

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

NAYARA FORMENTON DA SILVA

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE *Panax ginseng* (GINSENG VERMELHO) E
Angelica keskei (ASHIBATA) E DA FOTOBIMODULAÇÃO NOS
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES ENCONTRADOS EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS

São Carlos - SP

2024

NAYARA FORMENTON DA SILVA

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE *Panax ginseng* (GINSENG VERMELHO) E
Angelica keskei (ASHIBATA) E DA FOTOBIMODULAÇÃO NOS
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES ENCONTRADOS EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

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 – SP

2024



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 Nayara Formenton da Silva, realizada em 10/01/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues (UFSCar)

Prof. Dr. Gilberto Eiji Shigemoto (UFSCar)

Prof. Dr. Victor Fabricio (UNOESTE)

Profa. Dra. Cynthia Aparecida de Castro (UFSCar)

Profa. Dra. Ketvlin Fernanda Migliato (UNICEP)

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 Adriana e Paulo e à minha irmã Nathália, sem eles a realização deste não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meu pais, Adriana e Paulo, meus exemplos de vida e que sempre fizeram de tudo para que eu estudasse e concluísse mais esta etapa. Foi indispensável toda a ajuda e apoio para que eu chegasse até aqui. À minha irmã Nathália, que é minha confidente e meu principal suporte na vida acadêmica. A minha gratidão será eterna. Amo vocês.

Ao professor Gerson Jhonatan Rodrigues, pela paciência e toda compreensão no decorrer destes anos e por ser uma constante fonte de motivação e incentivo durante o doutorado. Obrigada pela sua dedicação e por não me deixar desistir.

Ao Prof. Dr. Victor Fabrício, Prof. Dr. Gilberto Eiji Shiguemoto, à Profa. Dra. Cynthia Aparecida de Castro e Profa. Dra. Ketylin Fernanda Migliato, pela disponibilidade para participar desta banca examinadora e pelas contribuições para este trabalho.

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

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Camila Marques, Jean, Rita, Vanessa, Barbara e em especial ao Luís e Camila Sabadini, que estiveram presentes durante todo o estudo e que me ajudaram na realização das coletas e experimentos e também pela amizade e por tornarem meus dias mais leves e felizes. Sou eternamente grata por ter vocês em minha vida. Amo vocês.

Aos meus amigos mais próximos que aguentaram todo meu estresse e ansiedade diários, principalmente nesta fase final: Daiene, Kíssila e Angélica. E a todos aqueles que fazem parte do meu dia a dia e que os tornam mais leves.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF – UFSCar) e aos docentes que contribuíram para a minha formação.

À Profa. Dra. Patricia Correa Dias, por toda a ajuda com os fitoterápicos. À Florian, que forneceu o fitoterápico para a realização dos experimentos.

Ao CNPq pelo suporte financeiro durante todo o projeto.

RESUMO

Introdução: A menopausa é um processo fisiológico natural, relacionado à idade e que resulta na diminuição da produção de hormônios esteróides, principalmente estrogênio, que pode afetar sistemas e órgãos e levar à hipertensão. Estratégias terapêuticas complementares vêm ganhando destaque como opção para o manejo seguro de mulheres na menopausa, como fitoterápicos e fotobiomodulação. A combinação de *Panax ginseng* (ginseng vermelho) + *Angelica keiskei* (ashitaba) (Pg +Ak) é uma formulação que pode melhorar a função vascular e a fotobiomodulação (FBM) consiste na utilização de luz, na faixa de comprimento de onda entre 400 e 1300nm, em tecidos corporais. **Objetivos:** O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos *in vivo* de fitoterápicos e da fotobiomodulação sobre parâmetros cardiovasculares na menopausa induzida por ovariectomia em ratas. **Métodos:** Cinquenta e duas ratas Wistar, com 70 dias de idade, foram distribuídas aleatoriamente em seis grupos experimentais, sham (SH), ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas com *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* (OVX+Pg+Ak) e ovariectomizadas tratadas com fotobiomodulação (OVX+FBM). Todos os animais dos grupos OVX tiveram seus ovários removidos na 12^a semana de vida. Os animais do grupo tratado com fitoterápicos receberam 100 mg/kg/dia por duas semanas por via intraperitoneal. Os animais do grupo tratado com fotobiomodulação receberam a energia 5,6 Joules por ponto, em 6 pontos de aplicação na região abdominal, com potência de 100mW, duas vezes por semana, durante duas semanas, em 660nm. Os parâmetros de pressão arterial e função endotelial foram avaliados em todos os animais por pletismografia de cauda e reatividade vascular, respectivamente. **Resultados:** Ao final dos tratamentos, a pressão arterial média nos grupos tratados diminuiu em relação ao não tratado. A função do endotélio foi prejudicada em anéis aórticos de ratos OVX em comparação ao Sham. O tratamento com Pg+Ak e com FBM melhorou a vasodilatação dependente do endotélio em anéis aórticos dos animais, assim como a concentração de NO. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que a combinação de *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* foi capaz de reduzir os níveis pressóricos e reverter a disfunção endotelial em ratas ovariectomizadas, assim como o tratamento com fotobiomodulação.

Palavras-chave: Ovariectomia. Fotobiomodulação. Fitoterápicos. Hipertensão arterial. Óxido nítrico.

ABSTRACT

Introduction: Menopause is a natural, age-related physiological process that results in a decrease in the production of steroid hormones, mainly estrogen, which can affect systems and organs and lead to hypertension. Complementary therapeutic strategies have been gaining prominence as an option for the safe management of menopausal women, such as herbal medicines and photobiomodulation. The combination of *Panax ginseng* (red ginseng) + *Angelica keiskei* (ashitaba) (Pg +Ak) is a formulation that can improve vascular function and photobiomodulation (PBM) consists of the use of light, in the wavelength range between 400 and 1300nm, in body tissues. **Objectives:** The objective of this work was to evaluate the *in vivo* effects of herbal medicines and photobiomodulation on cardiovascular parameters in menopause induced by ovariectomy in rats. **Methods:** Fifty-two Wistar rats, 70 days old, were randomly distributed into six experimental groups, sham (SH), ovariectomized (OVX), ovariectomized treated with *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* (OVX+Pg+Ak) and ovariectomized treated with photobiomodulation (OVX+PBM). All animals in the OVX groups had their ovaries removed in the 12th week of life. The animals in the group treated with herbal medicines received 100 mg/kg/day for two weeks intraperitoneally. The animals in the group treated with photobiomodulation received energy 5.6 Joules per point, at 6 application points in the abdominal region, with a power of 100mW, twice a week, for two weeks, at 660nm. Blood pressure and endothelial function parameters were evaluated in all animals by tail plethysmography and vascular reactivity, respectively. **Results:** At the end of treatments, mean arterial pressure in the treated groups decreased compared to the untreated group. Endothelial function was impaired in aortic rings from OVX rats compared to Sham. Treatment with Pg+Ak and PBM improved endothelium-dependent vasodilation in the animals' aortic rings, as well as NO concentration. **Conclusion:** Our results suggest that the combination of *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* was able to reduce blood pressure levels and reverse endothelial dysfunction in ovariectomized rats, as well as treatment with photobiomodulation.

Key-words: Ovariectomy. Photobiomodulation. Herbal medicines. Hypertension. Nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem representativa do procedimento de retirada dos ovários dos animais do grupo OVX	16
Figura 2: Linha do tempo representando os três grupos experimentais, com os principais resultados.	17
Figura 3A: Útero de rata ovariectomizada e 3B – Útero de rata não ovariectomizada..	19
Figura 4: Pressão arterial sistólica antes e após duas semanas de tratamento de ratos Sham, OVX e OVX + Pg+Ak	21
Figura 5: Estudo da função do endotélio em vasos isolados de anéis aórticos de ratos Sham, OVX e OVX + Pg+Ak	22
Figura 6: Quantificação da concentração de óxido nítrico (NO) entre os grupos Sham, OVX e OVX + Pg+Ak	24
Figura 7: Peso corporal dos animais ao longo das semanas, dos grupos Sham, OVX e OVX + Pg+Ak.....	25
Figura 8: Imagem representativa do procedimento de retirada dos ovários dos animais do grupo OVX	36
Figura 9: Linha do tempo representando os três grupos experimentais, com os principais resultados.	37
Figura 10A: Útero de rata ovariectomizada e 10B – Útero de rata não ovariectomizada	40
Figura 11: Pressão arterial sistólica antes e após duas semanas de tratamento de ratos Sham, OVX e OVX + FBM	42
Figura 12: Estudo da função do endotélio em vasos isolados de anéis aórticos de ratos Sham, OVX e OVX + FBM	43
Figura 13: Quantificação da concentração de óxido nítrico (NO) entre os grupos Sham, OVX e OVX + FBM	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros da fotobiomodulação <i>In vivo</i>	40
--	-----------

LISTA DE SIGLAS

2K-1C - 2 rins – 1 clipe

4-HD – 4-hidroxicloridrina

Ach - Acetilcolina

AMPK - Proteína quinase ativada por AMP

ATP – Adenosina trifosfato

CA²⁺ - Cálcio

EC₅₀ – Concentração do fármaco que induz 50% do efeito

ECA – Enzima conversora de angiotensina

EDRF - Fator de relaxamento dependente do endotélio

E_{max} – Efeito máximo

eNOS - NO sintase endotelial

EPM – Erro padrão médio

ER- β – Receptor de estrogênio beta

EROs – Espécie reativa de oxigênio

FBM – Fotobiomodulação

J - Joules

K⁺ - Potássio

LLLT – do inglês, *Low level Laser Therapy* - Terapia a laser de baixa intensidade

mmHg – Milímetros de mercúrio

mW - miliwatt

nm - Nanômetro

NO – Óxido nítrico

NO₂⁻ - Nitrito

NO₃⁻ - Nitrato

OVX - Ovariectomizada

PG+AK – *Panax ginseng* + *Angelica keiskei*

SH - Sham

SHR - Rato Espontaneamente Hipertenso

SIRT1 – Sirtuína 1

SOD - Superóxido Dismutase

VDF – Vasodilatação dependente do endotélio

XAG - Xantoangelol

SUMÁRIO

Capítulo 1: Apresentação.....	12
Capítulo 2: Tratamento crônico com <i>Panax ginseng</i> e <i>Angelica keiskei</i> diminui a pressão arterial e melhora a função endotelial em ratas ovariectomizadas.....	13
2.1 Introdução	13
2.2 Materiais e Métodos	15
2.2.1 Animais e desenho experimental	16
2.2.2 Procedimento cirúrgico: indução da menopausa	16
2.2.3 Medida da pressão arterial	17
2.2.4 Administração do extrato padronizado do <i>Panax ginseng</i> + <i>Angelica keiskei</i> ...17	
2.2.5 Eutanásia e coleta de material biológico.....	19
2.2.6 Reatividade Vascular	20
2.2.7 Medida do óxido nítrico.....	20
2.2.8 Análises estatísticas	20
2.3 Resultados	21
2.4 Discussão	25
2.5 Conclusão.....	27
2.6 Referências.....	27
Capítulo 3: Tratamento crônico com fotobiomodulação diminui pressão arterial e melhora função endotelial em ratas ovariectomizadas	32
3.1 Introdução	32
3.2 Materiais e Métodos	34
3.2.1 Animais e desenho experimental	34
3.2.2 Procedimento cirúrgico: indução da menopausa	35
3.2.3 Medida da pressão arterial	36
3.2.4 Tratamento com fotobiomodulação	37
3.2.5 Eutanásia e coleta de material biológico.....	39
3.2.6 Reatividade Vascular	40
3.2.7 Medida do óxido nítrico.....	41
3.2.8 Análises estatísticas	41
3.3 Resultados	41
3.4 Discussão	45
3.5 Conclusão.....	47
3.6 Referências.....	47

Capítulo 1: Apresentação

Esta tese divide-se em 3 capítulos. O capítulo de apresentação tem como objetivo introduzir o tema da menopausa e uso de tratamentos complementares para suas complicações.

A menopausa é um processo fisiológico natural, relacionado à idade e que resulta na diminuição da produção de hormônios esteroides, principalmente estrogênio, que pode afetar sistemas e órgãos e levar à hipertensão. Estratégias terapêuticas complementares vêm ganhando destaque como opção para o manejo seguro da mulher na menopausa, como os fitoterápicos. A combinação de *Panax ginseng* (ginseng vermelho) + *Angelica keiskei* (ashitaba) é uma formulação que pode melhorar a função vascular.

Além do uso dos fitoterápicos, alguns estudos investigaram o efeito da terapia com fotobiomodulação (FBM), que consiste na utilização de luz, na faixa de comprimento de onda entre 400 e 1300nm, em tecidos corporais.

Diversos estudos evidenciaram o uso de estratégias complementares para o manejo seguro das complicações da menopausa. No entanto, nenhum estudo utilizou um extrato padronizado da associação do *Panax ginseng* (ginseng vermelho) + *Angelica keiskei* (ashitaba) em modelo animal de menopausa, assim como nenhum estudo investigou os efeitos da FBM neste modelo. Dessa forma, o objetivo do capítulo 2 foi apresentar um estudo que investigou os efeitos dos extratos padronizados de *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* em parâmetros cardiovasculares no modelo de menopausa e o objetivo do capítulo 3 foi apresentar um estudo que investigou os efeitos da FBM nos parâmetros cardiovasculares no modelo de menopausa. Assim, os capítulos 2 e 3 correspondem a um conjunto de resultados que foram organizados em dois artigos científicos, os quais estão prontos para submissão aos periódicos da área.

