

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
Laboratório de Farmacologia Cardiovascular

LUIS HENRIQUE OLIVEIRA DE MORAES

**USO DE *Panax ginseng* E *Angelica keiskei* PARA
POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO VASODILATADOR
INDUZIDO PELA FOTOBIMODULAÇÃO (660 nm)**

SÃO CARLOS-SP
2025

LUIS HENRIQUE OLIVEIRA DE MORAES

**USO DE *Panax ginseng* E *Angelica keiskei* PARA POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO
VASODILATADOR INDUZIDO PELA FOTOBIMODULAÇÃO (660 nm)**

Tese apresentada ao Programa interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF-UFSCar/UNESP) do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Dr. Gerson J. Rodrigues

São Carlos-SP
2025



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 do candidato Luis Henrique Oliveira de Moraes, realizada em 25/08/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues (UFSCar) Profa. Dra.

Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar) Profa. Dra. Sandra

Lia do Amaral Cardoso (UNESP) Profa. Dra. Natália

Mayumi Inada (IFSC/USP)

Prof. Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa (UFAM)

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

DEDICATÓRIA

Este trabalho é inteiramente dedicado à minha irmã, Edinéia Aparecida de Carvalho Jesus, que faleceu no dia 19 de maio de 2021, por complicações cardiovasculares após infecção por Covid-19. Pessoa íntegra, especial e de bom coração, exemplo de filha, de mãe e de irmã para todos. Te amarei eternamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde, proteção e força para completar esta jornada de 11 anos dedicada à pesquisa e ao conhecimento.

À minha mãe, Dilma de Fátima Oliveira, por sua coragem inabalável, pelo afeto constante e pela criação amorosa que me formou.

Às minhas irmãs, Edinéia Ap. C. Jesus (in memoriam) e Lucineia de Fátima C. Ribeiro, pelo cuidado e carinho ao longo da vida, e às minhas sobrinhas — Adrielle, Gabrielle, Elisa e Lívia — por iluminarem meus dias com amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues, pela parceria de mais de uma década, pela confiança depositada, pela amizade e pelos ensinamentos que transcendem o laboratório. Gratidão por tudo.

À banca examinadora — Dra. Natália M. Inada, Sandra Lia do Amaral Cardoso, José Wilson do Nascimento Corrêa e Fernanda de Freitas Anibal — pela disponibilidade, críticas construtivas e contribuições valiosas para este trabalho.

A todos os professores que passaram pela minha vida — do ensino fundamental ao doutorado — minha eterna gratidão por terem cultivado em mim o prazer pelo saber. Levo comigo o compromisso de retribuir esse conhecimento à sociedade.

Aos colegas de jornada no laboratório: Ariane Martinelli, Bárbara Macedo, Júlio Conceição, Jorge Oishi, Izabela Vatanabe, Carla Rodrigues, Thiago de Moraes, e especialmente Cynthia Castro e Tereza Buzinari, exemplos de pesquisadoras admiráveis que tanto me inspiraram.

Às queridas parceiras de pesquisa, Camila Pereira Sabadini e Nayara Formenton da Silva, por todo apoio técnico, emocional e pela irmandade construída nessa jornada científica. Vocês são, e sempre serão, o melhor time do diabetes!

À minha amiga Barbara Terroni, pelas risadas inesperadas, pela amizade sincera e pelo apoio constante nos bastidores desta longa caminhada.

Aos amigos David Maués, Henrique Matheus, Jaqueline Veríssimo, Karina Pereira Lisboa e Lucas Oliveira, pelo carinho, incentivo e suporte nos momentos mais desafiadores.

Ao grupo da DMC: Adriane, Karen, Janaína, Izabel, Daniel, Adriana e tantos outros, por tornarem meu ambiente de trabalho mais leve com amizade, acolhimento e histórias compartilhadas.

