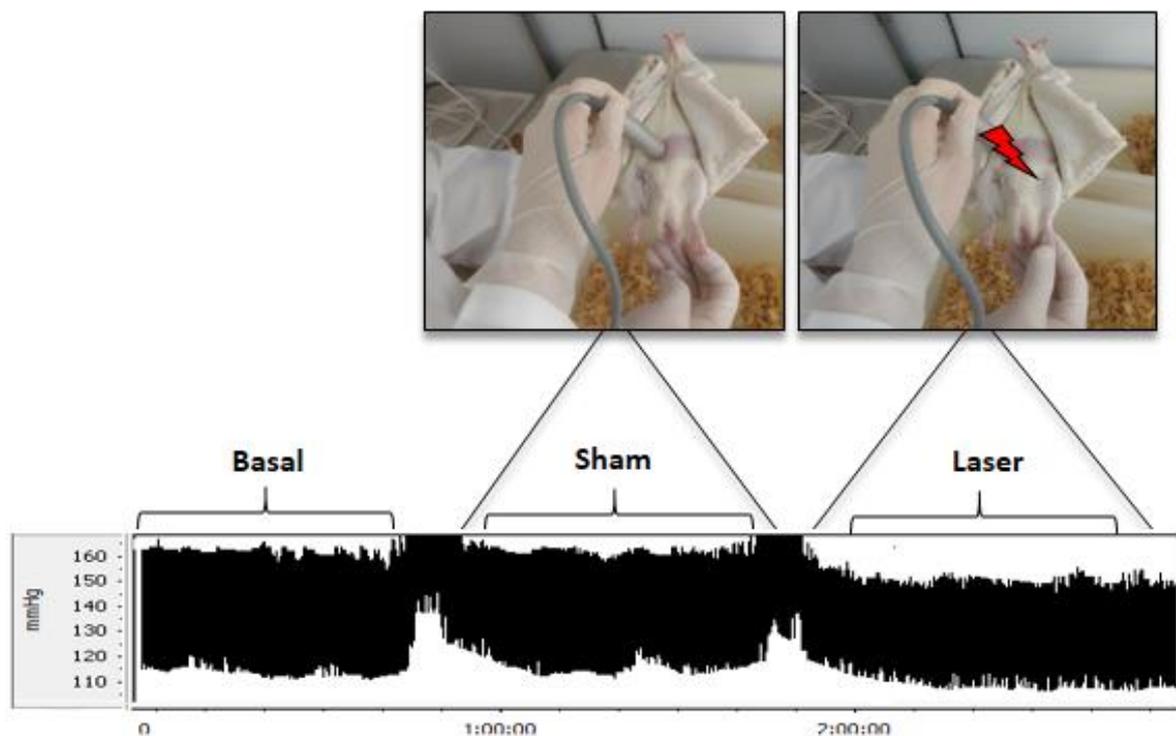
Nas figuras 8B, 8D e 8F, os dados indicam que o efeito da FBM na diminuição da PA é maior nos animais com níveis basais mais altos de PA.

Figura 8. Efeito da fotobiomodulação na pressão arterial de SHR responsivos à FBM.



A. Diminuição da pressão arterial sistólica (PAS) após a FBM em comparação com o procedimento Sham ($n=18$, $p<0,05$). **B.** Distribuição dos animais de acordo com a PAS basal e a diminuição da PAS após FBM ou Sham. **C.** Diminuição da pressão arterial diastólica (PAD) após a FBM em comparação com o Sham ($n=15$, $p<0,05$). **D.** Distribuição dos animais de acordo com a PAD basal e a diminuição da PAD após a FBM ou Sham. **E.** Diminuição da pressão arterial média (PAM) após a FBM em comparação com o Sham ($n=17$, $p<0,05$). **F.** Distribuição dos animais de acordo com a PAM basal e a diminuição da PAM após a FBM ou Sham. As barras mostram a média \pm DP da diminuição da pressão arterial sistólica, diastólica e média. * indica diferença da FBM vs Sham.

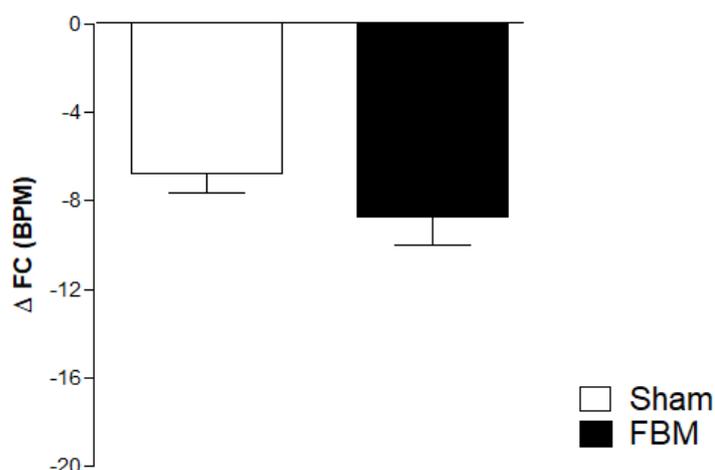
Figura 9. Imagem representativa do registro da pressão arterial de SHR. Obtido após a simulação da aplicação do laser (Sham) e da aplicação do laser.



Fonte: próprio autor

A frequência cardíaca (FC) não foi alterada pela FBM, em comparação com o procedimento Sham (ΔFC FBM: $-8,69 \pm 6,52$ bpm; ΔFC Sham: $-6,74 \pm 4,63$ bpm, $n=26$, $p>0,05$) (figura 10).

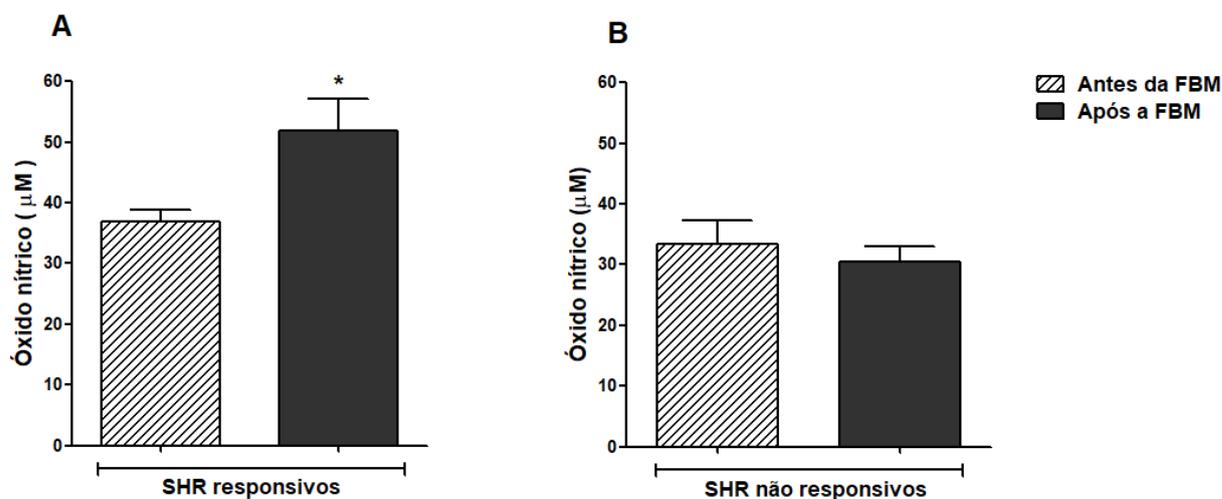
Figura 10. Efeito da fotobiomodulação na frequência cardíaca (FC) de SHR.