Capítulo 2: Tratamento crônico com *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* diminui a pressão arterial e melhora a função endotelial em ratas ovariectomizadas

2.1 Introdução

A menopausa é um processo fisiológico natural, que consiste na cessação permanente da menstruação durante 12 meses e está relacionado com a idade, resultando em deficiência de estrogênio e não está associada a patologias. A idade média da menopausa é 51 anos. A maioria das mulheres apresenta sintomas vasomotores, mas a menopausa afeta muitas outras áreas do corpo, como os sistemas urogenital, psicogênico e cardiovascular (VALDES e BAJAJ, 2023; SOARES, 2019; NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY, 2016; VISHWAKARMA et al., 2019). O declínio nos níveis de estrogênio causa uma interrupção no eixo hipotálamo-hipófise-ovariano e, como resultado, ocorre uma falha no desenvolvimento do endométrio, causando ciclos menstruais irregulares até que parem completamente (PEACOCK, KETVERTIS, 2022).

O estrogênio é crucial para manter a função endotelial normal, pois aumenta a síntese de óxido nítrico (NO) pelo endotélio vascular, que então se difunde nas células musculares lisas vasculares, causando seu relaxamento. Este processo é denominado vasodilatação dependente do endotélio (VDF). O estrogênio preserva a função endotelial através da diminuição da síntese de endotelina-1 (um potente vasoconstritor) pelas células endoteliais. Durante a menopausa, há diminuição do VDF e aumento da síntese de endotelina 1, ambos promovendo vasoconstrição (NAIR et al., 2021).

Além disso, essa deficiência de estrogênio pode afetar sistemas e órgãos como o sistema cardiovascular, que compreende doenças e complicações como a hipertensão. De acordo com os dados da Carga Global de Doenças, a hipertensão é o fator de risco mortal número um em mulheres no mundo todo (GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY, 2019). A incidência de doenças cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa foi 2 a 6 vezes maior em comparação com mulheres na pré-menopausa da mesma idade (EL KHOUDARY et al., 2020). Desta forma, além dos tratamentos convencionais de reposição hormonal, existem terapias complementares, como o uso de compostos fitoterápicos para alívio dos sintomas da menopausa. Dessa forma, indica-se

que a terapia de reposição hormonal pode minimizar a deficiência de estrogênio, o que pode melhorar a qualidade de vida em diversos aspectos da vida, como físico, emocional e sexual (STEELS et al., 2017). No entanto, devido aos seus efeitos colaterais conhecidos e, por vezes, às contra-indicações, o uso de terapias complementares pode ser benéfico neste grupo de mulheres (JOHNSON et al., 2019).

O *Panax ginseng* é uma espécie de ginseng cultivado na China e na Coreia do Sul, sendo responsável pela maior proporção da produção global de ginseng (PARK et al., 2022). Os principais componentes ativos do *Panax ginseng* são os ginsenosídeos, que são saponinas triterpênicas. A maioria das pesquisas sobre as funções farmacológicas e medicinais do *Panax ginseng* concentrou-se nos ginsenosídeos, incluindo Rb1, Rg1, Rg3, Re e Rd (KIM et al., 2017).

O *ginseng* tem diversas atividades descritas, como anticâncer (LI et al., 2020; GUO et al., 2019), controle glicêmico (ZHOU et al., 2019; BAI et al., 2018) e amplamente utilizado para tratar fatores de risco cardiovasculares, como hipertensão (IRFAN et al., 2020; LUO et al., 2020; KIM, 2018). Os ginsenosídeos Rb1 e Rg1 exibem efeito anti-inflamatório, têm função antioxidante prevenindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e estimula a síntese do NO (SOHN et al., 2013; ZHOU et al., 2017; KIM et al., 2018). Ginsenosídeo-Rb1 e outros ginsenosídeos bloquearam a disfunção endotelial através da via de sinalização SIRT1/AMPK e inibiram a produção de ERO pela ativação do receptor de estrogênio beta (ER- β) e induzindo a regulação positiva de SOD (ZHENG et al., 2020; LÜ et al., 2019).

Angelica keiskei é uma planta perene resistente, nativa da costa do Pacífico do Japão, comumente conhecida como ashitaba ou “folha de amanhã” (AMALIA et al., 2021). *Angelica keiskei* ganhou notoriedade como planta medicinal por suas diversas propriedades para a saúde, como potenciais propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, hipoglicêmicas, antimicrobianas, antitumorais, hipotensoras, antifibróticas, laxantes, estimulantes e galactogogas (AMALIA et al., 2021; BAE et al., 2022; NOH et al., 2020; YOSHIOKA et al., 2020; KIL et al., 2017). Os componentes ativos da *Angelica keiskei* não são conhecidos com precisão, porém, análises fitoquímicas levaram à identificação de mais de 100 compostos, incluindo chalconas, cumarinas e flavononas (KIL et al., 2017).

Existe um produto registrado com o nome Mitocondrin®, que é formado pela associação de *Panax ginseng* e *Angelica keiskei*, na proporção de 1:1. Este produto

possui tripla padronização de 8% de chalconas, 10% de flavanonas e 0,9% de ginsenosídeos Rb1, Rg1, Rg3. Esses ativos atuam em conjunto e são responsáveis por diferentes ações multialvo em diversos mecanismos, como o aumento da biogênese mitocondrial, que é importante para a produção de energia e promoção da longevidade e do envelhecimento saudável, também facilita o gasto calórico e diminui o armazenamento de gordura, o que pode minimizar o processo inflamatório através de sua ação antioxidante (KIM et al., 2017).

Estas plantas são amplamente utilizadas na medicina tradicional chinesa devido a diversas atividades fisiológicas que podem contribuir para diminuir os radicais livres (QIN et al., 2014; GUO et al., 2013), controlar a resposta inflamatória (CHANG et al., 2014; FAN et al., 2016), controlar a cascata de coagulação (OHKURA et al., 2018), produção de NO (TOUSOULIS, KAMPOLI, 2012), aumentar o metabolismo da glicose (ZHANG et al., 2018) e diminuir a disfunção mitocondrial (KIM et al., 2017; KALU, 1991). Estratégias terapêuticas complementares vêm ganhando destaque como opção segura de manejo para mulheres na menopausa, como neste trabalho, no qual investigamos se o produto que contém a associação de *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* pode melhorar parâmetros vasculares em ratas ovariectomizadas.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Animais e desenho experimental

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos, sob número de registro: 6449201120. Vinte e quatro ratas Wistar fêmeas com 200 g a 250 g e com 90 dias de idade foram divididas aleatoriamente em três grupos: ovariectomizadas (OVX) (n = 8), ovariectomizadas tratadas com extrato padronizado de *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* (OVX+Pg+Ak) (n = 8) e sham (Sham) (n = 8). Todos os procedimentos com animais que serão descritos neste trabalho foram realizados após uma semana de aclimação. Os animais foram mantidos no ciclo claro-escuro com comida e água *ad libitum* até o dia do experimento. Todos os animais foram pesados a cada duas semanas.

2.2.2 Procedimento cirúrgico: indução da menopausa

Todos os animais dos grupos OVX foram submetidos à ovariectomia, ou seja, à retirada dos ovários na 12^a semana de vida, devido à boa resposta à cirurgia evidenciada na literatura (KALU, 1991). A técnica utilizada seguiu o protocolo Zarrow (1964) e a anestesia foi com associação de 13mg/Kg de xilazina e 33mg/Kg de cetamina base por via intraperitoneal. Primeiramente foi feita uma pequena incisão bilateral (1,0-1,5 cm) na pele e na camada muscular com auxílio de tesoura e pinça, aproximadamente 1 cm abaixo da última costela, perpendicular ao corpo do animal, como mostra a Figura 1.

Para o procedimento, foi realizada uma incisão bilateral no abdômen da rata, os ovários expostos e removidos e uma sutura de náilon ligada logo abaixo da fímbria. Após a retirada dos ovários, foi feita incisão na musculatura e na pele com fio de náilon. Os animais do grupo SH foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, tiveram os ovários exteriorizados para a cavidade abdominal e devolvidos, sem retirá-los.

Após a cirurgia, foi respeitado um período de 2 semanas de recuperação para início dos procedimentos com protocolo padronizado de administração do extrato.

Figura 1 – Imagem representativa do procedimento de retirada dos ovários dos animais do grupo OVX.



Fonte: próprio autor.

2.2.3 Medida da pressão arterial

Ao longo do tratamento, a pressão arterial sistólica dos animais foi medida por pletismografia de cauda após seis semanas da indução da menopausa e após o tratamento. As ratas foram introduzidas em um aparelho de contenção em ambiente calmo e tranquilo por 1 hora. Esse procedimento foi repetido algumas vezes antes da análise, com a finalidade de familiarizá-las com o teste.

O pletismógrafo possui manguito emborrachado e sensor fotoelétrico de pulso que foi colocado ao redor da cauda do animal. O sensor é conectado a um amplificador (NIPREM 645, Cibertec, Madrid, Espanha), e as pulsações registradas no PowerLab (AD Instruments, Castle Hill, NSW, Austrália). Foram realizadas 3 medidas consecutivas, considerando a média aritmética desses resultados como valor da pressão.

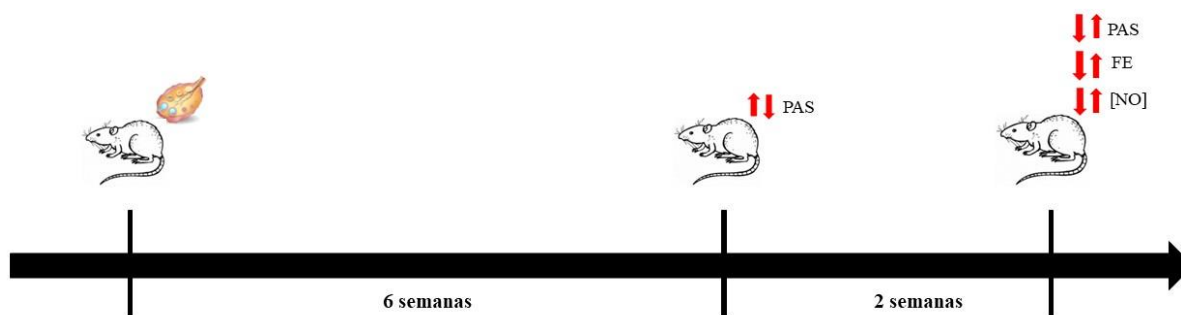
2.2.4 Administração do extrato padronizado de *Panax ginseng* + *Angelica keiskei*

O tratamento se iniciou após seis semanas da cirurgia de indução da menopausa, como mostra a Figura 2. Os animais dos grupos que receberam o tratamento com extrato padronizado foram tratados com 100 mg/kg/dia por duas semanas e o extrato padronizado foi administrado por via intraperitoneal (KIM et al, 2017). O extrato foi solubilizado em solução salina a 0,9%. Todos os animais foram pesados para que a dose do extrato padronizado fosse adequada. Os animais dos grupos que não receberam tratamento com o extrato padronizado foram manuseados com a mesma frequência dos tratados.

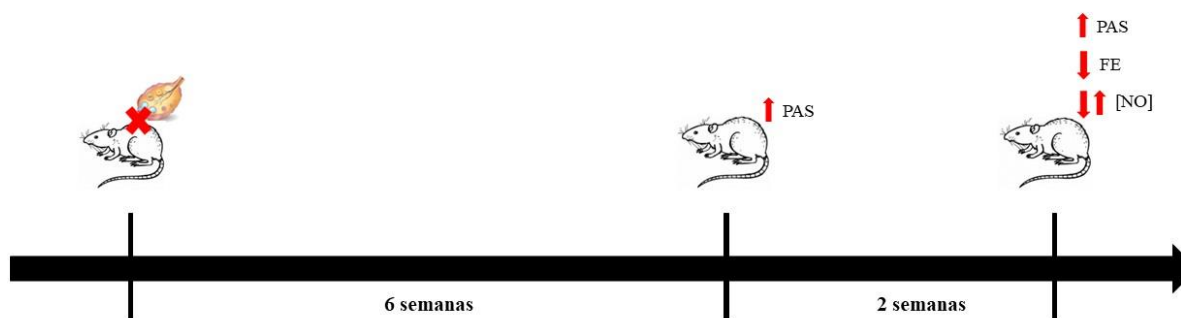
Os extratos padronizados da associação *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* (1:1) foram gentilmente cedidos pela Florien fitoativos LTDA (Sm Empreendimentos Farmacêuticos Ltda). Esses extratos padronizados compõem a formulação de um produto registrado com o nome Mitochondrin®. Este produto possui padronização tripla de 8% de chalconas, 10% de flavanonas e 0,9% de ginsenosídeos Rb1, Rg1, Rg3. Os extratos foram solubilizados em soro fisiológico (Cloreto de Sódio 0,9%), imediatamente antes do tratamento.