Aos colegas do Nupen: Dra. Luciana, Paulo, Marília, Alessandra, Cris, Amanda, Marli e Thais, por todo o aprendizado construído em equipe.

Às amigas da Brain4care, Gabi e Camila, por compartilharem conhecimento, simplicidade e momentos de alegria.

Ao pessoal do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, especialmente Aline Machado, por tantas conversas, cafés e acolhimento nos dias difíceis.

À minha amiga Regiane, por sempre me oferecer uma mão estendida e arrancar sorrisos mesmo nos dias mais cinzentos.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular: Profa. Anabelle, Di-ego, Reinaldo, Khayyam, Emily, pelo aprendizado mútuo e pela amizade com sabor de café.

À querida Carla Rodrigues, por seu apoio constante e entusiasmo com minha trajetória acadêmica.

À Natália Couto, pelo acolhimento durante o doutorado sanduíche em Chicago e por me abrir as portas não só de seu laboratório, mas também de sua vida e ter me introduzido à pessoas incríveis.

Às amigas brasileiras do Applied Health Science: Natália Lima, Jaqueline, Carla e Manu, pelos momentos compartilhados, pelas risadas, desabafos e apoio emocional que tanto me fortaleceram.

Ao grande amigo Luis, com quem dividi tantas experiências em Chicago e que tornou essa etapa ainda mais especial.

Aos amigos Reginaldo, Joe, Ranan, Rodrigo, Raissa, Otávio, Carol, Andressa, Andrea, Mellany, Marco e Ygor, pelos encontros, almoços, conversas, afeto e memórias inesquecíveis.

A mi amiga Daniela, por traer consigo un amor inmenso desde México, haciendo mis días en Chicago más coloridos y felices.

To my Turkish friend/brother, Ridvan Aktan, for the constant support and encouragement, even from afar.

To Tejas, for being my first friend in Chicago and for the cultural exchange, kindness, and generosity from day one.

To my dear Miguel, for your tenderness, wisdom, laughter and for never letting me feel alone. Your love - and the care of Paulina, Squirt, Celina (in memoriam) and Kobe (in memoriam) - warmed my heart during this journey.

To Joe and Juan, for your generosity, friendship and the unforgettable moments we shared in Chicago.

To Professor Shane, for welcoming me into his lab and generously sharing knowledge and trust.

A mis hermanos de Argentina - Matías, Prof. Diego, Vic, Rocío y muchos otros - por su calidez, por enseñarme su cultura y por hacerme sentir en casa en Mendoza.

À minha amiga de infância Bruna Rafaela, por torcer por mim em cada etapa,
mesmo de longe.

Ao Sr. Sérgio e à equipe do Biotério Central, pelo cuidado com os animais e pelo
apoio nos experimentos. Ao Professor Wladimir R. Beck, por ceder gentilmente o
espaço no Biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia.

À funcionária Janaína, pelo carinho no dia a dia e pelas conversas sempre acolhe-
doras.

À pessoa – que de longe – é a mais importante para a conclusão deste trabalho,
meu companheiro de vida Thiago Augusto do Nascimento. Obrigado por todo cari-
nho, amor, lealdade e sorriso. Só estou finalizando este ciclo graças a você, que me
ergueu, reergueu e esteve comigo em todos os momentos que eu mais precisava.
Você é incrível!

À CAPES, à FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro essencial para a realização
desta pesquisa.

Aos ratos Wistar, que involuntariamente contribuíram para a ciência. Que seu sacri-
fício seja honrado com ética e resultados significativos.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, torceram por mim, meu mais sin-
cero muito obrigado.