A resposta bradicárdica é representada por ΔFC (bpm). As Barras representam a média \pm DP, $p > 0,05$.

A análise da concentração sérica de NO, antes e após a FBM, indicou que a FBM foi capaz de aumentar os níveis de NO. No entanto, este efeito não foi observado em todos os SHR utilizados. Curiosamente, o aumento nos níveis de NO ocorreu apenas nos animais responsivos à FBM, ou seja, nos animais que a FBM promoveu diminuição da PAS (Antes: $36,91 \pm 1,91 \mu\text{M}$; Depois: $51,90 \pm 5,13 \mu\text{M}$, $n=18$, $p < 0,01$) (figura 11A), sem aumento da concentração de NO em animais não responsivos à FBM (Antes: $33,39 \pm 3,92 \mu\text{M}$; Depois: $30,47 \pm 2,57 \mu\text{M}$, $n=8$, $p > 0,05$) (figura 11B).

Nos SHR responsivos à FBM, a duração do efeito hipotensivo foi em média 25 minutos ($25,3 \pm 12,46 \text{ min.}$, $n=18$).

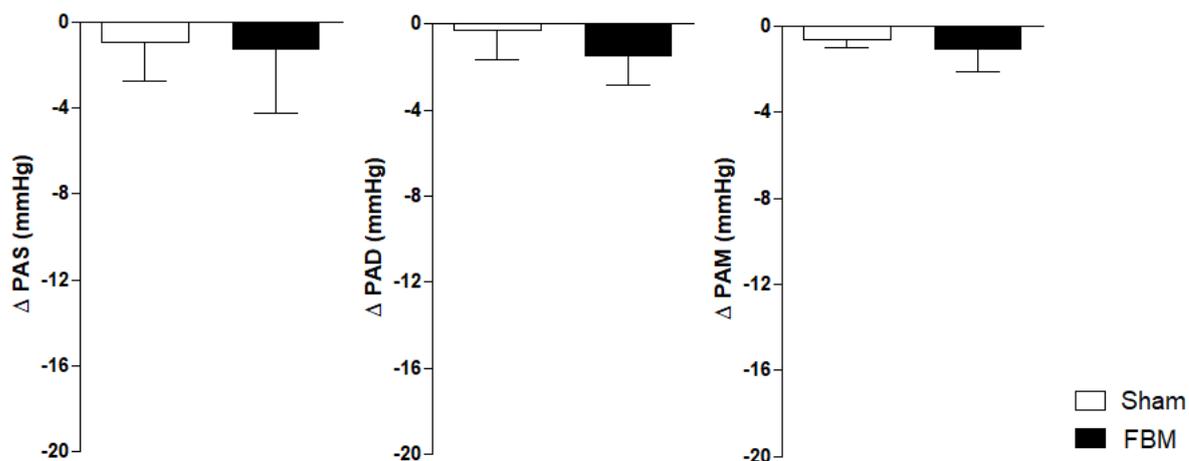
Figura 11. Efeito da fotobiomodulação na concentração sérica de óxido nítrico de SHR.

A. Concentração sérica de NO dos SHR responsivos à FBM, antes e depois da FBM (n=18, p<0,01).
B. NO sérico dos SHR não responsivos à FBM, antes e depois da FBM (n=8, p>0,05). As barras representam a média \pm DP da concentração de NO. * indica diferença entre antes e depois da FBM, p<0,01.

4.2 EFEITO DA FOTBIOMODULAÇÃO NA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS HIPERTENSOS L-NAME.

O tratamento de ratos Wistar com L-NAME promoveu aumento da pressão arterial (PAS: $166 \pm 18,8$ mmHg, n=10). Em ratos hipertensos L-NAME, não houve redução da PAS, PAD ou PAM após aplicação do laser (Δ PAS FBM: $-1,29 \pm 2,98$ mmHg; Δ PAS Sham: $-0,93 \pm 1,85$; Δ PAD FBM: $-1,46 \pm 3,67$ mmHg; Δ PAD Sham: $-0,33 \pm 3,48$; Δ PAM FBM: $-1,07 \pm 2,69$ mmHg; Δ PAM Sham: $-0,58 \pm 1,08$, n=10, p>0,05) (Figura 12).

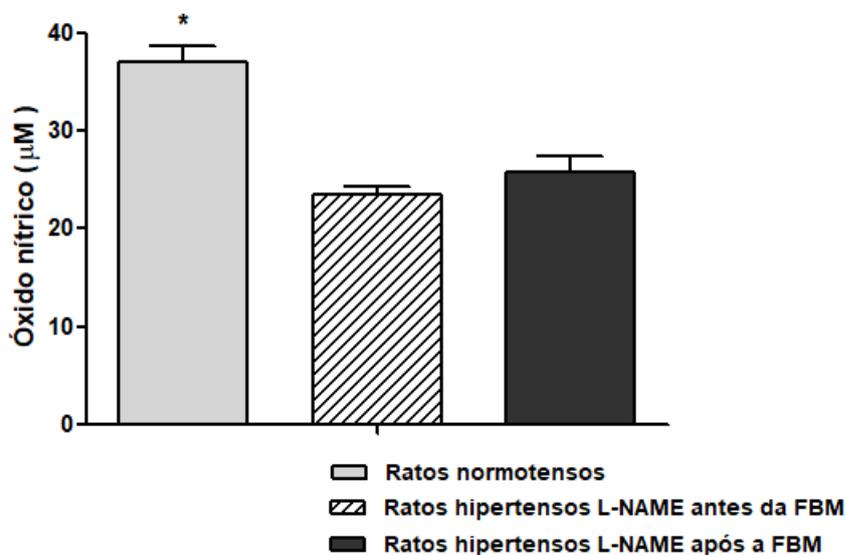
Figura 12. Efeito da fotobiomodulação na pressão arterial de ratos hipertensos L-NAME.



As barras representam a média \pm DP da PAS, PAD e PAM dos grupo Sham e FBM, n=10, p>0,05.

Conforme mostrado na figura 13, o tratamento com o bloqueador da NO sintase (L-NAME) durante duas semanas, promoveu uma diminuição dos níveis séricos de NO quando comparado ao soro dos ratos normotensos não tratados (ratos normotensos: $37,07 \pm 1,62 \mu\text{M}$ vs ratos hipertensos L-NAME antes da FBM: $23,44 \pm 0,83 \mu\text{M}$, n=10, p \leq 0,05). Os ratos hipertensos L-NAME submetidos à FBM não apresentaram aumento nos níveis séricos de NO (ratos hipertensos L-NAME antes da FBM: $23,44 \pm 0,83 \mu\text{M}$ vs ratos hipertensos L-NAME após a FBM: $25,82 \pm 1,64 \mu\text{M}$, n=10, p>0,05).

Figura 13. Efeito do fotobiomodulação na concentração sérica de NO de ratos hipertensos L-NAME.



* indica diferença entre ratos normotensos vs ratos hipertensos L-NAME antes da FBM e ratos hipertensos L-NAME após a FBM, $p \leq 0,05$.