Figura 2 – Linha do tempo representando os três grupos experimentais, com os principais resultados. A: sham (SH), B: ovariectomizadas (OVX) e C: ovariectomizadas tratadas com *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* (OVX+Pg+Ak). PAS: pressão arterial sistólica; FE: função endotelial, [NO]: concentração sérica de óxido nítrico.

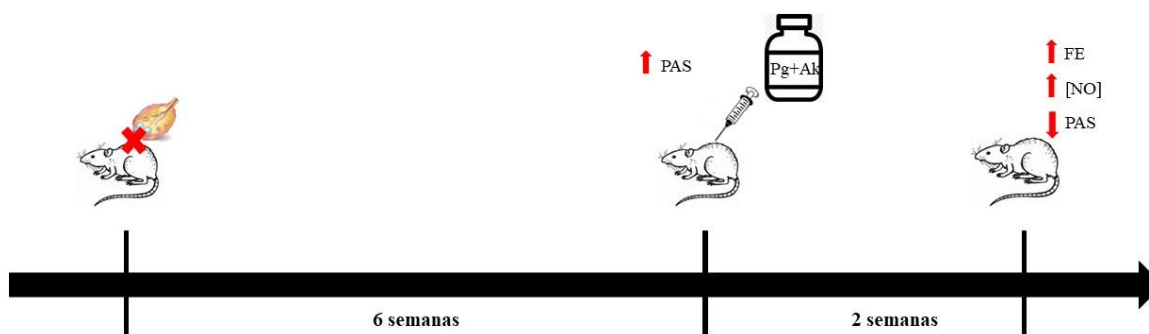
SHAM



OVX



OVX+Pg+Ak

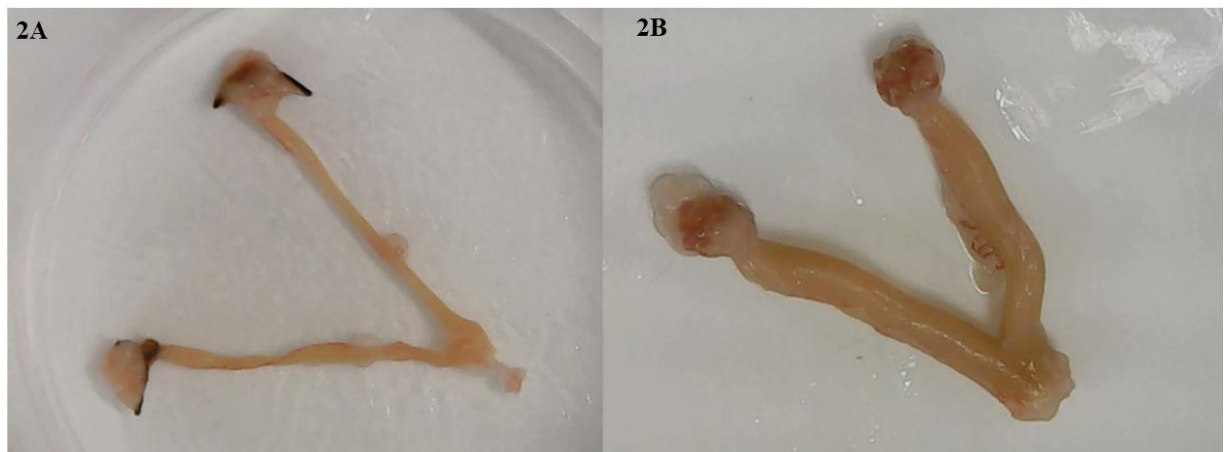


Legenda: ↑ - Aumentou; ↓ - Diminuiu; ⇄ - Não houve diferença

2.2.5 Eutanásia e coleta de material biológico

Os animais foram eutanasiados por decapitação e alguns tecidos foram coletados para posterior análise. A aorta torácica foi removida, isolada e cortada em anéis de aproximadamente 4 mm de comprimento e mantida em solução de Krebs para experimento de reatividade vascular. O útero foi coletado e fotografado para posterior análise. O sucesso da cirurgia foi verificado pela atrofia uterina observada nos grupos ovariectomizados quando comparados ao grupo sham, como pode ser verificado nas Figuras 3A e 3B. O sangue foi coletado em tubos falcon logo após a eutanásia para posterior alíquota de soro para exames bioquímicos.

Figura 3A - Útero de rata ovariectomizada e **3B** – Útero de rata não ovariectomizada.



Fonte: próprio autor.

2.2.6 Reatividade vascular

Os anéis aórticos dissecados após a eutanásia foram colocados em banho de órgãos isolado contendo 5 mL de solução de Krebs a 37°C, pH 7,4, borbulhando continuamente com 95% O₂ e 5% CO₂ em tensão isométrica (Mulvany-Halpern-modelo 610 DMT- EUA, Marietta, GA) e registrados por um sistema de aquisição de dados PowerLab8/SP (ADInstruments Pty Ltd., Colorado Springs, CO).

Primeiramente, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de 1,5 g por sessenta minutos para permitir a estabilização. Em seguida, a integridade endotelial foi avaliada utilizando a EC₅₀ da fenilefrina (0,1 µmol/L) para contrair o vaso, seguida do relaxamento induzido por 1 µmol/L de acetilcolina. Os anéis foram descartados quando o relaxamento foi inferior a 60%, assumindo o que foi padronizado para ratos hipertensos com disfunção endotelial (RODRIGUES et al, 2010).

Os anéis aórticos intactos foram submetidos a uma segunda contração com fenilefrina 0,1 µmol/L e em seguida foram construídas curvas concentração-efeito para acetilcolina (0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L). Foram avaliadas a potência (pD₂) e o efeito relaxante máximo (E_{max}).

2.2.7 Medida do óxido nítrico

Para os níveis de medição de óxido nítrico (NO), foi medida a concentração sérica do produto estável de NO, nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), conhecido como NO_x, conforme descrito anteriormente (PEREIRA et al, 2014), usando o NO Analyzer 280i (Sievers, Boulder, CO, EUA).

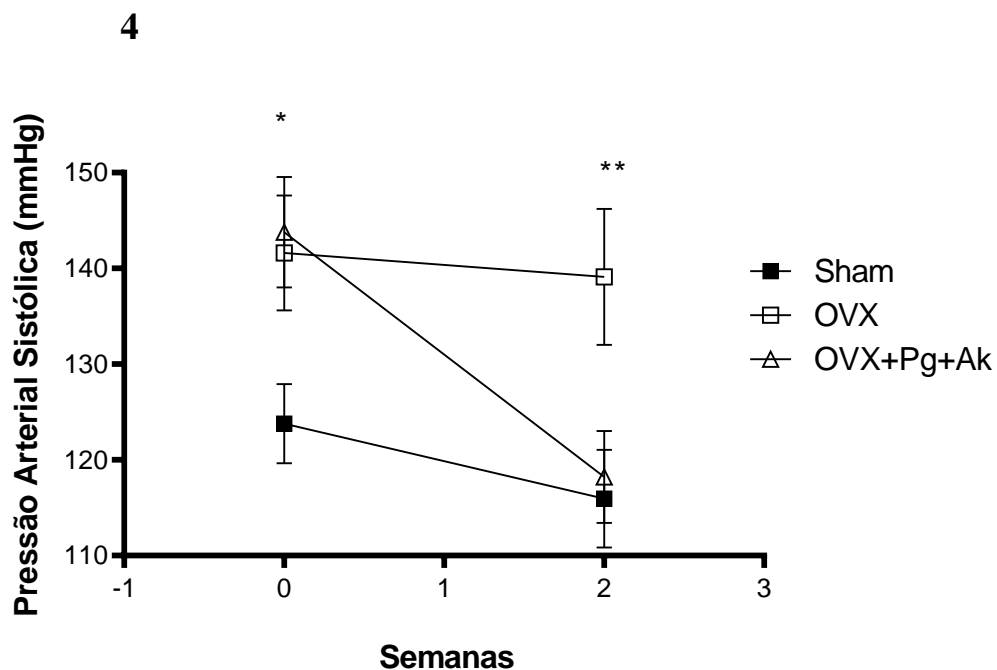
2.2.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 8.0.1). Os dados são apresentados como média ± erro padrão médio (EPM). As comparações entre todos os grupos foram feitas usando ANOVA unidirecional com pós-teste de Newman-Keuls. Foi adotado um nível de 5% para considerar as diferenças estatisticamente significativas.

2.3 Resultados

A ovariectomia induziu elevação da pressão arterial sistólica, como pode ser verificado no grupo OVX ($141,62 \pm 6,0$ mmHg, $n = 8$) e OVX+Pg+Ak antes do tratamento ($143,77 \pm 5,79$ mmHg, $n = 8$) em comparação ao Sham ($123,77 \pm 4,16$ mmHg, $n = 8$, $p < 0,05$). Duas semanas de tratamento com associação de *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* induziram diminuição da pressão arterial sistólica em ratas OVX (OVX+Pg+Ak: $118,22 \pm 4,8$ mmHg, $n = 8$), em comparação ao grupo OVX sem tratamento ($139,12 \pm 7,1$ mmHg, $n = 8$; $p < 0,05$), conforme pode ser verificado na Figura 3.

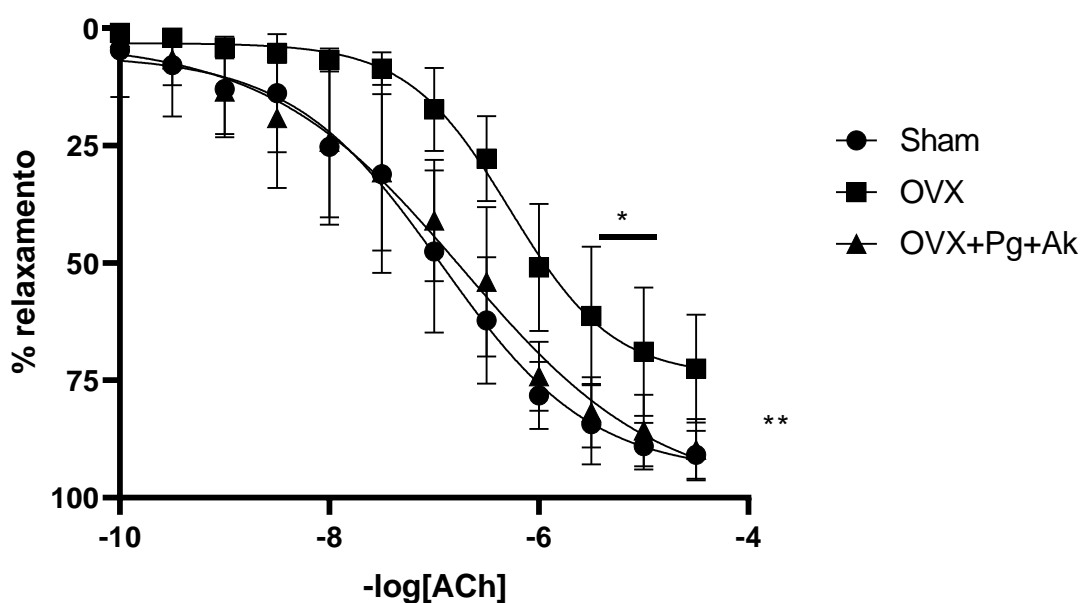
Figura 4 – Pressão arterial sistólica antes e após duas semanas de tratamento. Cada ponto representa a média e o erro padrão médio (EPM) dos dados obtidos a partir de determinações independentes. *Indica a diferença ($p < 0,05$) nos valores entre a pressão arterial sistólica de Sham vs OVX e Sham vs OVX+Pg+Ak antes do tratamento com Pg+Ak (tempo = 0). **Indica a diferença ($p < 0,05$) nos valores entre a pressão arterial sistólica de OVX vs OVX+ Pg+Ak após duas semanas de tratamento Pg+Ak (tempo = 2).