RESUMO

A disfunção endotelial é uma característica da hipertensão renovascular e uma barreira crítica à eficácia das terapias vasculares. Este estudo explorou o potencial sinérgico da combinação de fitoterapia com fotobiomodulação (FBM) para restaurar a função endotelial por meio de mecanismos mediados por óxido nítrico (NO). Utilizando o modelo de hipertensão 2-rins-1-clipe (2R1C) em ratos, bem como ensaios *in vitro* com células endoteliais humanas e preparações vasculares isoladas. Dito isto, avaliamos os efeitos de uma combinação padronizada de *Panax ginseng* e *Angelica keiskei*, plantas conhecidas por suas propriedades antioxidantes e vasorrelaxantes. A administração intermitente do extrato melhorou a vasodilatação dependente do endotélio e aumentou a sensibilidade ao NO, apesar dos efeitos modestos na pressão arterial. Quando combinado com FBM (660 nm), o tratamento à base de plantas potencializou significativamente as respostas vasodilatadoras nos anéis aórticos, um efeito anulado pela remoção do endotélio ou pela inibição da via do NO, sugerindo dependência da eNOS. A inibição da eNOS via L-NAME atenuou esses efeitos, mas revelou compensação endotelial parcial nas respostas à acetilcolina. Ensaios celulares confirmaram aumento de NO intracelular e redução da produção de superóxido, indicando restauração do equilíbrio redox. Em conjunto, esses achados ressaltam uma interação mecanicista entre fitoterapia e PBM, impulsionada pela ativação da eNOS e modulação do estresse oxidativo, oferecendo uma estratégia não farmacológica promissora para neutralizar a disfunção endotelial na hipertensão.

Palavras-chave: Fotobiomodulação; fitoterapia; hipertensão; óxido nítrico; disfunção endotelial

ABSTRACT

Endothelial dysfunction is a hallmark of renovascular hypertension and a critical barrier to effective vascular therapies. This study explored the synergistic potential of combining phytotherapy with photobiomodulation (PBM) to restore endothelial function through nitric oxide (NO)-mediated mechanisms. Using the 2-kidney-1-clip (2K1C) hypertensive model in rats, as well as in vitro assays with human endothelial cells and isolated vascular preparations, we evaluated the effects of a standardized combination of *Panax ginseng* and *Angelica keiskei*—plants known for their antioxidant and vasorelaxant properties. Intermittent administration of the extract improved endothelium-dependent vasodilation and enhanced NO sensitivity, despite modest effects on blood pressure. When paired with PBM (660 nm), the herbal treatment significantly potentiated vasodilatory responses in aortic rings, an effect abolished by endothelium removal or NO pathway inhibition, suggesting eNOS-dependency. Inhibition of eNOS via L-NAME blunted these effects but revealed partial endothelial compensation in acetylcholine responses. Cellular assays confirmed increased intracellular NO and reduced superoxide production, indicating redox balance restoration. Together, these findings underscore a mechanistic interplay between phytotherapy and PBM, driven by eNOS activation and oxidative stress modulation, offering a promising non-pharmacological strategy to counteract endothelial dysfunction in hypertension.

Keywords: Photobiomodulation; Phytotherapy; Hypertension; Nitric Oxide; Endothelial dysfunction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismo de ação dos fármacos na via de vasodilatação induzida pelo óxido nítrico.

Figura 2 – Irradiação do LASER vermelho em anéis aórticos isolados em miógrafo.

Figura 3 – Linha do tempo esquematizando os procedimentos realizados *in vivo*.

Figura 4 – Irradiação da luz sob a cauda dos animais para avaliação dos efeitos do LASER sozinho ou em conjunto com a associação de plantas.

Figura 5 – Esquema representativo dos procedimentos realizados em microvasos de camundongos.

Figura 6 – Relaxamento induzido por LASER (660 nm) em aortas isoladas de ratos tratados com *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* em diferentes dosagens.

Figura 7 – Relaxamento induzido por LASER (660 nm) em aortas isoladas de ratos previamente tratados com *Panax ginseng* e *Angelica keiskei*, na presença de alguns inibidores para investigação do mecanismo de ação.

Figura 8 – Análise da Pressão Arterial ao longo do tempo sob diferentes tratamentos em animais hipertensos modelo 2 Rins, 1 Clipe.