4.3 EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA REATIVIDADE VASCULAR

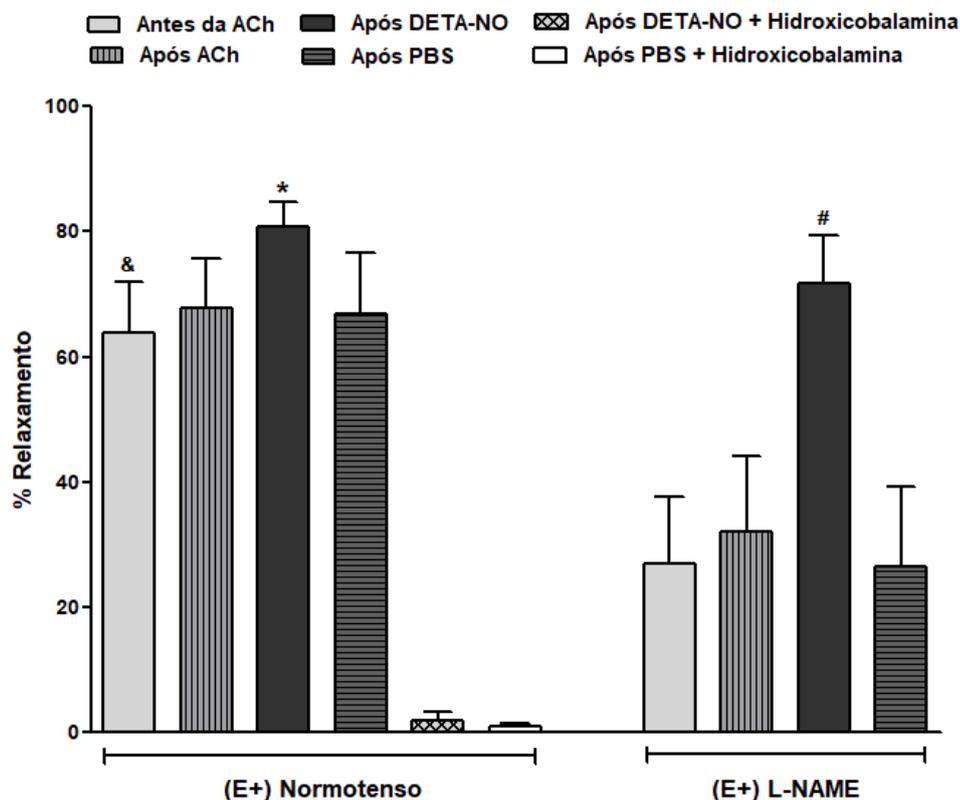
A FBM promoveu maior relaxamento da artéria aorta de ratos normotensos e menor relaxamento da aorta de ratos hipertensos L-NAME (E+ normotensos Antes da ACh: $63,91 \pm 8,05\%$ vs E+ L-NAME Antes da ACh: $27 \pm 10,63\%$, $n=10$, $p \leq 0,001$) (Figura 14).

Não houve aumento no relaxamento com a aplicação do laser após a acetilcolina (ACh) em comparação com a primeira aplicação, antes da acetilcolina (E+ normotensivo: Antes da ACh: $63,91 \pm 8,05\%$ vs Após ACh: $67,75 \pm 7,91\%$; E+ L-NAME: Antes da ACh: $27 \pm 10,63\%$ vs Após ACh: $32,15 \pm 11,99\%$, $n=10$, $p > 0,05$), mostrando que não há influência do teste de integridade do endotélio com acetilcolina nos resultados.

Após promover o acúmulo de óxido nítrico com o doador de NO DETA-NO nos anéis aórticos, a FBM causou maior relaxamento, enquanto a incubação com diluente PBS, não alterou o relaxamento mediado pela FBM (E+ normotenso

Antes da ACh: $63,91 \pm 8,05\%$ vs E+ normotenso Após DETA-NO: $80,83 \pm 4,02\%$, $n=10$, $p \leq 0,05$; vs E+ normotenso Após PBS: $67 \pm 9,53\%$, $n=10$, $p > 0,05$) (E+ L-NAME Antes da ACh: $27 \pm 10,63\%$ vs E+ L-NAME Após DETA-NO: $71,75 \pm 7,55\%$, $n=10$, $p \leq 0,001$; vs E + L-NAME Após PBS: $26,50 \pm 12,77\%$, $n=10$, $p > 0,05$). A incubação com o sequestrador de NO (HidroxicoBALAMINA) aboliu o relaxamento induzido por FBM (Figura 14).

Figura 14. Relaxamento induzido pela fotobiomodulação em anéis aórticos com endotélio (E+).



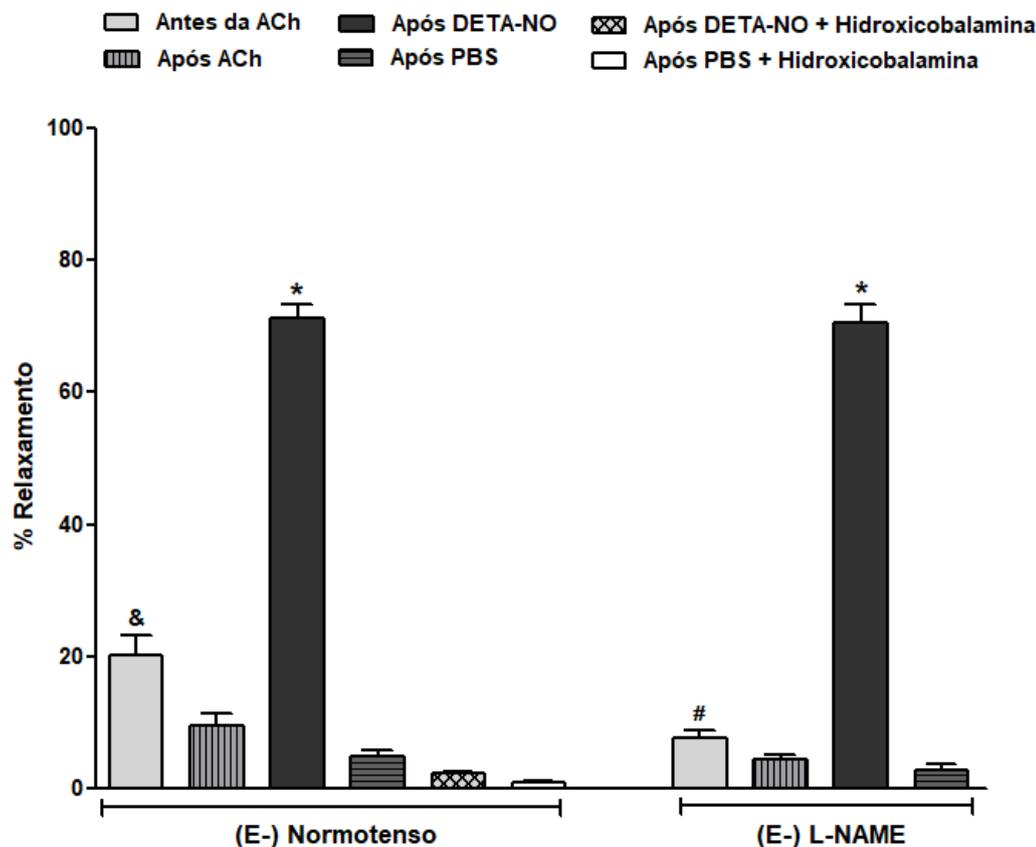
* indica diferença no relaxamento ente a aplicação do laser Após DETA-NO (E+ Normotenso) vs Antes da ACh (E+ Normotenso); Após ACh (E+ Normotenso) e Após PBS (E+ Normotenso), $p \leq 0,05$. # indica diferença entre Após DETA-NO (E+ L-NAME) vs Antes da ACh (E+ L-NAME), Após ACh (E+ L-NAME) e Após PBS (E+ L-NAME), $p \leq 0,001$. & indica diferença entre, Antes da ACh (E+ Normotenso) vs Antes da ACh (E+ L-NAME), $p \leq 0,001$.