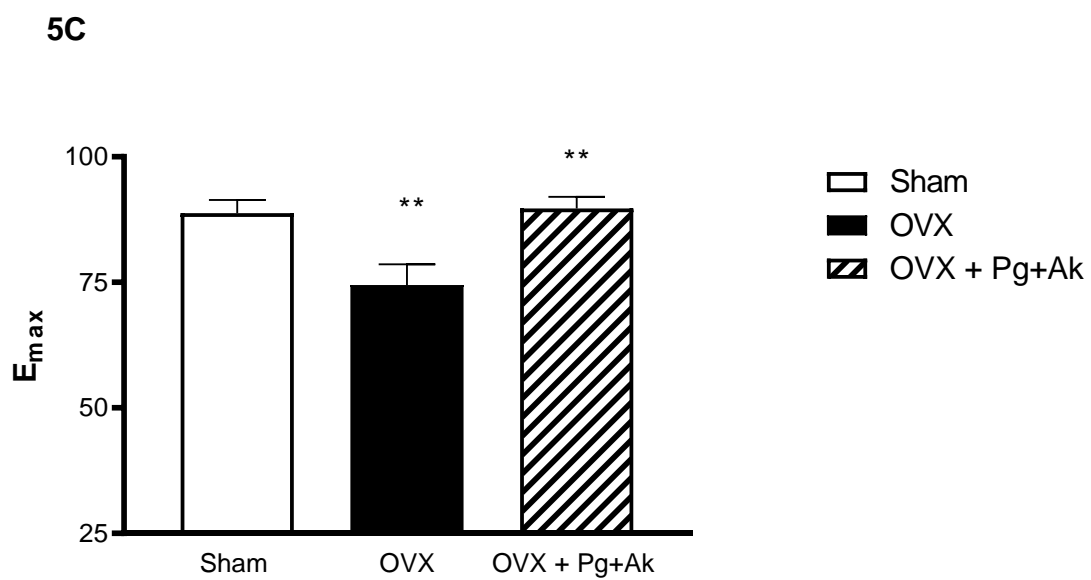
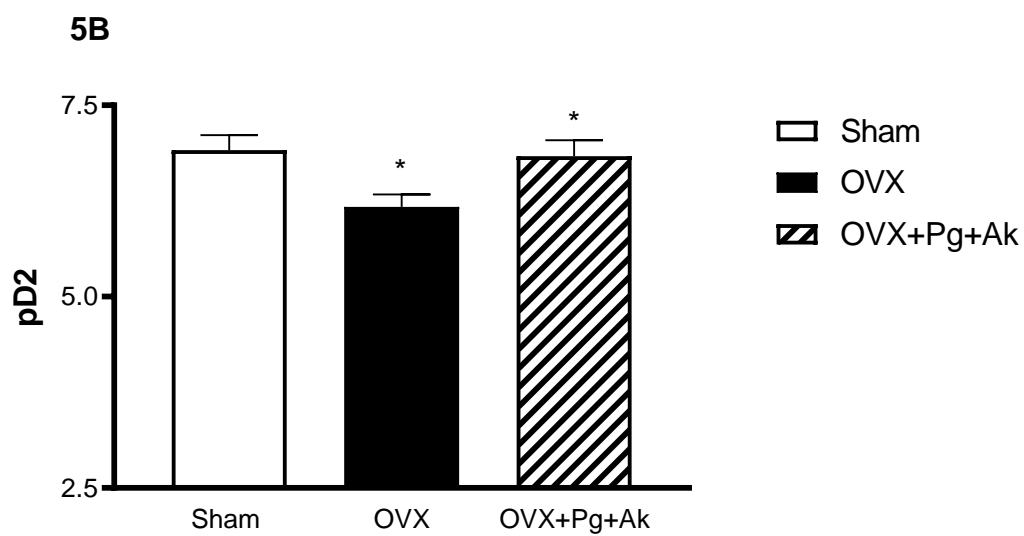


O relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina está prejudicado em anéis aórticos de ratos OVX (pD2: $6,17 \pm 0,16$, n = 8; E_{max}: $72,46 \pm 4,03\%$, n = 8), comparado ao controle Sham (pD2: $6,91 \pm 0,19$, n = 8, p < 0,05; E_{max}: $90,84 \pm 1,78\%$, n = 8, p < 0,01). O tratamento crônico com *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* (Pg+Ak) melhorou a vasodilatação dependente do endotélio em anéis aórticos de ratos OVX (pD2: $6,83 \pm 0,20$, n = 8; E_{max}: $89,75 \pm 2,29\%$, n = 8) comparado ao OVX (pD2: $6,17 \pm 0,16$, n = 8, p < 0,05; E_{max}: $72,46 \pm 4,03\%$, n = 8, p < 0,01), sem diferença entre OVX+Pg+Ak e Sham (Figuras 4A, 4B e 4C).

Figura 5 – Estudo da função do endotélio em vasos isolados de anéis aórticos de ratos Sham, OVX e OVX + Pg+Ak. Curvas cumulativas de concentração-efeito realizadas para acetilcolina em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa a média e o erro padrão médio (EPM) dos dados obtidos a partir de determinações independentes. 5A e 5B * Indica a diferença (p < 0,05) nos valores de pD2 entre aortas de Sham vs OVX e OVX vs OVX + Pg+Ak. 5A e 5C ** Indica a diferença (p < 0,01) nos valores de E_{max} entre Sham vs OVX e OVX vs OVX + Pg+Ak.

5A

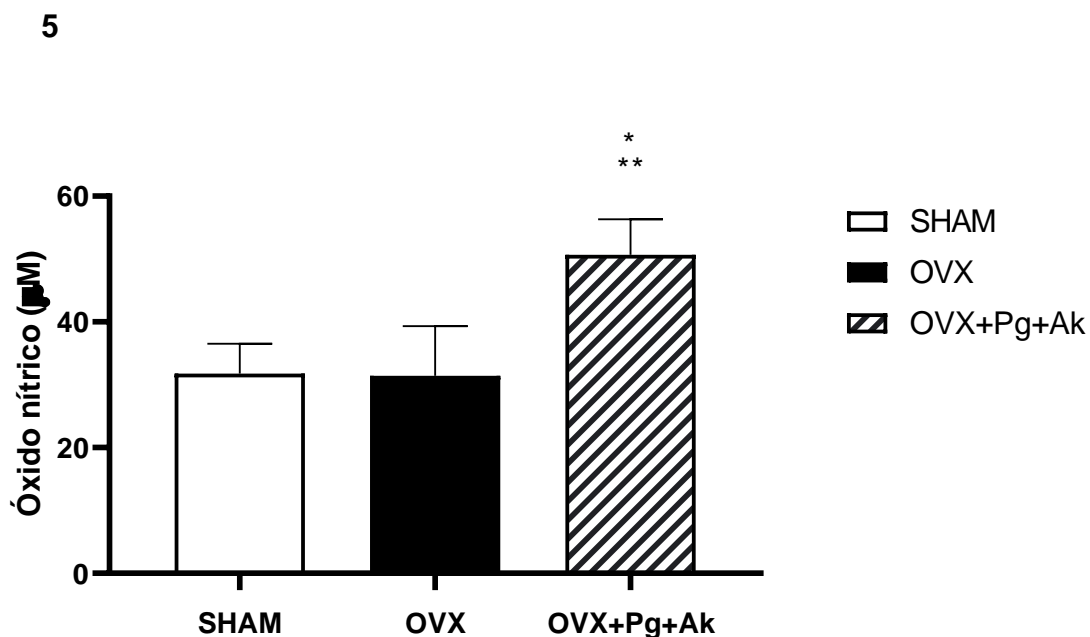




Além disso, o tratamento crônico com *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* (Pg+Ak) induziu um aumento nos níveis sanguíneos de NO em ratos OVX

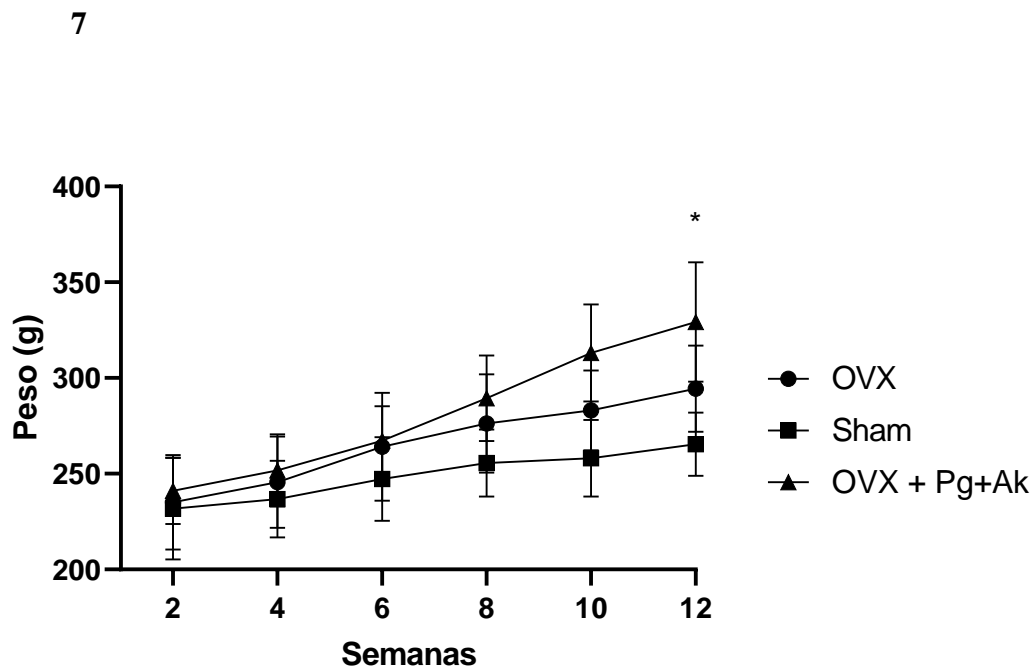
(OVX+Pg+Ak: $50,69 \pm 2,82 \mu\text{M}$, $n = 5$) em comparação com OVX ($31,45 \pm 2,98 \mu\text{M}$, $n = 5$, $p < 0,01$) e com Sham ($31,79 \pm 2,11 \mu\text{M}$, $n = 5$, $p < 0,001$) (Figura 5).

Figura 6 – Quantificação da concentração de óxido nítrico (NO) entre os grupos. *Indica a diferença ($p < 0,05$) nos valores entre a concentração de NO entre OVX+Pg+Ak vs OVX.



Nas ratas ovariectomizadas não houve aumento do peso corporal quando comparado ao grupo controle (Figura 7). O tratamento realizado com *Angelica keiskei* e *Panax ginseng* aumentou o ganho de peso nas ratas OVX na semana 12. (Sham: $269 \text{ g} \pm 23$, OVX: $265,4 \text{ g} \pm 16,4$, OVX + Pg+Ak: $294,3 \text{ g} \pm 22,5$; $p < 0,05$).

Figura 7: Avaliação do peso corporal ao longo das semanas. Cada ponto representa a média e o erro padrão médio (SEM) dos dados obtidos a partir de determinações independentes. *Indica a diferença ($p < 0,01$) nos valores médios entre o último valor do peso corporal de OVX vs OVX + Pg+Ak.



2.4 Discussão

Neste estudo verificamos que o tratamento com *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* durante duas semanas induziu diminuição da pressão arterial, melhorou a função endotelial e aumentou os níveis circulantes de óxido nítrico. A ovariectomia foi eficaz para induzir disfunção endotelial e elevação da pressão arterial.

Panax ginseng é uma planta milenar, cujas indicações são utilizadas desde a antiguidade na Medicina Tradicional Chinesa. Em relação ao sistema cardiovascular, parte do efeito anti-hipertensivo desta planta pode estar relacionado à elevação do óxido nítrico circulante derivado do endotélio, uma vez que esta planta promove a ativação da

enzima eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) que converte L-arginina em L- citrulina e NO, com o NO ativando a enzima guanilato ciclase solúvel no músculo liso, induzindo vasodilatação e conseqüente queda da pressão arterial (KIM, 2018; MOHANAN et al., 2018), como observado na pressão arterial de ratos OVX, em nosso estudo. Os agentes responsáveis por esse mecanismo são os ginsenosídeos Rb1, Rg1 e Rg3, que ativam e estimulam a produção de NO endotelial (TOUSOULIS, KAMPOLI, 2012; HIEN et al., 2010).

Além disso, o Rg3 é o vasodilatador mais potente dos ginsenosídeos, tendo sua ação inibindo o tônus da musculatura lisa vascular, prevenindo o influxo de Ca^{2+} e estimulando o efluxo de K^{+} (NAGAR et al., 2016). Neste estudo, os autores descobriram que o *Panax ginseng* tem um efeito hipotensor em ratos (NAGAR et al., 2016). Este ginsenosídeo Rg3 pode induzir aumento na expressão de eNOS, o que leva a um aumento na produção de NO seguido de vasodilatação (VERMA et al., 2021).

Em relação às informações sobre os extratos de *Angelica keiskei*, a maioria dos artigos aponta seus efeitos vasculares na proteção contra a vasoconstrição induzida pela fenilefrina, por mecanismo dependente de NO e fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (MATSUURA et al., 2001). Outros descobriram que o xantoangelol (XAG) e a 4-hidroxicinnolona (4-HD) também afetam a função plaquetária e podem prevenir doenças trombóticas (OHKURA et al., 2016 SON et al., 2014). O fato de *Angelica keiskei* alterar a duração do sangramento da cauda em camundongos indica que esta planta afeta a agregação plaquetária *in vivo* (OHKURA et al., 2016).

Uma revisão concluiu que o XAG também pode inibir diretamente as funções do músculo liso, reduzindo $[Ca^{2+}]$ livre intracelular, além de a 4-HD suprimir a elevação de Ca^{2+} induzida pela fenilefrina (KIL et al., 2017). As flavononas, presentes em *Angelica keiskei*, possuem um composto químico complexo que inibe a Enzima Conversora de

Angiotensina (ECA), enzima essencial para manter os níveis de pressão arterial. Os compostos de flavonona podem ser usados como anti-hipertensivos, reduzem o estresse e inibem a atividade oxidativa da ECA (WIDIASARI, 2018).

Poucos artigos relatam os efeitos biológicos da associação de *Panax ginseng* e *Angelica keiskei*, nenhum deles fazendo uso das duas plantas para o tratamento de doenças cardiovasculares. É relevante que os componentes destas plantas – isoladamente – desempenhem um papel nas doenças cardiovasculares e sejam conhecidos. Portanto, a união dos dois extratos torna-se uma alternativa plausível como tratamento conjunto para doenças cardiometabólicas.