Figura 9 – Análise dos índices de hipertrofia renal e hipertrofia cardíaca sob diferentes tratamentos em animais hipertensos modelo 2 rins, 1 clipe e o grupo sham.

Figura 10 – Análise da função endotelial por reatividade vascular via acetilcolina em animais controle (2R1C) vs tratados com LASER (2R1C).

Figura 11 – Análise da função endotelial por reatividade vascular via nitroprussiato de sódio em animais controle (2R1C) vs tratados com LASER (2R1C).

Figura 12 – Análise da função endotelial por reatividade vascular via acetilcolina em animais controle (2R1C) vs tratados com Pg e Ak (2R1C).

Figura 13 – Análise da função endotelial por reatividade vascular via nitroprussiato de sódio em animais controle (2R1C) vs tratados com Pg e Ak (2R1C).

Figura 14 – Análise da função endotelial por reatividade vascular via acetilcolina em animais controle (2R1C) vs tratados com LASER + Pg e Ak (2R1C).

Figura 15 – Análise da função endotelial por reatividade vascular via nitroprussiato de sódio em animais controle (2R1C) vs tratados com LASER + Pg e Ak (2R1C).

Figura 16 – Relaxamento induzido por FBM em aortas isoladas de ratos tratados com L-NAME.

Figura 17 – Estudo da participação de fitoterápicos no relaxamento de vasos mesentéricos isolados de camundongos induzidos por FIV (Vasodilatação Induzida por Fluxo).

Figura 18 – Estudo da participação de fitoterápicos no relaxamento de vasos mesentéricos isolados de camundongos induzidos por FIV (Vasodilatação Induzida por Fluxo) em condições de pressão regular e alta.

Figura 19 – Estudo da participação de fitoterápicos no relaxamento de vasos mesentéricos isolados de camundongos induzidos por LASER, submetidos a pressão regular e alta.

Figura 20 – Investigação do mecanismo de vasodilatação induzido por LASER a partir da participação de fitoterápicos incubados em vasos mesentéricos isolados.

Figura 21 – Estudo da viabilidade celular utilizando o composto MTT.

Figura 22 – Análise da produção de óxido nítrico em células endoteliais da veia umbilical humanas (Huvec).

Figura 23 – Análise da produção de espécies reativas de oxigênio via sonda Lucigenina.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Divisão dos grupos e seus respectivos tratamentos

xx

LISTA DE ABREVIATURAS

min	minuto(s)
mg	miligrama(s)
mL	mililitro(s)
μ L	microlitro(s)
nm	nanômetro(s)
mmHg	milímetros de mercúrio
°C	graus Celsius
g	grama(s)
h	hora(s)
μ M	micromolar
%	porcentagem
Δ	variação/diferença
EPM	Erro Padrão da Média

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

COX-1/COX-2 – Ciclooxygenase $\frac{1}{2}$

DAF-2DA – Diacetato de Diaminodifluorofluoresceína

DAF-2T – Produto Fluorescente da reação do NO com DAF-2DA

DMSO – Dimetilsulfóxido

eNOS – Óxido Nítrico Sintase endotelial (*endothelial Nitric Oxide Synthase*)

FBM - Fotobiomodulação

FIV – Vasodilatação induzida por fluxo (Flow inducing vasodilation)

GMPc – Guanosina Monofosfato Cíclico

GTP – Trifosfato de Guanina

HUVEC – Células endoteliais de veia umbilical humana (*Human umbilical vein endothelial cells*)

LLLT – Terapia com LASER de Baixa Intensidade (*Low-Level Laser Therapy*)

L-NAME - N^G-nitro-L-arginina metil éster

MTT - 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NO – Óxido Nítrico

ODQ - 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona

PBM – Fotobiomodulação (do inglês, *Photobiomodulation*)