Foi observado menor efeito vasodilatador da FBM em anéis de aorta com endotélio foi removido, tanto para aorta de ratos normotensos, quando de ratos

hipertensos L-NAME. Além disso, os resultados mostram que a primeira aplicação do laser promoveu maior relaxamento que a segunda aplicação (E- normotenso: Antes de ACh: $20,30 \pm 8,05\%$ vs Após ACh: $9,45 \pm 5,30\%$, $n=10$, $p \leq 0,01$; E- L-NAME Antes da ACh: $7,8 \pm 2,65\%$ vs Após ACh: $4,4 \pm 2,2\%$, $n=10$, $p \leq 0,05$).

Após promover o acúmulo de NO com DETA-NO, a FBM também induziu maior relaxamento na artéria sem endotélio, enquanto que, após a incubação com o diluente de PBS, houve menor relaxamento mediada pela FBM (E- normotenso Antes de ACh: $20,30 \pm 7,70\%$ vs E- normotenso Após DETA-NO: $71,20 \pm 5,71$, $n=10$, $p \leq 0,001$; vs E- normotenso Após PBS: $4,83 \pm 2,93$, $n=10$, $p \leq 0,01$) (E- L-NAME Antes da ACh: $7,8 \pm 2,65\%$ vs E-L-NAME Após DETA-NO: $70,50 \pm 7,70\%$, $n=10$, $p \leq 0,001$; vs E-L-NAME Após PBS: $2,75 \pm 2,36$, $n=10$, $p < 0,05$) A incubação com o sequestrador de NO, Hidroxicobalamina, aboliu o relaxamento induzido pela FBM (Figura 15).

Figura 15. Relaxamento induzido pela fotobiomodulação em anéis aórticos sem endotélio (E-).



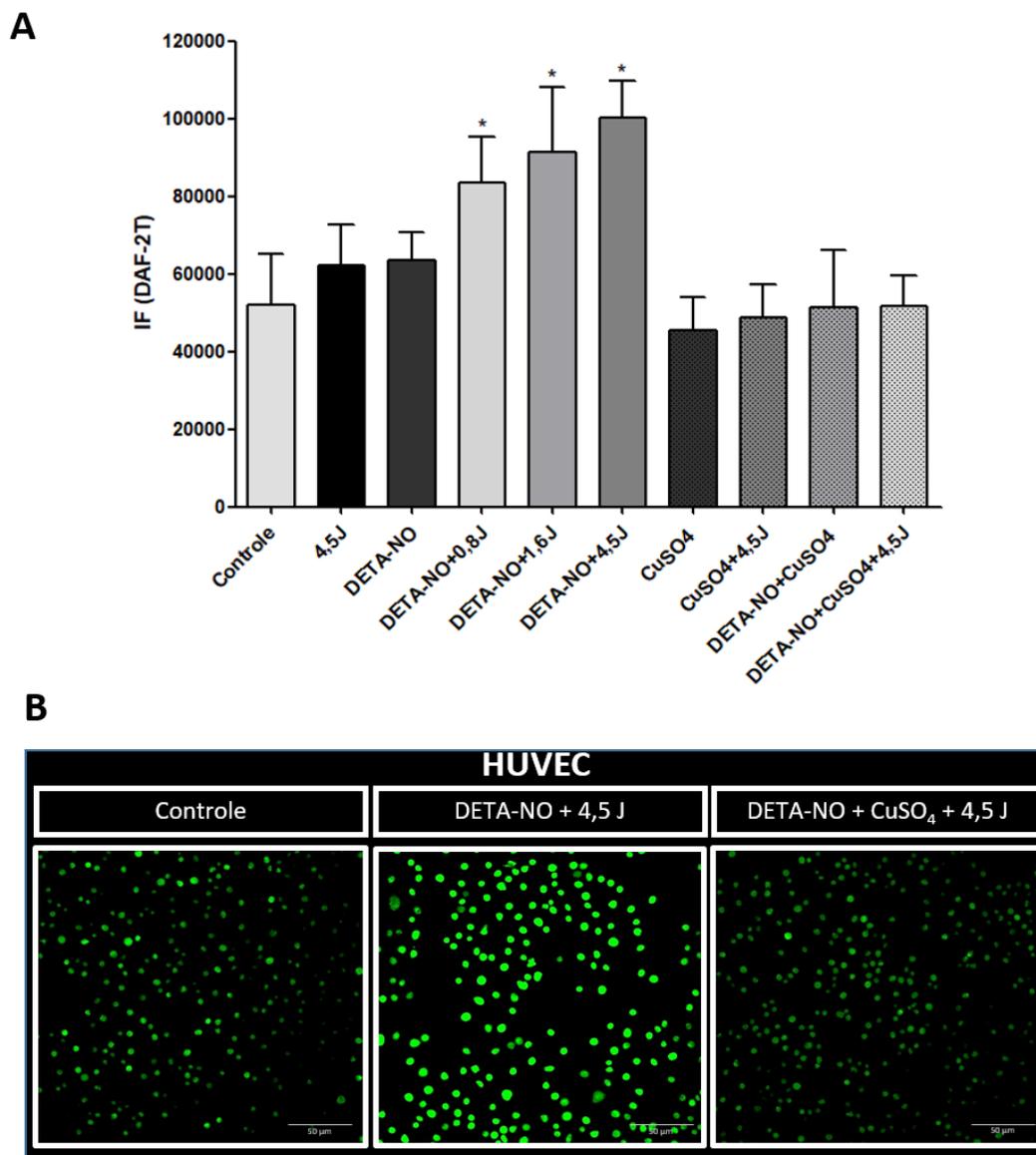
* Indica diferença entre Após DETA-NO (E- Normotenso) e Após DETA-NO (E- L-NAME) vs demais grupos, $p \leq 0,001$. & indica diferença entre Antes da ACh (E- Normotenso) vs Após ACh (E- Normotenso) e Após PBS (E- Normotenso) $p \leq 0,01$. # Indica diferença entre Antes da ACh (E- L-NAME) vs Após ACh (E- L-NAME) e Após PBS (E- L-NAME) $p \leq 0,05$.

4.4 DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CULTURA APÓS FOTOBIMODULAÇÃO

A detecção de NO foi realizada utilizando a sonda fluorescente DAF-2 DA, pela acumulação do produto DAF-2T, e foi observado maior detecção de NO nos grupos tratados previamente com o doador de NO DETA-NO seguido da aplicação do laser (Controle: 52.221 ± 13.041 IF vs DETA-NO+4,5J: 100.212 ± 9.506 IF, DETA-NO+1,6J: 91.537 ± 16.682 IF, DETA-NO+0,8J: 83.715 ± 11.690 IF, $n=9$, $p \leq 0,001$), no entanto, essa resposta foi abolida com a adição de CuSO_4 , ficando o

grupo DETA-NO + CuSO₄ + 4,5J com valores próximos ao controle (DETA-NO+4,5J: 100.212 ± 9.506 IF vs DETA-NO+CuSO₄+4,5J: 51.689 ± 7.800 IF, n=9, p≤0,001) (Figura 16).

O grupo DETA-NO sem laser não apresentou maior detecção quando comparado ao controle (Controle: 52.221 ± 13.041 IF vs DETA-NO: 63.618 ± 7.199 IF, n=9, p>0,05), revelando uma evidência da ação do laser sobre os estoques de NO. O grupo 4,5 J, sem tratamento prévio com DETA-NO também não apresentou aumento na intensidade de fluorescência (Controle: 52.221 ± 13.041 IF vs 4,5J: 62.312 ± 10.558 IF, n=9, p>0,05)

Figura 16. Quantificação do NO intracelular em HUVEC após fotobiomodulação.