Diante disso, é viável que a associação das duas plantas possa estabelecer uma melhora na função vascular em longo prazo, conforme demonstrado no presente trabalho. De um lado temos o *Panax ginseng* com ginsenosídeos, ativando as principais vias na vasodilatação e manutenção da função endotelial, e de outro lado, *Angelica keiskei*, que atua em diversas fisiopatologias e distúrbios metabólicos associados com inflamação, sendo o xanthoangelois as principais moléculas para os efeitos benéficos desta planta.

Em nosso estudo, houve melhora no relaxamento dependente do endotélio nos anéis aórticos do grupo OVX+Pg+Ak, sugerindo que a disfunção endotelial ocorre devido à ovariectomia e que isso pode ser revertido através do tratamento com *Panax ginseng* e *Angelica keiskei*. Nossos resultados sugerem que o tratamento com *Panax ginseng* + *Angelica keiskei* é capaz de melhorar a função endotelial e elevar o NO circulante, o que deve estar relacionado à diminuição da pressão arterial em ratas OVX.

2.5 Conclusão

Em conjunto, nossos resultados mostraram que a ovariectomia induziu elevação da pressão arterial sistólica e da disfunção endotelial, as quais foram reduzidas com duas semanas de tratamento com *Panax ginseng* + *Angelica keiskei*. Estudos futuros são importantes para investigar como este extrato padronizado poderia ser utilizado para aliviar sintomas e complicações da menopausa em mulheres.

2.6 Referências

AMALIA R., et al. The Cytotoxicity and Nephroprotective Activity of the Ethanol Extracts of *Angelica keiskei* Koidzumi Stems and Leaves against the NAPQI-Induced Human Embryonic Kidney (HEK293) Cell Line. *Evid Based Complement Alternat Med.* v. 23, p. 1-6, 2021.

BAE U.-J. *Angelica keiskei* Root Extract Attenuates Bile Duct Ligation-Induced Liver Injury in Mice. *J. Med. Food*, v. 25, p. 435–442, 2022.

BAI L., et al. Therapeutic potential of ginsenosides as an adjuvant treatment for diabetes. *Front Pharmacol.* v. 9, 2018.

CHANG, H.R.; LEE, H.J.; RYU, J.H. Chalcones from *Angelica keiskei* attenuate the inflammatory responses by suppressing nuclear translocation of NF- κ B. *Journal of Medicinal Food* v. 17, p. 1306–1313, 2014.

EL KHOUDARY, et al. Menopause Transition and Cardiovascular Disease Risk: Implications for Timing of Early Prevention: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* v. 142, p. 506-532, 2020.

FAN, J. et al. Inhibiting adhesion events by *Panax notoginseng* saponins and Ginsenoside Rb1 protecting arteries via activation of Nrf2 and suppression of p38 – VCAM-1 signal pathway. *Journal of Ethnopharmacology* v. 192, p. 423–430, 2016.

GLOBAL BURDEN OF 87 RISK FACTORS IN 204 COUNTRIES AND TERRITORIES, 1990-2019: A SYSTEMATIC ANALYSIS FOR THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY 2019. v. 396, p. 1223-1249, 2020.

GUO, Y.H.; KURUGANTI, R.; GAO, Y. Recent advances in ginsenosides as potential therapeutics against breast cancer. *Curr Top Med Chem.* v. 19, p. 2334–2347, 2019.

GUO, X.Q., et al. Comparison of antioxidant content and oxidation resistance of stems and leaves from *Angelica keiskei* Koidzmi. *Shipin Yu Fajiao Gongye*. v. 39, p. 122–127, 2013.

HIEN T.T., et al. Ginsenoside Rg3 increases nitric oxide production via increases in phosphorylation and expression of endothelial nitric oxide synthase: essential roles of estrogen receptor-dependent PI3-kinase and AMP-activated protein kinase. *Toxicol Appl Pharmacol*. v. 246, p. 171–183, 2010.

IRFAN, M.; KIM, M.; RHEE, M.H. Anti-platelet role of Korean ginseng and ginsenosides in cardiovascular diseases. *J Ginseng Res*. v. 44, p. 24–32, 2020.

JOHNSON, A.; ROBERTS, L.; ELKINS, G. Complementary and alternative medicine for menopause. *J Evid Based Integr Med*. v. 24, 2019.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. v. 15, p. 175-191, 1991.

KIL, Y. S. *Angelica keiskei*, an emerging medicinal herb with various bioactive constituents and biological activities. *Archives of pharmacal research*, v. 40, p. 655–675, 2017.

KIM, C.; et al. Ashitaba and red ginseng complex stimulates exercise capacity by increasing mitochondrial biogenesis. *Korean J Food Sci Technol*. v. 49, p. 685-692, 2017.

KIM, J.-H. Pharmacological and medical applications of *Panax ginseng* and ginsenosides: a review for use in cardiovascular diseases. *J Ginseng Res*. v. 42, p. 264–269, 2018.

KIM, J.H., et al. Role of ginsenosides, the main active components of *Panax ginseng*, in inflammatory responses and diseases. *J Ginseng Res*. v. 41, p. 435–443, 2017.

KIM, M.K., et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ginsenoside Rf in a rat model of incisional pain. *J Ginseng Res*. v. 42, p. 183–191, 2018.

LI, X., et al. Anticancer property of ginsenoside Rh2 from ginseng. *Eur J Med Chem*. v. 203, 2020.

LÜ, J.M., et al. Ginsenoside Rb1 Blocks Ritonavir-Induced Oxidative Stress and eNOS Downregulation through Activation of Estrogen Receptor-Beta and Upregulation of SOD in Human Endothelial Cells. *Int J Mol Sci*. v. 20, p. 294, 2019.

LUO, B.Y., et al. The effects of ginsenosides on platelet aggregation and vascular intima in the treatment of cardiovascular diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Pharmacol Res*. v. 159, 2020.

MATSUURA, M., et al. Artery Relaxation by Chalcones Isolated from the Roots of *Angelica keiskei*. *Planta Medica*. v. 67, p. 230–235, 2001.

MOHANAN, P., et al. Molecular signaling of ginsenosides Rb1, Rg1, and Rg3 and their mode of actions. *J Ginseng Res.* v. 42, p. 123–132, 2018.

NAGAR, H., et al. Rg3-enriched Korean Red Ginseng enhances blood pressure stability in spontaneously hypertensive rats. *Integrative medicine research* v. 5, p. 223–229, 2016.

NAIR, A.R.; PILLAI, A.J.; NAIR, N. Cardiovascular Changes in Menopause. *Curr Cardiol Rev.* v. 1, 2021.

NOH, S., et al. Role of Antioxidant Natural Products in Management of Infertility: A Review of Their Medicinal Potential. v. 9, 2020.

NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY. Promoting women's health at midlife and beyond, 2016.

OHKURA N., et al. Anti-platelet effects of chalcones from *Angelica keiskei* Koidzumi (*Ashitaba*) in vivo. *Die Pharmazie.* v. 71, p. 651-654, 2016.

OHKURA, N., et al. Possible antithrombotic effects of *Angelica keiskei* (*Ashitaba*). *Pharmazie* v. 73, p. 315-317, 2018.

PARK, S.H., et al. Effects of *Panax ginseng* on hyperglycemia, hypertension, and hyperlipidemia: A systematic review and meta-analysis. *J Ginseng Res.* v. 46, p. 188-205, 2022.

PEACOCK, K., KETVERTIS, K.M. Menopause. [Updated 2022 Aug 11]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507826/>

PEREIRA, F.H.; BATALHÃO, M.E.; CÁRNIO, E.V. Correlation between body temperature, blood pressure and plasmatic nitric oxide in septic patients. *Rev Lat Am Enfermagem.* v. 22, p. 123-128, 2014.

QIN, L.Q., et al. Determination of antioxidant compounds from leaf and stem of *Angelica keiskei* by gas chromatography-mass spectrometry. *Asian Journal of Chemistry* v. 26, p. 5097–5099, 2014.

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.

SOHN, S.H., et al. A comparison of antioxidant activity of Korean White and Red Ginsengs on H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 hepatoma cells. *J Ginseng Res* v. 37, p. 442-450, 2013.

SOARES, C.N. Depression and Menopause: An Update on Current Knowledge and Clinical Management for this Critical Window. *Med Clin North Am* v. 103, p. 651-667, 2019.

- SON, D.J., et al. Bioassay-guided isolation and identification of antiplatelet-active compounds from the root of *Ashitaba* (*Angelica keiskei* Koidzumi). *Nat Prod Res.* v. 28, p. 2312–2316, 2014.
- STEELS, E., et al. Efficacy of a proprietary *Trigonella foenum-graecum* L. de-husked seed extract in reducing menopausal symptoms in otherwise healthy women: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Phytother Res.* v. 31, p. 1316–1322, 2017.
- TOUSOULIS D., et al. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol.* v. 10, p. 4–18, 2012.
- VALDES, A.; BAJAJ, T. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL). *Estrogen Therapy*, 2023.
- VERMA, T., et al. Plants Used as Antihypertensive. *Natural products and bioprospecting.* v. 11, p. 155–184, 2021.
- VISHWAKARMA, G. et al. Reproductive factors and breast cancer risk: A meta-analysis of case-control studies in Indian women. *South Asian J Cancer*, v. 8, p. 80-84, 2019.
- WIDIASARI, S. Angiotensin Converting Enzyme Inhibition Mechanism by Flavonoids in Hypertension. *Collab Med J.* v. 1, p. 30-44, 2018.
- YOSHIOKA, Y. et al. 4-Hydroxyderricin and xanthoangelol isolated from *Angelica keiskei* prevent dexamethasone-induced muscle loss. *Função Alimentar.* v. 11, p. 5498–5512, 2020.
- ZARROW, X. *Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques.* [s.l.] Academic Press, 1964.
- ZHANG, W., et al. Phytonutrient and anti-diabetic functional properties of flavonoid-rich ethanol extract from *Angelica keiskei* leaves. *Journal of Food Science and Technology.* v. 55, p. 4406–4412, 2018.
- ZHENG, Z. et al. Ginsenoside Rb1 reduces H₂O₂ induced HUVEC dysfunction by stimulating the sirtuin 1/AMP activated protein kinase pathway. *Mol Med Rep.* v. 22, p. 247-256, 2020.
- ZHOU, P. et al. Attenuation of TNF- α -induced inflammatory injury in endothelial cells by ginsenoside Rb1 via inhibiting NF- κ B, JNK and p38 signaling pathways. *Front Pharmacol.* v. 8, 2017.
- ZHOU, P. et al. Ginsenoside Rb1 as an anti-diabetic agent and its underlying mechanism analysis. *Cells.* v. 8, 2019.

Capítulo 3: Tratamento crônico com fotobiomodulação diminui pressão arterial e melhora função endotelial em ratas ovariectomizadas

3.1 Introdução

A menopausa pode ser definida como um processo fisiológico natural e uma fase de transição específica da mulher no processo de envelhecimento (VALDES e BAJAJ, 2023). A mulher possui fases determinadas relacionadas à cessação da menstruação, as quais são menopausa, perimenopausa e pós-menopausa. A perimenopausa é a primeira fase deste processo de cessação e pode começar entre oito a 10 anos antes da menopausa, na qual a mulher já pode experimentar alguns sintomas da menopausa. A menopausa ocorre no momento em que a mulher não menstrua mais no mínimo há 12 meses e a pós-menopausa é a fase após a confirmação da menopausa (VERDONK et al., 2022).

A idade média que ocorre a menopausa é de 52 anos nos Estados Unidos e varia de 45 a 55 anos (NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY, 2016), com alterações fisiológicas e metabólicas envolvidas e que estão associadas diretamente à deficiência de estrogênio. A cessação completa da menstruação é causada pela deficiência nos níveis de estrogênio, pois esta provoca uma interrupção no eixo hipotálamo-hipófise-ovário, o que leva a uma falha no desenvolvimento do endométrio, causando ciclos menstruais irregulares (PEACOCK e KETVERTIS, 2023).

O óxido nítrico (NO) é um importante vasodilatador, produzido principalmente nas células endoteliais com ação parácrina no músculo liso vascular promovendo relaxamento deste músculo. O estrogênio estimula a síntese de NO nas células do endotélio vascular, que então se difunde para as células musculares lisas vasculares, sendo o estrogênio importante para manter o fluxo sanguíneo e a função endotelial normal. O estrogênio é capaz de preservar a função endotelial ao conseguir diminuir a síntese de endotelina-1, um potente vasoconstritor, pelas células endoteliais. Durante a menopausa, essa vasodilatação dependente do endotélio é diminuída e ocorre o aumento da síntese de endotelina 1, ambos promovendo vasoconstrição (NAIR et al., 2021).

Ainda, a deficiência de estrogênio causada pela menopausa pode afetar sistemas e órgãos como o sistema cardiovascular podendo causar complicações, como a

hipertensão. Além disso, o aumento do colesterol, do peso corporal e do diabetes desempenham um papel importante e podem ser influenciados positivamente por um estilo de vida saudável (ZHU et al., 2019). De acordo com os dados da Carga Global de Doenças, o principal fator de risco mortal entre mulheres em todo o mundo é a hipertensão (GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY, 2019) e em mulheres na pós-menopausa, a incidência de doenças cardiovasculares foi 2 a 6 vezes maior em comparação com mulheres na pré-menopausa da mesma idade (EL KHOUDARY et al., 2020). Assim, além dos tratamentos convencionais de reposição hormonal, existem terapias complementares, como o uso da fotobiomodulação (FBM) para tratar os sintomas da menopausa.