PIPGCF – Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas

PKG – Proteína Quinase G

PPAR- γ – Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma Gama ROS

– Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

RS-NO – S-nitrosotióis

sGC – Guanilato Ciclase Solúvel (*soluble Guanylate Cyclase*)

SUS – Sistema Único de Saúde

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

UIC – *University of Illinois at Chicago*

UNESP – Universidade Estadual Paulista

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μM	Micromolar (concentração)
μg	Micrograma
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
Δ	Delta (variação)
$\uparrow/\downarrow$	Aumento / Diminuição
$\rightarrow$	Indica consequência/resultados
$\approx$	Aproximadamente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA FISIOLOGIA VASCULAR	20
2.2 VASODILATAÇÃO MEDIADA POR ÓXIDO NÍTRICO: PAPEL DA ENOS	22
2.2.1 L-NAME (N^G-nitro-L-arginina metil éster)	24
2.2.2 Hidroxicobalamina	24
2.2.3 ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona)	25
2.3 ABORDAGENS FARMACOLÓGICAS PARA POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO DA LUZ NA VASCULATURA	26
2.4 PROPRIEDADES VASOPROTETORAS DE <i>Angelica keiskei</i> E <i>Panax ginseng</i>	27
2.5 RACIONAL DO USO DAS PLANTAS PARA POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO VASODILATADOR INDUZIDO PELA LUZ	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	34
4 HIPÓTESE	35
5 MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E APROVAÇÃO ÉTICA	36
5.2 PREPARAÇÃO E DOSAGEM DOS EXTRATOS VEGETAIS	36
5.3 PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO COM LASER EM ANEIS ISOLADOS	36
5.4 EXPERIMENTOS EM VASOS ISOLADOS COM INIBIDORES DE VIAS DE SINALIZAÇÃO	37
5.5 AVALIAÇÃO TERAPÊUTICA <i>in vivo</i> NO MODELO 2R1C	38
5.5.1 Medida da Pressão Arterial (método não invasivo)	38
5.5.2 Cirurgia da indução da Hipertensão Renovascular (2R1C)	38
5.5.3 Grupos experimentais aplicados nos modelos 2R1C e Sham	39
5.5.4 Parâmetros do LASER utilizado nos experimentos <i>in vivo</i>	40
5.5.5 Avaliações morfológicas	41
5.6 RESPOSTA VASCULAR À ACETILCOLINA E NITROPRUSSIATO DE SÓDIO APÓS TRATAMENTOS	41
5.7 MODELO CRÔNICO DE INIBIÇÃO DA ENOS	42
5.8 REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS ISOLADAS DE CAMUNDONGOS	43
5.9 EXPERIMENTOS <i>in vitro</i>	44
5.9.1 Ensaio de Citotoxicidade	44

5.9.2 Quantificação do NO intracelular em HUVEC	45
5.9.3 Quantificação de O₂⁻ em HUVEC	45
5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1 EFEITO DOSE-DEPENDENTE DA ASSOCIAÇÃO DE <i>Angelica keiskei</i> E <i>Panax ginseng</i> NA VASODILATAÇÃO INDUZIDA POR LASER	47
6.2 ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA ENOS SOBRE A POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO VASODILATADOR INDUZIDO POR LASER	48
6.3 AVALIAÇÃO TERAPÊUTICA <i>in vivo</i> NO MODELO 2R1C	50
6.3.1 Efeito sobre a Pressão Arterial	50
6.3.2 Índices de hipertrofia renal e cardíaca	52
6.4 RESPOSTA VASODILATADORA À ACETILCOLINA E NITROPRUSSIATO DE SÓDIO APÓS TRATAMENTOS	54
6.5 INFLUÊNCIA DA <i>Angelica keiskei</i> e <i>Panax ginseng</i> NA RESPOSTA VASODILATADORA DO LASER E ACETICOLINA EM AORTA DE RATOS DO MODELO L-NAME	60
6.6 ESTUDOS EM MICROVASOS MESENTÉRICOS: EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE PLANTAS SOB DIFERENTES GRADIENTES DE FLUXO	62
6.7 ESTUDOS <i>in vitro</i> EM CÉLULAS ENDOTELIAIS	65
6.8 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	68
7 CONCLUSÃO	70
8 REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE A – Artigo: Enhancement of laser-induced vasodilation by medicinal plants: the eNOS-dependent and antioxidant actions of <i>Panax ginseng</i> and <i>Angelica keiskei</i>	79
APÊNDICE B – Artigo: Modulation of endothelial function by <i>Panax ginseng</i> and <i>Angelica keiskei</i> in experimental hypertension	80