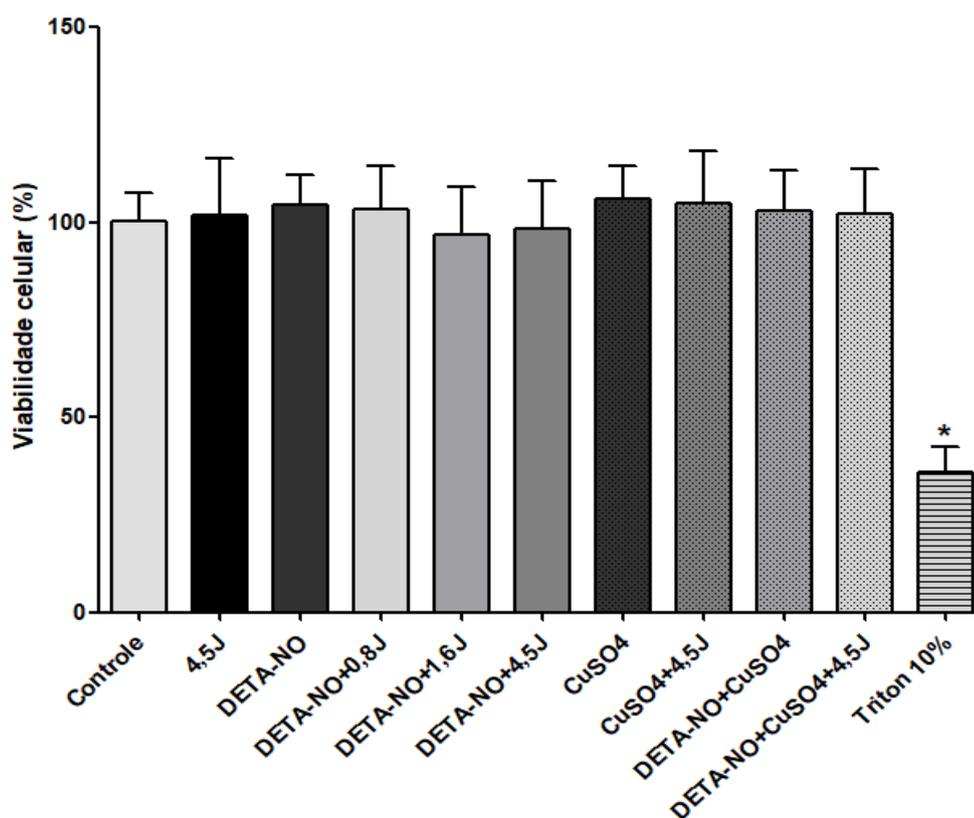
A.* Indica diferença da Intensidade de fluorescência (IF) entre DETA-NO + 4,5 J, DETA-NO + 1,6 J, DETA-NO + 0,8 J vs demais grupos. As barras representam \pm DP, $p \leq 0,001$. B. Imagem representativa de HUVECs não expostas à FBM (controle), expostas à FBM (DETA-NO + 4,5 J) e que foram expostas à FBM após a decomposição dos estoques de NO por CuSO_4 .

4.5 VIABILIDADE CELULAR

Utilizando o ensaio colorimétrico MTT para avaliação da viabilidade celular, os resultados demonstram que a viabilidade das células não foi afetada por nenhum tratamento utilizado no protocolo de detecção de NO (Controle: $100 \pm 7,48\%$ vs 4,5J: $102 \pm 14,59\%$; DETA-NO: $104 \pm 7,57\%$; DETA-NO+4,5J: $98 \pm$

12,27%; DETA-NO+1,6J: $96,93 \pm 12,18\%$; DETA-NO 0,8J: $103 \pm 10,80\%$; CuSO_4 : $105 \pm 8,61\%$; $\text{CuSO}_4+4,5\text{J}$: $100 \pm 8,6\%$; DETA-NO+ CuSO_4 : $103 \pm 10,32\%$; DETA-NO+ $\text{CuSO}_4+4,5\text{J}$: $102 \pm 11,48\%$, $n=9$ $p>0,05$). O Triton foi efetivo para o controle do método (Controle: $100 \pm 7,48\%$ vs Triton 10%: $35,633\%$, $n=9$, $p\leq 0,001$).

Figura 17. Avaliação da viabilidade celular por MTT



*Indica diferença entre Triton 10% vs demais grupos, $p\leq 0,001$. As barras representam a média \pm DP da porcentagem de células viáveis.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A FBM, utilizando laser 660 nm, induziu um efeito hipotensivo notável em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), porém, não causou o mesmo efeito em ratos hipertensos L-NAME, indicando que o óxido nítrico (NO) tem importante papel na diminuição da PA promovida pela FBM.

Estudos observacionais e estudos randomizados indicam que uma redução de 2 mmHg na pressão arterial diastólica está associada a uma redução de 15% no risco de acidente vascular cerebral e uma redução de 6% no risco de doença cardíaca coronária (COOK et al., 1995). No presente estudo, foi demonstrado que a FBM pode induzir uma diminuição considerável da pressão arterial sistólica, diastólica e média em um modelo experimental de hipertensão arterial utilizando ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e esta diminuição apresenta maior ênfase nos animais com níveis basais mais altos de pressão arterial. Os SHR são considerados um modelo experimental de hipertensão semelhante à hipertensão essencial em humanos (TRIPPODO; FROHLICH, 1981), que pode ser definida como um aumento da pressão arterial por causa desconhecida, que eleva o risco de eventos cardíacos, cerebrovasculares e renais (MESSERLI; WILLIAMS; RITZ, 2007).

Nossos resultados corroboram com os dados apresentados por Oishi et al. (2017) que observaram que a aplicação aguda de laser vermelho (660 nm – 5,6 J) induziu um efeito hipotensivo duradouro em ratos hipertensos 2 rins - 1 clipe (2R-1C), um modelo experimental onde a hipertensão ocorre pela ativação do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. Tomimura et al. (2014) também demonstraram que a FBM reduz os níveis de pressão arterial diastólica e média em SHR por meio do tratamento crônico, durante sete semanas, com laser vermelho (780 nm, 30

J/cm²) com aplicação por via transcutânea na cauda. Assim, os resultados do presente estudo e outros já citados, mostraram que a fotobiomodulação utilizando laser 660 nm de maneira sistêmica, causa diminuição da PA.

A diminuição da PA não foi observada em todos os animais SHR, indicando que parte dos animais não respondem a dose utilizada e/ou não respondem à FBM. Este resultado pode envolver uma possível resistência à FBM, em analogia ao uso de medicamentos anti-hipertensivos. Estudos indicam que aproximadamente 15% dos pacientes hipertensos são resistentes a medicamentos anti-hipertensivos (SIM et al., 2013; SIDDIQUI; DUDENBOSTEL; CALHOUN, 2016). Segundo a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (MALACHIAS et al., 2016) a Hipertensão arterial resistente (HAR) é definida como a pressão alta de consultório que permanece descontrolada com o uso de 3 ou mais medicamentos anti-hipertensivos diferentes em doses adequadas, incluindo um diurético.