O endotélio possui características que permitem uma resposta rápida a diversos estímulos, pois as células endoteliais participam da regulação de importantes funções fisiológicas (COLOMBO et al., 2021). Essas células liberam diversas substâncias vasoativas, como endotelina, angiotensina, NO e fator de crescimento endotelial vascular, que desempenham um papel regulador no tônus vascular, no crescimento dos vasos, na proliferação celular, agregação plaquetária, modulação de expressão de moléculas dentre outros (RAJERDRAN et al., 2013).

No entanto, esta função endotelial bem equilibrada pode ser afetada por vários fatores, como diabetes, doença renal crônica e hipertensão, levando a um estado não fisiológico destas células endoteliais, conhecido como disfunção endotelial (COLOMBO et al., 2021). Conforme apontam os estudos, esta disfunção endotelial pode ser neutralizada e revertida (DAIBER et al., 2017), o que aumenta a possibilidade de retardar a progressão de doenças relacionadas. Além dos tratamentos convencionais que utilizam drogas que atuam nas enzimas NADPH oxidase e nas atividades mitocondriais, a luz em determinados comprimentos de onda pode interagir e modular moléculas intracelulares, que são conhecidas como fotorreceptores, que pode culminar na regulação da liberação de NO, concentração intracelular de Ca^{2+} , dentre outros efeitos (AMAROLI et al., 2016; AMAROLI et al., 2016; AMAROLI et al., 2020; FERRANDO et al., 2019).

A FBM consiste na utilização de luz, na faixa de comprimento de onda entre 400 e 1300nm, em tecidos corporais (HAMBLIN, 2016). Existem estudos que demonstram os benefícios do uso de FBM em vários modelos de doenças, como doença de Parkinson (SHAW et al., 2010), acidente vascular cerebral (LAPCHAK et al., 2004), esclerose

múltipla (MUILI et al., 2012) e hipertensão (VALVERDE, MITROFANIS, 2022). Além disso, existem estudos que relatam que a FBM induz a liberação de NO, o que leva à vasodilatação dos vasos sanguíneos próximos ao ponto de aplicação (COLOMBO et al., 2021; OISHI et al., 2017). Ainda, foi demonstrado que a FBM melhora a disfunção endotelial, melhorando os níveis de proteína pró-angiogênica, um fator de crescimento endotelial vascular (COLOMBO et al., 2021).

Em trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, verificamos que a FBM feita com aplicação aguda do LASER vermelho (660 nm) na região abdominal de ratos, foi capaz de induzir importante queda na pressão arterial, no modelo de hipertensão renovascular dois rins um clipe (Oishi et al., 2017) e modelo de ratos espontaneamente hipertensos (BUZINARI et al., 2020), assim como este efeito foi energia dependente, como pode ser verificado em nossa publicação (DE MORAES et al., 2020). Também, no modelo de hipertensão 2R-1C verificamos que a FBM feita com aplicação crônica do LASER vermelho (660 nm) (2 vezes por semana) foi capaz de normalizar a pressão arterial em 64% dos animais hipertensos, que chamamos de responsivos (SCHIAVON et al., 2023).

Estratégias terapêuticas complementares, como a FBM, vêm ganhando destaque como opção segura de manejo para mulheres na menopausa, o que pode ser uma estratégia para auxiliar no controle da pressão arterial nesta condição. Neste trabalho, investigamos se a FBM pode melhorar a pressão arterial e função endotelial em ratas ovariectomizadas.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Animais e desenho experimental

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos, sob número de registro: 6449201120. Vinte e seis ratas Wistar fêmeas com 200g a 250g com 90 dias de idade foram divididas aleatoriamente em três grupos: ovariectomizadas (OVX) (n= 8), ovariectomizadas tratadas com FBM (OVX+FBM) (n= 9) e sham (SH) (n= 9). Todos os procedimentos com ratos que serão descritos neste trabalho foram realizados após uma semana de

aclimatação. Os animais foram mantidos no ciclo claro-escuro com comida e água *ad libitum* até o dia do experimento. Todos os animais foram pesados a cada duas semanas.

3.2.2 Procedimento cirúrgico: indução da menopausa

Todos os animais dos grupos OVX foram submetidos à ovariectomia, ou seja, à retirada dos ovários na 12^a semana de vida, devido à boa resposta à cirurgia evidenciada na literatura (ZHANG et al., 2018). A técnica utilizada seguiu o protocolo Zarrow (1964) e a anestesia foi com associação de 13mg/Kg de xilazina e 33mg/Kg de cetamina base por administração intraperitoneal. Primeiramente foi feita uma pequena incisão bilateral (1,0-1,5 cm) na pele e na camada muscular com auxílio de tesoura e pinça, aproximadamente 1 cm abaixo da última costela, perpendicular ao corpo do animal, como mostra a Figura 7.

Para o procedimento, foi realizada uma incisão bilateral no abdômen da rata, os ovários expostos e removidos e uma sutura de náilon ligada logo abaixo da fímbria. Após a retirada dos ovários, foi feita incisão na musculatura e na pele com fio de náilon. Os animais dos grupos sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, tiveram os ovários exteriorizados para a cavidade abdominal e devolvidos, sem retirá-los.

Após a cirurgia, foi respeitado um período de 2 semanas de recuperação para início dos procedimentos com protocolo padronizado de aplicação da fotobiomodulação.

Figura 8 – Imagem representativa do procedimento de retirada dos ovários dos animais do grupo OVX.



Fonte: próprio autor.

3.2.3 Medida da pressão arterial

Ao longo do tratamento, a pressão arterial sistólica dos animais foi medida por pletismografia de cauda após seis semanas da indução da menopausa e após o tratamento. As ratas foram introduzidas em um aparelho de contenção e ansiedade em ambiente calmo e tranquilo por 1 hora. Esse procedimento foi repetido algumas vezes antes da análise, com a preocupação de familiarizá-las com o teste.

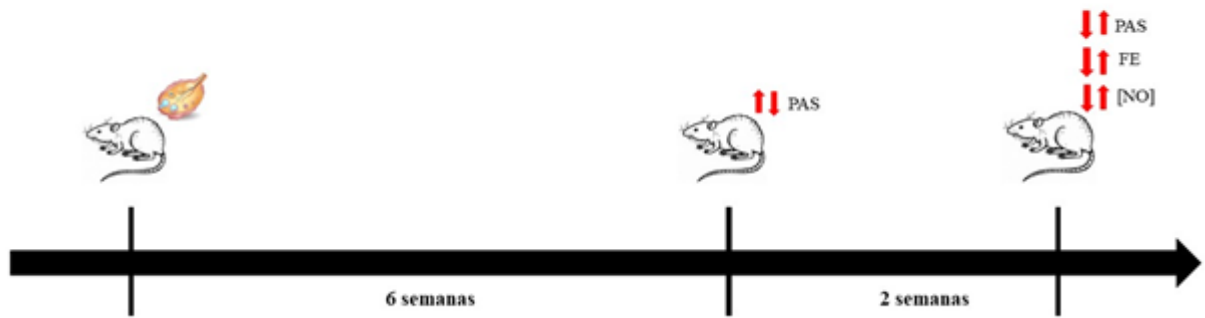
O pletismógrafo possui manguito emborrachado e sensor fotoelétrico de pulso que foi colocado ao redor da cauda do animal. O sensor é conectado a um amplificador (NIPREM 645, Cibertec, Madrid, Espanha), e as pulsações registradas no PowerLab (AD Instruments, Castle Hill, NSW, Austrália). Foram realizadas 3 medidas consecutivas, considerando a média aritmética desses resultados como valor da pressão.

3.2.4 Tratamento com fotobiomodulação

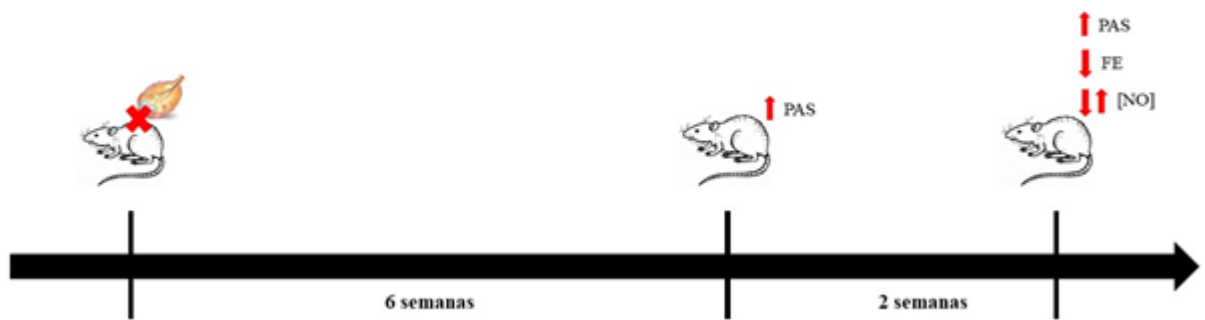
O tratamento se iniciou após seis semanas da cirurgia de indução da menopausa, como mostra a Figura 8. Os animais dos grupos com tratamento com FBM receberam LLLT (660 nm) duas vezes por semana, durante duas semanas. A energia foi de 5,6 Joules por ponto, em 6 pontos de aplicação na região abdominal, com potência de 100 mW. Os parâmetros de irradiação estão descritos na Tabela 1. Os animais dos grupos que não receberam tratamento com FBM foram manipulados com a mesma frequência dos tratados. Após duas semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação e foram realizadas análises.

Figura 9 – Linha do tempo representando os três grupos experimentais, com os principais resultados. A: sham (SH), B: ovariectomizadas (OVX) e C: ovariectomizadas tratadas com fotobiomodulação (OVX+FBM). PAS: pressão arterial sistólica; FE: função endotelial, [NO]: concentração sérica de óxido nítrico.

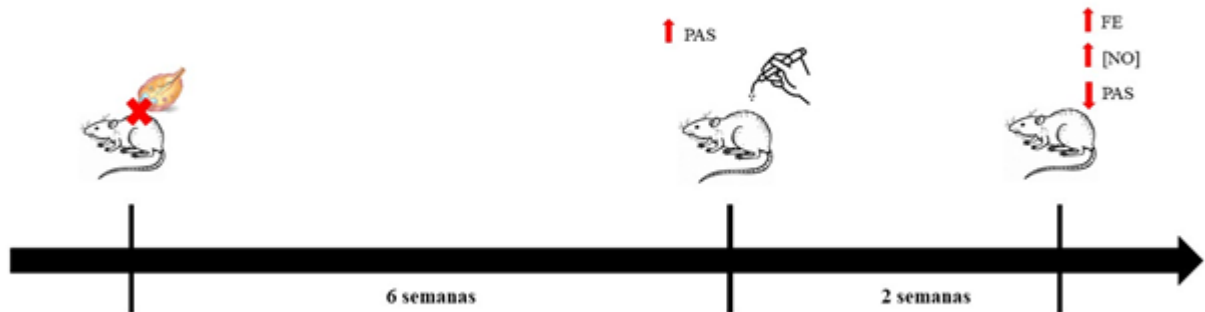
SHAM



OVX



OVX+FBM



Legenda: ↑ - Aumentou; ↓ - Diminuiu; ↑↓ - Não houve diferença

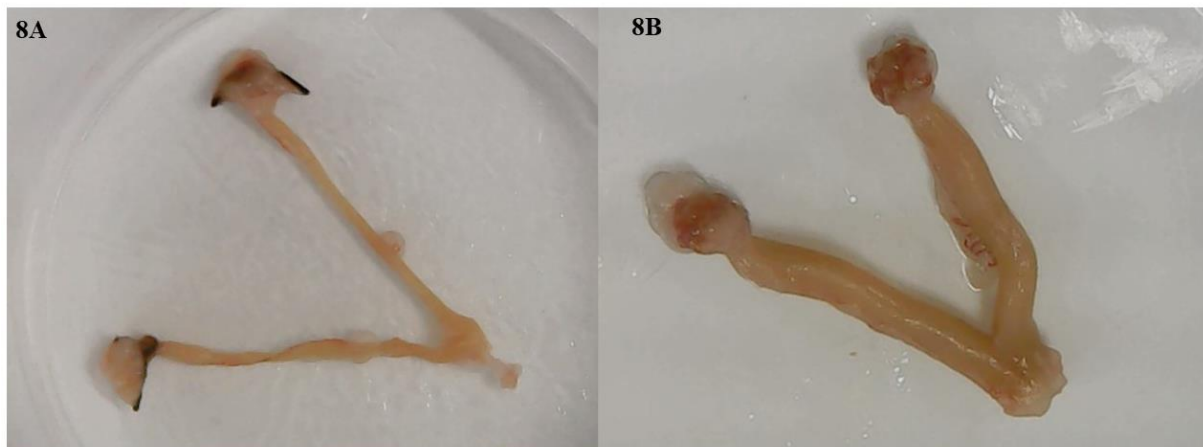
Tabela 1: Parâmetros da fotobiomodulação *in vivo*.