Outro resultado relevante do presente estudo é o efeito hipotensivo duradouro promovido pela FBM (em média 25 minutos), e apesar do tempo prolongado e da notável diminuição da pressão arterial dos SHR submetidos à FBM, a frequência cardíaca não foi alterada; isto é, não foi observada taquicardia reflexa. O nitroprussiato de sódio é um dos doadores de NO mais utilizados na clínica, mas a administração intravenosa induz hipotensão rápida, desativando os barorreceptores e promovendo taquicardia reflexa (YAKAZU et al., 2001). Além disso, o nitroprussiato de sódio tem um rápido início de ação e uma curta duração (SIDEBOTHAM et al., 2007). A frequência cardíaca elevada é um fator de risco em várias patologias cardiovasculares (DYER et al., 1980; HEIDLAND; STRAUER, 2001; SUN et al., 2014). As espécies animais que exibem uma frequência cardíaca acelerada têm uma vida útil mais curta, em comparação com animais com uma

frequência cardíaca baixa (LEVINE, 1997). Considerando os resultados do presente estudo, observou-se que a FBM não promoveu aumento reflexo da frequência cardíaca, associado à diminuição da pressão arterial.

A FBM foi capaz de promover uma diminuição da PA em ratos SHR, mas não em ratos hipertensos tratados com L-NAME. No modelo experimental de ratos hipertensos L-NAME, os ratos são tratados com o inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS), L-NAME, onde a via de produção endógena de NO é bloqueada. A produção de NO endógena é importante para a modulação do tônus vascular, sendo que os animais tratados com L-NAME apresentam elevação na pressão arterial. Este resultado mostra de forma clara o papel essencial do NO efeito hipotensivo induzido pela FBM. O óxido nítrico (NO) é o principal vasodilatador endógeno e é produzido pela NO sintase endotelial (eNOS). No músculo liso vascular, o NO se liga à guanilato ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), induzindo o relaxamento vascular (RAPOPORT; DRAZNIN; MURAD, 1983; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015; FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018).

Os resultados do presente trabalho mostraram um aumento na concentração sérica de NO nos SHR submetidos à FBM, contudo, este aumento só foi detectado nos animais responsivos à FBM. Nos animais que não apresentaram queda da PA após a FBM os níveis de NO sérico ficaram inalterados (figura 11). Já nos ratos hipertensos L-NAME não foi detectado aumento de NO sérico pós FBM. Esta medida da concentração sérica de NO indica que a liberação de NO é necessária para o efeito hipotensivo da FBM. Oishi et al. (2017), observaram que o laser vermelho (660 nm) promoveu um aumento dos níveis de NO no sangue de ratos normotensos e hipertensos 2R-1C, resultando em um efeito hipotensivo em

ambos os animais. A comparação entre os níveis de NO sérico de ratos normotensos e ratos tratados com L-NAME mostrou a eficiência do método empregado para a indução da hipertensão, os ratos tratados com L-NAME nos parâmetros definidos, tiveram uma diminuição da concentração de NO.

O NO pode ser “estocado” ao reagir com tióis para formar S-nitrosotióis (RSNO), processo chamado S-nitrosilação. Para a formação de RSNO, compostos contendo sulfidrina, como cisteína, glutathiona e albumina são alvos importantes (KEH; GERLACH; FALKE, 2000). A clivagem homolítica da ligação S-N promove a liberação de NO e, em condições fisiológicas, os S-nitrosotióis agem como doadores de NO⁺, NO[•] e NO⁻ (ARNELLE; STAMLER, 1995). A S-nitrosilação pode ser gerada endogenamente por NO sintetizado pela NOS ou induzida exogenamente por doadores de NO. Os resultados da reatividade vascular apresentados neste trabalho, mostram que a FBM induziu maior relaxamento na aorta isolada de ratos normotensos, quando comparado ao seu efeito na aorta isolada de ratos hipertensos L-NAME, indicando que, em animais com pouca produção de NO e, conseqüente baixo estoque de NO, o efeito da FBM por laser é menor.

A FBM por laser causa vasodilatação independente da ativação da óxido nítrico sintase (NOS). Este fato foi verificado quando, Plass et al. (2012) utilizando coronárias de porco e Oishi et al. (2017) utilizando artéria aorta de ratos, mostraram que a irradiação com laser vermelho, 680 nm ou 660 nm respectivamente, provocou relaxamento do músculo liso vascular envolvendo um mecanismo dependente de NO, mas independente da ativação da óxido nítrico sintase (NOS). Estes resultados foram obtidos pela incubação das artérias com o inibidor da NOS (L-NAME), seguida da aplicação do laser, onde os autores observaram que, mesmo após a inibição da NOS, o relaxamento ainda ocorria.

Estes dados mostram que a FBM não atua diretamente na NOS e, portanto, a ausência de efeito hipotensor da FBM em ratos hipertensos L-NAME não foi devido ao bloqueio da NOS, mas, provavelmente, pela diminuição do estoque de NO.

Para aumentar o estoque de NO nos anéis aórticos isolados, estes foram incubados com o doador de NO, DETA-NO, e tanto em anéis aórticos de ratos hipertensos L-NAME quanto de ratos normotensos, com (E+) e sem (E-) endotélio, a vasodilatação foi aumentada pós FBM. Para confirmar a participação do NO neste efeito vasodilatador da FBM, foi realizada a incubação destes anéis com Hidroxicobalamina, um sequestrador de NO, e o efeito vasodilatador foi abolido quando realizada a aplicação do laser. Observamos, ainda, que em vasos com endotélio intacto, a porcentagem de dilatação após a aplicação do laser foi maior do que nos vasos sem endotélio, sugerindo que os estoques de NO estão em maior quantidade nas células endoteliais e não nas células do músculo liso, e/ou com a remoção do endotélio a formação de estoques de NO foi menor, uma vez que há produção basal e constante de NO pela eNOS que estão mais concentradas no endotélio.

A fim de verificar a atuação do laser vermelho (660 nm) na liberação de NO de RSNO, células endoteliais (HUVEC) foram incubadas com doador de NO, DETA-NO, para promover o acúmulo de estoque de NO e, após a aplicação do laser (660 nm; 4,5 J), foi observado um aumento na detecção de óxido nítrico pelo aumento da intensidade de fluorescência gerado pelo produto da sonda seletiva para NO DAF-2 DA (DAF-2T). Quando estas células foram tratadas com DETA-NO, mas não foram submetidas à FBM, não foi detectado aumento de fluorescência, indicando que a FBM utilizando laser, atua na liberação de NO. Também não houve aumento de NO após a aplicação do laser em células tratadas previamente com

CuSO₄. O Cobre catalisa a decomposição dos estoques de NO (GORREN et al., 1996; KOLESNIK et al., 2013), diminuindo a concentração de RSNO. Este resultado indica que o aumento da detecção de NO após a aplicação do laser, é devido a liberação de NO de estoques de NO.