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	100 mW
Energia	5,6 Joules
Tempo de exposição	56 segundos
Fluência	63 J/cm ²

3.2.5 Eutanásia e coleta de material biológico

Os animais foram eutanasiados por decapitação e alguns tecidos foram coletados para posterior análise. A artéria aorta torácica foi removida, isolada e cortada em anéis de aproximadamente 4 mm de comprimento e mantida em solução de Krebs para experimento de reatividade vascular. O útero foi coletado e fotografado para posterior análise. O sucesso da cirurgia foi verificado pela atrofia uterina observada nos grupos ovariectomizados quando comparados ao grupo sham, como pode ser verificado nas Figuras 9A e 9B. O sangue foi coletado em tubos falcon logo após a eutanásia para posterior alíquota de soro para exames bioquímicos.

Figura 10A - Útero de rata ovariectomizada e **10B** – Útero de rata não ovariectomizada.



Fonte: próprio autor.

3.2.6 Reatividade Vascular

Os anéis aórticos dissecados após a eutanásia foram colocados em banho de órgãos isolado contendo 5 mL de solução de Krebs a 37°C, pH 7,4, borbulhando continuamente com 95% O₂ e 5% CO₂ em miógrafo isométrico (Mulvany-Halpern-modelo 610 DMT- EUA, Marietta, GA) e registrados por um sistema de aquisição de dados PowerLab8/SP (ADInstruments Pty Ltd., Colorado Springs, CO).

Primeiramente, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de 1,5 g por trinta minutos para permitir a estabilização. Em seguida, a integridade endotelial foi avaliada utilizando a EC₅₀ da fenilefrina (0,1 µmol/L) para contrair o vaso, seguida do relaxamento induzido por 1 µmol/L de acetilcolina. Os anéis foram descartados quando o relaxamento foi inferior a 60%, assumindo o que foi padronizado para ratos hipertensos com disfunção endotelial (RODRIGUES et al., 2010).

Os anéis aórticos intactos foram submetidos a uma segunda contração com fenilefrina 0,1 µmol/L e em seguida foram construídas curvas concentração-efeito para

acetilcolina (0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L). Foram avaliadas a potência (pD₂) e o efeito relaxante máximo (E_{max}).

3.2.7 Medida do óxido nítrico

Para os níveis de medição de NO, foi medida a concentração sérica do produto estável de NO, nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), conhecido como NO_x, conforme descrito anteriormente (PEREIRA et al, 2014), usando o NO Analyzer 280i (Sievers, Boulder, CO, EUA).

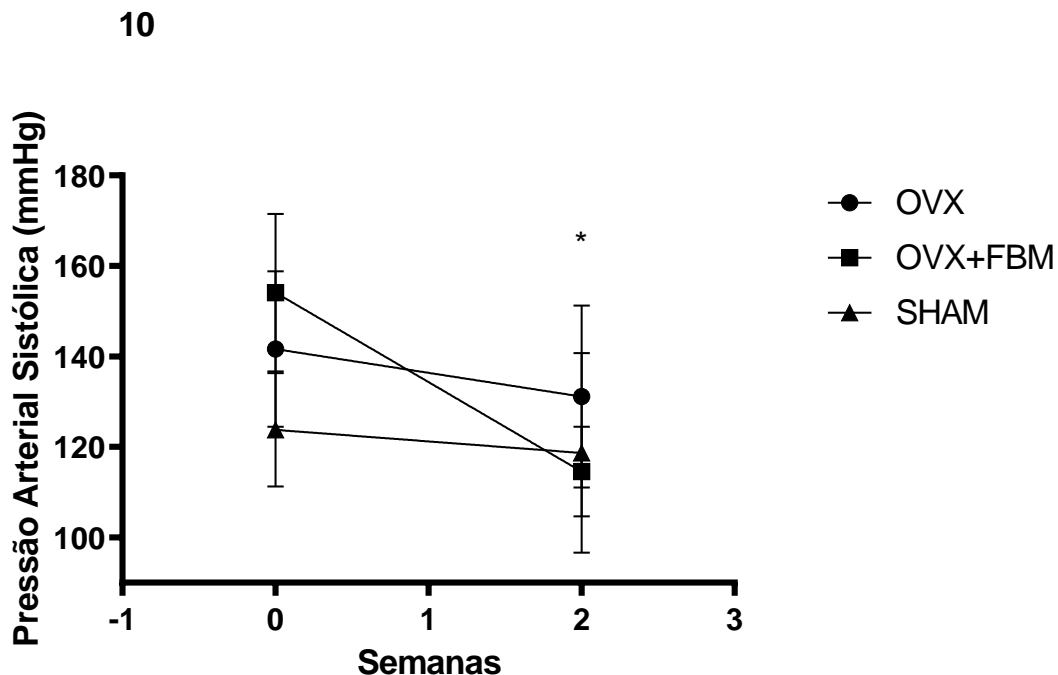
3.2.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 8.0.1). Os dados são apresentados como média ± erro padrão médio (EPM). As comparações entre todos os grupos foram feitas usando ANOVA unidirecional com pós-teste de Newman-Keuls. Foi adotado um nível de 5% para considerar as diferenças estatisticamente significativas.

3.3 Resultados

A ovariectomia induziu elevação da pressão arterial sistólica, como pode ser verificado no grupo OVX (141,62 ± 6,0 mmHg, n = 8) e OVX+FBM antes do tratamento (154,11 ± 5,8 mmHg, n = 9) em comparação ao Sham (123,77 ± 4,16 mmHg, n = 8, p < 0,05). Duas semanas de tratamento com FBM induziram uma diminuição na pressão arterial sistólica de ratos OVX (OVX+FBM: 114,55 ± 3,3 mmHg, n = 9), em comparação com o grupo OVX sem tratamento (131,12 ± 7,1 mmHg, n = 8; p < 0,05), como pode ser verificado na Figura 11.

Figura 11 – Avaliação da pressão arterial sistólica ao longo das semanas. Cada ponto representa a média e o erro padrão médio (EPM) dos dados obtidos a partir de determinações independentes. *Indica a diferença (p < 0,001) nos valores entre a pressão arterial sistólica de Sham vs OVX.



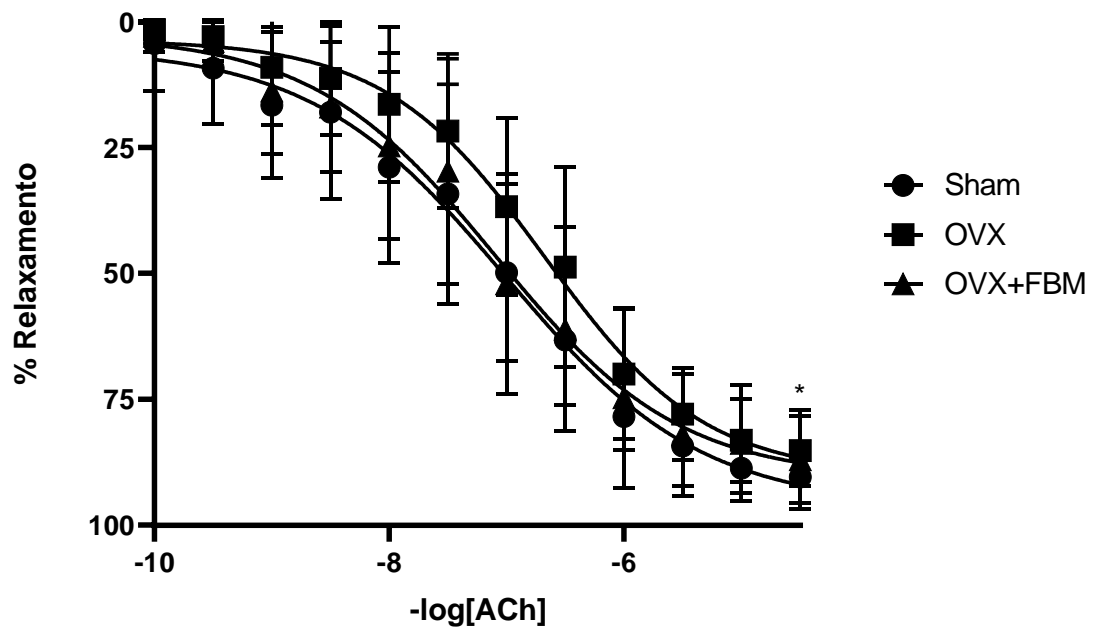
Na Figura 12A, observou-se que na curva de relaxamento para acetilcolina os valores de E_{max} dos animais submetidos à cirurgia de ovariectomia mudaram (OVX E_{max} : $77,32 \pm 3,95\%$, $n = 8$) em relação às ratas ovariectomizadas que receberam tratamento (OVX+FBM E_{max} : $88,07 \pm 2,97\%$, $n = 9$) e em relação ao grupo sham (E_{max} : $91,97 \pm 1,59\%$, $n = 9$).

O tratamento com FBM melhorou a vasodilatação dependente do endotélio em anéis aórticos de ratas OVX (pD2: $7,49 \pm 0,24$, $n=8$; E_{max} : $88,07 \pm 2,97\%$, $n = 8$) em comparação com OVX (pD2: $6,30 \pm 0,16$, $n=8$), $p < 0,05$; E_{max} : $77,32 \pm 3,95\%$, $n = 8$, $p < 0,01$), sem diferença entre OVX+FBM e Sham (Figuras 12B e 12C).

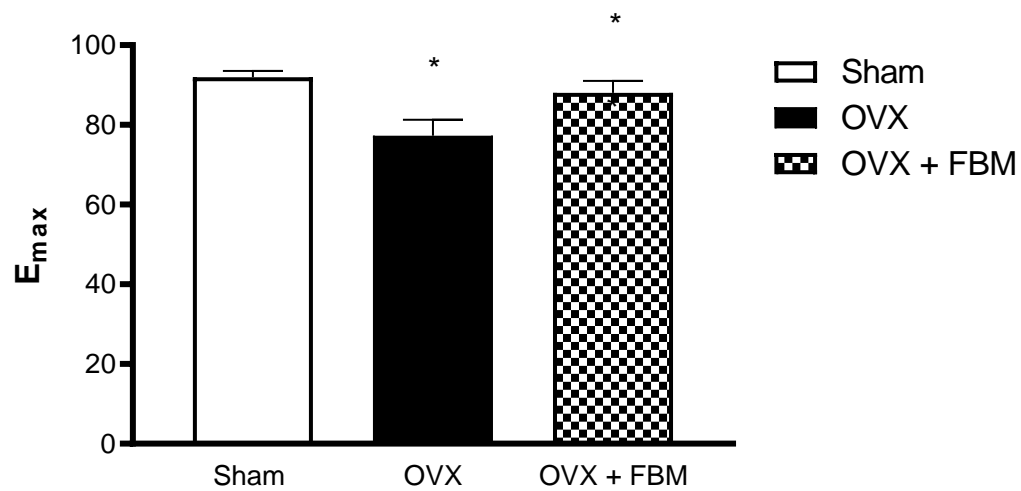
Na Figura 12C, observou-se que houve diferença significativa nos valores de pD2 entre os grupos de tratamento, sendo os valores apresentados para OVX (pD2: $6,30 \pm 0,16$, $n = 8$) e OVX+FBM (pD2: $7,49 \pm 0,24$, $n = 9$); e Sham (pD2: $7,01 \pm 0,19$, $n = 9$) e aquela submetida à cirurgia de ovariectomia sem tratamento (OVX).

Figura 12 – Estudo da função do endotélio em vasos isolados de anéis aórticos de ratos OVX, OVX+FBM e SH. Curvas cumulativas de concentração-efeito realizadas para acetilcolina em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Cada ponto representa a média e o erro padrão médio (EPM) dos dados obtidos a partir de determinações independentes. ** Indica a diferença ($p < 0,001$) nos valores de E_{max} entre aortas de ratos OVX +FBM vs OVX nos gráficos das imagens A, B e C.