Alguns estudos já indicam que os S-nitrosotióis medeiam a vasodilatação gerada pela luz. Megson et al. (2000) observaram um menor relaxamento gerado pela luz laser (514,5 nm) em artérias da cauda de ratos tratados com o inibidor da γ -glutamilcisteína sintetase, butionina sulfoximina (BSO), chegando à conclusão que o armazenamento fotossensível de NO é gerado a partir de GSH intracelular que se converte em S-nitrosoglutathione (GSNO). Ng et al. (2007) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência mostraram que a luz ultravioleta foi capaz de induzir a liberação de NO de S-nitrosoglutathione. Keszler et al. (2018) demonstraram uma liberação de NO, a partir de soluções puras de complexos S-nitrosotiol de baixo peso molecular (GSNO e SNAP) ou complexo dinitrosil-ferro glutathione (GSH-DNIC), usando fontes de luz LED. Além disso, eles também demonstraram que o comprimento de 670 nm exibiu o maior efeito. Os mecanismos propostos para a liberação de NO provocado por irradiação, leva em consideração a liberação de NO a partir de estoques intracelulares que podem ser S-nitrosotióis, heme nitrosil e complexos dinitrosilo de ferro (KANNEL, 1996; KESZLER et al., 2018).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o efeito vasodilatador induzido pela FBM utilizando laser de 660 nm, é modulado pela concentração de estoque de NO por favorecer a fotólise dos estoques intracelulares de NO, aumentando sua biodisponibilidade para desempenhar sua função. Assim, o

efeito hipotensivo observado nos SRH com a FBM a laser de 660 nm é dependente da liberação de NO promovida pela fotoestimulação.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram que a FBM, de forma aguda, utilizando laser vermelho a 660 nm, induz efeito hipotensivo duradouro e vasodilatação em anéis aórticos isolados, o quais são modulados pela liberação de óxido nítrico de estoques.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIMBIRE, F. et al. Low-Level Laser Therapy Induces Dose-Dependent Reduction of TNF_ Levels in Acute Inflammation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, p. 33-37, 2006.
- ALBERTINI, R. et al. Effects of different protocol doses of low Power gallium–aluminum–arsenate (Ga–Al–As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 74, p. 101-107, 2004.
- ALDERTON, W. K.; COOPER C. E.; KNOWLES R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J.**, v. 357, p. 593-615, 2001.
- ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **FASEB Journal**, v. 7, p. 349-360, 1993.
- ARNELLE, D. R.; STAMLER, J. S. NO⁺, NO·, and NO⁻ Donation by S-Nitrosothiols: Implications for Regulation of Physiological Functions by S-Nitrosylation and Acceleration of Disulfide Formation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, p. 279-285, 1995.
- ARNOLD, W. P.; LONGNECKER, D. E.; EPSTEIN, R. M. Photodegradation of sodium nitroprusside: biologic activity and cyanide release. **Anesthesiology**, v. 61, p. 254-260, 1984.
- AVNI, D, et al. Protection of Skeletal Muscles from Ischemic Injury: Low-Level Laser Therapy Increases Antioxidant Activity. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, p. 273-277, 2005.
- BELTOWSKI, J. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 39, p. 168-78, 2012.
- CHEN, C.; HUNG, H.; HSU, S. Low-Energy Laser Irradiation Increases Endothelial Cell Proliferation, Migration, and eNOS Gene Expression Possibly Via PI3K Signal Pathway. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, p. 46-54, 2008.
- CLEETER, M. W. et al. Reversible inhibition of cytochromecoxidase, the terminal enzyme of the mitochondrialrespiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. **FEBS Lett.**, v. 345, p. 50-54, 1994.
- COOK, N. R. et al. Implications of small reductions in diastolic blood pressure for primary prevention. **Arch Intern Med.**, v. 155, p. 701-709, 1995.

- DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, 2016.
- DERKACZ, A. et al. Effects of Intravascular Low-Level Laser Therapy During Coronary Intervention on Selected Growth Factors Levels. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, p. 582-587, 2014.
- DIETERLE, A. M. et al. PDK1 controls upstream PI3K expression and PIP3 generation. **Oncogene**, v. 33, p. 3043-3053, 2014.
- DYER, A. R. et al. Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies. **Am J Epidemiol.**, v. 112, p. 736-749, 1980.
- FARAH, C.; MICHEL, L. Y. M.; BALLIGAND, J. Nitric Oxide Signalling in Cardiovascular Health and Disease. **Nat Rev Cardiol.**, v. 15, p. 292-316, 2018.
- FEELISH, M.; KELM, M. Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle and endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 180, p. 286-293, 1991.
- FERNANDO, V. et al. S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling. **Antioxidants**, v. 08, p. 02-32, 2019.
- FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J.**, v. 33, p. 829-837, 2011.
- FREIS, E. D. Hemodynamics of hypertension. **Physiol Ver.**, v. 40, p. 27-54, 1960.
- FRIEDERICH, J. A.; BUTTERWORTH, J. F. Sodium Nitroprusside: Twenty years and counting, **Anesth Analg.**, v. 81, p. 152-162, 1995.
- FROHLICH, E. D, et al. The heart in hypertension. **N Engl J Med.**, v. 327, p. 998-1008, 1992.
- FUKATSU, A. et al. Possible usefulness of apocynin, an NADPH oxidase inhibitor, for nitrate tolerance: prevention of NO donor-induced endothelial cell abnormalities. **American Journal Physiology**, v. 293, p. 790-797, 2007.
- GORREN, A. C. et al. Decomposition of S-Nitrosoglutathione in the Presence of Copper Ions and Glutathione. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 330, p. 219-228, 1996.
- GUAN, J. L. Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 29, p. 1085-1096, 1997.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ed., 2006.

HAMBLIN, M. R.; HUANG, Y. **Handbook of Photomedicine**. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2014, 828 p.

HEIDLAND, U. E.; STRAUER, B.E. Left ventricular muscle mass and elevated heart rate are associated with coronary plaque disruption. **Circulation**, v. 104, p. 1477-1482, 2001.

HESS, D. T. et al. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, p. 150-166, 2005.

HUANG, Y. Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose Response**, v. 7, p. 358-383, 2009.

HUNTER, R. A.; SCHOENFISCH, M. H. S-Nitrosothiol Analysis via Photolysis and Amperometric Nitric Oxide Detection in a Microfluidic Device. **Anal Chem.**, v. 87, p. 3171-3176, 2015.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 9265–9269, 1987.

JIANG, F; LI, C. G; RAND, M. J. Effect of hydroxocobalamin on vasodilatations to nitrenergic transmitter, nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor in guinea-pig basilar artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 340, p. 181-186, 1997

JUNG, O. et al. Resistant hypertension? Assessment of adherence by toxicological urine analysis. **J Hypertens.**, v. 31, p. 766-774, 2013.

KANNEL, W.B. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. **JAMA**, v. 275, p. 1571-1576, 1996.

KARU, T. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Sci**, v.2, p.53-74, 1988.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol B.**, v. 49, p. 01-17, 1999.

KEH, D.; GERLACH, H.; FALKE, K. **Inhalation Therapy with Nitric Oxide Gas**. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Germany: B Mayer, 2000. 33 p.

KESZLER, A. et al. Wavelength-dependence of vasodilation and NO release from S-nitrosothiols and dinitrosyl iron complexes by far red/near infrared light. **Arch Biochem Biophys**, v. 649, p. 47-52, 2018.

KOLESNIK, B. et al. Efficient nitrosation of glutathione by nitric oxide. **Free Radic Biol Med.**, v. 63, p. 51-64, 2013.

KOLEY, D; BARD, A. J. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). **PNAS**, vol. 107, p. 16783-16787, 2010.

KORTH, H. G. et al. On the mechanism of the nitric oxide synthase-catalyzed conversion of N omega-hydroxyl-L-arginine to citrulline and nitric oxide. **J Biol Chem.**, v. 269, p. 17776-9, 1994.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion (inflammation/shear rate/NG-monomethyl-L-arginine/NG-nitro-L-arginine methyl ester/arginine). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 4651-4655, 1991.

LASLETT, L. J. et al. The Worldwide Environment of Cardiovascular Disease: Prevalence, Diagnosis, Therapy, and Policy Issues. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 60, p. 02-49, 2012.

LEVINE, H. J. Rest heart rate and life expectancy. **J Am Coll Cardiol.**, v. 30, p. 1104-1106, 1997.

MAGDER, S. The meaning of blood pressure. **Critical Care**, v. 22, p. 2-10, 2018.

MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v. 187, p. 493 – 494, 1960.

MALACHIAS, M. V. B. et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol.**, v. 107, p. 01-83, 2016.

MANOJ, M. et al. Decomposition of S-Nitrosothiols Induced by UV and Sunlight. **Advances in Physical Chemistry**, v. 23, p. 01-05, 2009.

MARON, B. A; TANG, S.; LOSCALZO, J. S-Nitrosothiols and the S-Nitrosoproteome of the Cardiovascular System. **Antioxid Redox Signal.**, v. 18, p. 270-287, 2013.

MARTÍNEZ-RUIZ, A. et al. Specificity in S-nitrosylation: A short-range mechanism for NO signaling? **Antioxid. Redox Signal.**, v. 19, 1220-1235, 2013.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. **PLoS Medicine**, v. 3, p. 2011-2030, 2006.

MCGUFF PE, DETERLING RA JR, GOTTLIEB LS. Tumoricidal effect of laser energy on experimental and human malignant tumors. **The New England journal of medicine**, v. 273, p. 490–492, 1965.

MEGSON, I. L. et al. Selective modifiers of glutathione biosynthesis and 'repriming' of vascular smooth muscle photorelaxation. **Br J Pharmacol.**, v. 130, p. 1575-1580, 2000.

MESSERLI, F. H.; WILLIAMS, B.; RITZ, E. Essential hypertension. **Lancet**, v. 370, p. 591-603, 2007.

MEZAWA, S. et al. The possible analgesic effect of soft-laser irradiation on heat nociceptors in the cat tongue. **Arch Oral Bio.**, v. 33, p. 693-694, 1988.

MONCADA, S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 15, p. 60-67, 1997.

MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochem Pharmacol.**, v. 37, p. 2495-2500, 1988.

MORO, M. A. et al. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 1480-1485, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MÜNDEL, T. et al. Role of superoxide dismutase "in vivo" and "in vitro" nitrate tolerance. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 1224-1230, 1999.

MÜNDEL, T. et al. Dissociation of coronary vascular tolerance and neurohormonal adjustments during long-term nitroglycerin therapy in patients with stable coronary artery disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 27, p. 297-303, 1996.

MURAD, F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: The NO- cyclic GMP signal transduction system. **Adv. Pharmacol.**, v. 26, p. 19-33, 1994.

NG, E. S. et al. Nitrosothiol stores in vascular tissue: modulation by ultraviolet light, acetylcholine and ionomycin. **Eur J Pharmacol.**, v. 560, p. 183-192, 2007.

NOVOSELOVA, E. G. et al. Effects of low power laser radiation on mice immunity. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 22, p. 33-38, 2006.

OISHI, J. C. et al. In vitro Treatment with cis-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] Improves the Endothelial Function in Aortic Rings with Endothelial Dysfunction. **J Pharm Pharm Sci**, v. 18, p. 696-704, 2015.

OISHI, J.C. et al. Hypotensive acute effect of photobiomodulation therapy on hypertensive rats. **Life Sci.**, v. 178, p. 56-60, 2017.

ORON, U. et al. Low energy laser irradiation reduces formation of scar tissue following myocardial infarction in dogs. **Circulation**, v. 103, p. 296-301, 2001.

PENG Q. et al. Lasers in medicine. **Rep. Prog. Phys.**, v. 7, p. 01-28, 2008.

PIRES, D. et al. Low-level laser therapy (LLLT; 780 nm) acts differently on mRNA expression of anti- and pro-inflammatory mediators in an experimental model of collagenase-induced tendinitis in rat. **Lasers Med Sci**, v. 26, p. 85-94, 2011.

PLASS, C. A. et al. Light-induced vasodilation of coronary arteries and its possible clinical implication. **Ann Thorac Surg.**, v. 93, p. 1181-1186, 2012.

RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**, v. 306, p. 174-176, 1983.

RODRIGUES, G. J. et al. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 18, p. 176-183, 2008.

RODRIGUES, G. J. et al. Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. **European Journal of Pharmacology**, v. 627, p. 251-257, 2010.

SARTI, P. et al. Cytochrome c oxidase and nitric oxide in action: Molecular mechanisms and pathophysiological implications. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1817, p. 610-619, 2012.

SIDDIQUI, M.; DUDENBOSTEL, T.; CALHOUN, D. A. Resistant and Refractory Hypertension: Antihypertensive Treatment Resistance vs Treatment Failure. **Can J Cardiol.**, v. 32, p. 603-606, 2016.

SIDEBOTHAM, D.; MCKEE, A.; GILLHAM, M.; LEVY, J. **Cardiothoracic critical care**. 1th ed. Philadelphia (USA): Butterworth-Heinemann, 2007. 672p.

SIM, J. J. et al. Characteristics of resistant hypertension in a large, ethnically diverse hypertension population of an integrated health system. **Mayo Clin Proc.**, v. 88, p. 1099-1107, 2013.

SRIRAM, K. et al. Shear-Induced Nitric Oxide Production by Endothelial Cells. **Biophysical Journal**, v. 111, p. 208-221, 2016.

STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, v. 78, p. 931-936, 1994.

SUN, J. C. et al. Elevated resting heart rate is associated with dyslipidemia in middle-aged and elderly Chinese. **Biomed Environ Sci.**, v. 27, p. 601-605, 2014.

- THOMAS, D. D. et al. The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, p. 355-360, 2001.
- TOMASONI, L. et al. Effects of treatment strategy on endothelial function. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, p. 840-844, 2010.
- TOMIMURA, S. et al. Hemodynamic effect of laser therapy in spontaneously hypertensive rats. **Arq Bras Cardiol.**, v. 103, p. 161-164, 2014.
- TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of Genetic (Spontaneous) Hypertension. **Circ Res.**, v. 48, p. 309-319, 1981.
- TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON U. Low-Level Laser Irradiation (LLLI) Promotes Proliferation of Mesenchymal and Cardiac Stem Cells in Culture. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, p. 373-378, 2007.
- TUTEJA, N. et al. Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 4, p. 227-237, 2004.
- VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiol**, v. 196, p.193-222, 2009.
- VANHOUTTE, P. M. et al. Thirty Years of Saying NO Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. **Circ Res.**, v. 119, p. 375-396, 2016.
- VINCK, E. M. et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers Med Sci.**, v. 18, p. 95-99, 2003.
- VLADIMIROV, Y. A; OSIPOV, A. N; KLEBANOV. G. I. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. **Biochemistry** (Moscow), v. 69, p. 81-90, 2004.
- WHELAN, H. T., et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 19, p. 305-314, 2001.
- WHELTON, P. K. et al. ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/P CNA 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**, v. 71, p.13-115, 2018.
- WINK, D. A. et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 711-721, 1998.

YAKAZU, Y. et al. Hemodynamic and sympathetic effects of feoldopam and sodium nitroprusside. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 45, p. 1176-1180, 2001.

YAMAURA, M. et al. Low Level Light Effects on Inflammatory Cytokine Production by Rheumatoid Arthritis Synoviocytes. **Lasers Surg Med.**, v. 41, p. 282-90, 2009.

YUSUF, S. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **Lancet.**, v. 364, p. 937-952, 2004.

ZHANG, C. et al. S-Nitrosothiols: chemistry and reactions. **Chem. Commun.**, v. 53, p. 11266-11277, 2017.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular Nitric Oxide: Beyond eNOS. **J Pharmacol Sci.**, v. 129, p. 83-94, 2015.

ZHOU, B. et al. NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. **Lancet**, v. 389, p. 37-55, 2017.