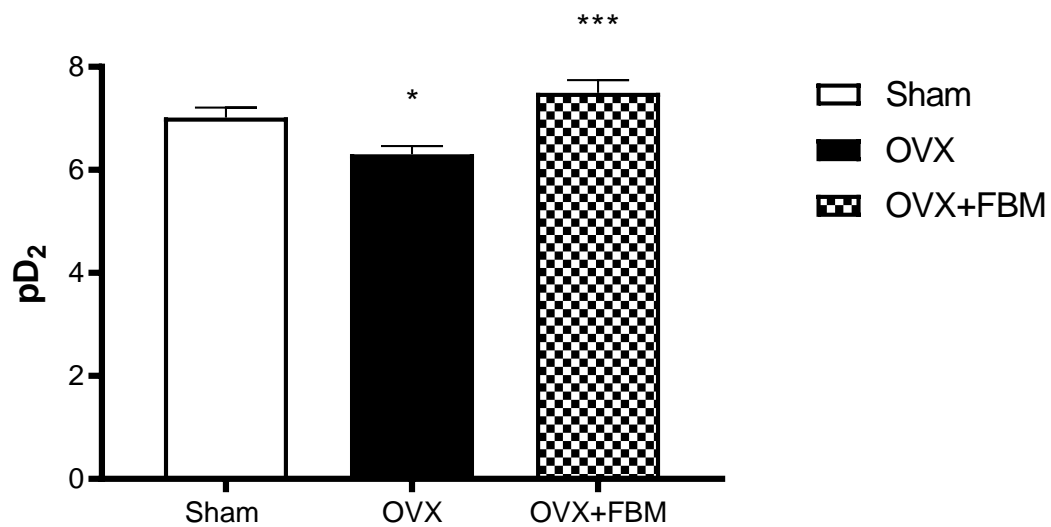
12A



12B

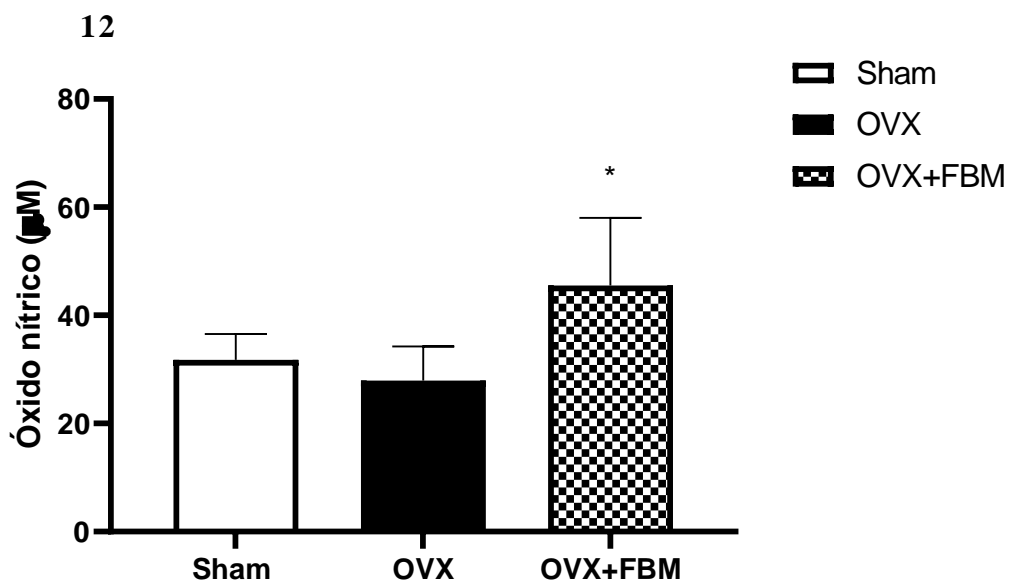


12C



Além disso, o tratamento com FBM mostrou diferença significativa nos níveis sanguíneos de NO entre os grupos OVX e OVX+FBM, com os valores (OVX+FBM: $45,50 \pm 2,98 \mu\text{M}$, $n = 9$); (OVX: $27,95 \pm 3,72 \mu\text{M}$, $n = 8$, $p < 0,05$) e SH ($31,80 \pm 2,11 \mu\text{M}$, $n = 9$), como mostra a Figura 13.

Figura 13 – Quantificação da concentração de óxido nítrico (NO) entre os grupos. *Indica a diferença ($p < 0,05$) nos valores entre a concentração de NO entre OVX+FBM vs OVX.



3.4 Discussão

Neste estudo verificamos que a ovariectomia induziu disfunção endotelial e elevação da pressão arterial e que o tratamento com FBM por duas semanas melhorou a função endotelial, induziu diminuição da pressão arterial e elevou os níveis séricos de NO em ratas ovariectomizadas.

Vários estudos têm demonstrado o potencial terapêutico da FBM, que, além de ser uma ferramenta eficiente, não invasiva, de baixo custo e segura, possui diversos efeitos, como analgésico, anti-inflamatório, cicatrizante, entre outros (ALBERTINI et al., 2004; MEZAWA et al., 1988; VINCK et al., 2003). Um estudo demonstrou que a FBM é capaz de induzir uma resposta fotobiológica no interior das células; aumentando a produção de trifosfato de adenosina (ATP), aumentando a concentração de NO e alteração das bombas de sódio-potássio e canais de cálcio nas membranas celulares (KARU, 1999).

Em estudo prévio, foi demonstrado que a FBM feita com aplicação crônica do LASER vermelho (780 nm) na cauda do animal três vezes por semana, durante 7 semanas, diminuiu a pressão arterial diastólica em ratos espontaneamente hipertensos

(SHR) (TOMIMURA et al., 2014). Resultados semelhantes foram obtidos pelo nosso grupo de pesquisa em dois modelos experimentais, em que verificamos que o tratamento crônico (duas vezes por semana) feito pela FBM com aplicação do LASER vermelho (660 nm) na região abdominal do animal induziu queda na pressão arterial em animais hipertensos dois rins um clipe (2R-1C), durante quatro semanas (SCHIAVON et al., 2023) e preveniu a elevação da pressão arterial em ratos obesos, com a aplicação feita três vezes por semana, durante doze semanas (OISHI et al., 2024). Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a aplicação aguda do laser vermelho (660 nm), na região abdominal, induziu efeito hipotensor de longa duração em ratos hipertensos 2R-1C e ratos hipertensos SHR, com consequente aumento dos níveis séricos de NO (OISHI et al., 2017; DE MORAES et al., 2020).

Em estudo de reatividade vascular, feito em artéria isolada de ratos, nosso grupo verificou que a FBM feita com aplicação do LASER vermelho (a 660 nm) induziu vasodilatação por um mecanismo dependente da liberação de NO e ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), no músculo liso vascular (OISHI et al., 2017). Ainda, verificamos que o efeito vasodilatador e hipotensivo induzido pelo LASER vermelho (660 nm) é dependente da concentração de NO estocada nos tecidos, por experimentos feitos em vasos isolados e animais hipertensos (BUZINARI et al., 2022). O mecanismo proposto para a liberação de NO causado pela irradiação envolve a liberação de NO de estoques intracelulares que poderiam ser S-nitrosotióis, complexos heme nitrosil e dinitrosil ferro (KANNEL, 1996; KESZLER et al., 2018; LOHR et al., 2009). O NO é um potente vasodilatador, produzindo seu efeito principalmente pela ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) nas células do músculo liso vascular (RAPOPORT et al., 1983). Desta forma, a elevação do NO observada no sangue das ratas ovariectomizadas tratado com a FBM por aplicação do LASER vermelho (660 nm) pode estar envolvido com a queda da pressão arterial observada nestes animais, uma vez que o NO é um potente vasodilatador.

Neste estudo, houve melhora no relaxamento dependente do endotélio nos anéis aórticos do grupo FBM, sugerindo que a disfunção endotelial ocorre devido à ovariectomia e que isso pode ser revertido pelo tratamento com a FBM por aplicação do LASER vermelho (660 nm). Estes resultados corroboram com nosso estudo prévio, que o tratamento crônico com a FBM por aplicação do LASER vermelho (660 nm) diminuiu a disfunção endotelial em ratos obesos (OISHI et al., 2024). Nossos resultados indicam

que o tratamento com FBM é capaz de melhorar a função endotelial e aumentar o NO circulante, sendo que estes dois fatores devem estar relacionados à diminuição da pressão arterial em ratas OVX.

Nossos resultados estão de acordo com a literatura, mostrando que a FBM é capaz de induzir efeito hipotensor em modelos animais de hipertensão. No entanto, nosso estudo é o primeiro a mostrar uma redução efetiva da pressão arterial por meio da FBM por aplicação do LASER vermelho (660 nm) em um modelo de rata ovariectomizada.

3.5 Conclusão

Em conjunto, nossos resultados mostraram que a ovariectomia induziu elevação da pressão arterial sistólica e da disfunção endotelial, as quais foram reduzidas com duas semanas de tratamento com FBM por meio das aplicações do LASER vermelho. Estudos futuros são importantes para investigar como a FBM poderia ser utilizada para aliviar sintomas e complicações da menopausa em mulheres.

3.6 Referências

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.

AMARAOLI, A. et al. Photobiomodulation by Infrared Diode Laser: Effects on Intracellular Calcium Concentration and Nitric Oxide Production of Paramecium. *Fotoquímica. Fotobiol.* v. 92, p. 854–862, 2016.

AMAROLI, A.; FERRANDO, S.; BENEDICENTI, S. Photobiomodulation Affects Key Cellular Pathways of all Life-Forms: Considerations on Old and New Laser Light Targets and the Calcium Issue. *Fotoquímica. Fotobiol.* v. 95, p. 455–459, 2019.

AMAROLI, A. et al. Interaction between Laser Light and Osteoblasts: Photobiomodulation as a Trend in the Management of Socket Bone Preservation-A Review. *Biology*, v. 9, 2020.

BUZINARI, T.C. et al. Photobiomodulation induces hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Lasers in medical science*, v. 35, p. 567–572, 2020.

BUZINARI, T.C. et al. Nitric oxide storage levels modulate vasodilation and the hypotensive effect induced by photobiomodulation using an aluminum gallium arsenide (AlGaAs) diode laser (660 nm). *Lasers in medical science*, v. 37, n. 6, p. 2753–2762, 2022.

COLOMBO, E. et al. Experimental and Clinical Applications of Red and Near-Infrared Photobiomodulation on Endothelial Dysfunction: A Review. *Biomedicines*. v. 9, 2021.

DAIBER, A. et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Ir. J. Pharmacol.* v. 174, p. 1591–1619, 2017.

DE MORAES, T. Energy-dependent effect trial of photobiomodulation on blood pressure in hypertensive rats. *Lasers in Medical Science* v. 35, p. 1041–1046, 2020.

EL KHOUDARY S.R. et al. Menopause Transition and Cardiovascular Disease Risk: Implications for Timing of Early Prevention: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. v. 142, p. 506-532, 2020.

FERRANDO, S. et al. The 808 nm and 980 nm infrared laser irradiation affects spore germination and stored calcium homeostasis: A comparative study using delivery hand-pieces with standard (Gaussian) or flat-top profile. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, v. 199, 2019.

GLOBAL BURDEN OF 87 RISK FACTORS IN 204 COUNTRIES AND TERRITORIES, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. v. 396, p. 1223-1249, 2020.

HAMBLIN, M. R. Shining light on the head: Photobiomodulation for brain disorders. *BBA clinical*, v. 6, p. 113–124, 2016.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* v. 15, p. 175-191, 1991.

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

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B* v. 49, p. 1–17, 1999.

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.

LAPCHAK, P. A.; WEI, J.; ZIVIN, J. A. Transcranial infrared laser therapy improves clinical rating scores after embolic strokes in rabbits. *Stroke*, v. 35, p. 1985–1988, 2004.

- LOHR, N.L. et al. Enhancement of nitric oxide release from nitrosyl hemoglobin and nitrosyl myoglobin by red/near infrared radiation: potential role in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* v. 47, p. 256–263, 2009.
- 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.
- MUILI, K.A. et al. Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 Mice by Photobiomodulation Induced by 670 nm Light, *PLoS One* v. 7, 2012.
- NAIR, A.R.; PILLAI, A.J.; NAIR, N. Cardiovascular Changes in Menopause. *Curr Cardiol Rev.* v. 1, 2021.
- NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY. Promoting women’s health at midlife and beyond, 2016.
- OISHI, J.C. et al. Hypotensive acute effect of photobiomodulation therapy on hypertensive rats. *Life sciences*, v. 178, p. 56–60, 2017.
- OISHI, J.C. et al. Photobiomodulation done three days a week prevents high blood pressure in obese rats induced by high fat diet. *Laser in medical science*, 2024. (DOI: 10.1007/s10103-023-03950-8)
- PEACOCK, K.; KETVERTIS, K.M. Menopause. [Updated 2022 Aug 11]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507826/>
- PEREIRA, F.H.; BATALHÃO, M.E.; CÁRNIO, E.V. Correlation between body temperature, blood pressure and plasmatic nitric oxide in septic patients. *Rev Lat Am Enfermagem.* v. 22, p. 123-128, 2014.
- RAJENDRAN, P. et al. The vascular endothelium and human diseases. *International journal of biological sciences*, v. 9, p. 1057–1069, 2013.
- 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. 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.
- SCHIAVON, M.S.C et al. Chronic red laser treatment induces hypotensive effect in two-kidney one-clip model of renovascular hypertension in rat. *Lasers in Medical Science.* v. 38, n. 252, 2023.
- SHAW, V. E. et al. Neuroprotection of midbrain dopaminergic cells in MPTP-treated mice after near-infrared light treatment. *The Journal of comparative neurology*, v. 518, p. 25–40, 2010.

TOMIMURA, S. et al. Hemodynamic effect of laser therapy in spontaneously hypertensive rats. *Arq Bras Cardiol* v. 103, p. 161–164, 2014.

VALDES, A.; BAJA, J T. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): 2023. Estrogen Therapy.

VALVERDE, A.; MITROFANIS, J. Photobiomodulation for Hypertension and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* v. 90, p. 1045-1055, 2022.

VERDONK, P.; BENDIEN, E.; APPELMAN, Y. Menopause and work: A narrative literature review about menopause, work and health. *Work*. v. 72, n. 2, p. 483-496, 2022.

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.

ZARROW, X. Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques. [s.l.] Academic Press, 1964.

ZHU, D. et al. Age at natural menopause and risk of incident cardiovascular disease: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Public Health*. v. 4, p. e553–e564, 2019.