1 INTRODUÇÃO

O endotélio vascular exerce papel central na regulação do tônus vascular, da perfusão tecidual e da homeostase cardiovascular. Entre os diversos mediadores liberados pelas células endoteliais, o óxido nítrico (NO) destaca-se por sua potente ação vasodilatadora, além de exercer efeitos anti-inflamatórios, antiproliferativos e antitrombóticos (Furchgott and Zawadzki, 1980; Celermajer *et al.*, 1994; Stamler, Lamas e Fang, 2001). A redução da biodisponibilidade de NO é uma característica marcante da disfunção endotelial, condição comumente observada em diferentes estados patológicos e associada ao aumento do estresse oxidativo, da reatividade vascular e da resistência periférica (Hricisák *et al.*, 2024).

A investigação de estratégias capazes de preservar ou restaurar a função endotelial representa um campo relevante da farmacologia cardiovascular, com ênfase em intervenções que atuem sobre a via do NO e o equilíbrio redox. Nesse cenário, a fotobiomodulação (FBM ou PBM, do inglês *Photobiomodulation*) utilizando luz vermelha (660 nm), tem emergido como uma abordagem terapêutica não invasiva, capaz de induzir vasodilatação por mecanismos dependentes da liberação de NO, ativação mitocondrial e modulação de espécies reativas de oxigênio (Oishi *et al.*, 2017; Keszler *et al.*, 2018; Hamblin, 2018; Buzinari *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2021). No entanto, sua eficácia pode ser limitada em contextos de disfunção endotelial, o que justifica a busca por agentes capazes de potencializar seus efeitos.

Dentre as alternativas investigadas, compostos naturais com propriedades vasoprotetoras torna-se uma opção ideal, especialmente aqueles derivados de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas por suas ações antioxidantes e anti-inflamatórias. *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* destacam-se por conter ginsenosídeos e chalconas, compostos capazes de estimular a produção de NO, reduzir espécies reativas de oxigênio e promover a integridade endotelial (Matsuura *et al.*, 2001; Yasuda *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2019; Mirossay, Varinská e Mojžiš, 2017; Gao *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2024; Nong *et al.*, 2024). O potencial de associação entre essas plantas e a fotobiomodulação ainda não foi explorado, especialmente no contexto da reatividade vascular, portanto, este trabalho nos traz um estudo inédito da associação de plantas com a fotobiomodulação.

Com o objetivo de investigar essa interação, a presente tese utilizou ratos

normotensos, bem como hipertensos através do modelo de hipertensão renovascular, cujo é um modelo experimental de disfunção endotelial surgido a partir do protocolo 2 rins, 1 clipe (2R1C) em ratos Wistar. Este modelo é caracterizado por inflamação sistêmica, estresse oxidativo aumentado e redução da vasodilatação dependente de endotélio, sendo amplamente empregado em estudos pré-clínicos e dando embasamento para estudos translacionais na farmacologia vascular (da Costa *et al.*, 2012).

Assim, foram avaliados os efeitos da combinação de *P. ginseng* e *A. keiskei* sobre a vasodilatação induzida por PBM, utilizando testes de reatividade vascular em aorta e artérias mesentéricas, além de ensaios *in vitro* com células endoteliais humanas (HUVECs) para análise de produção de NO, atividade antioxidante e viabilidade celular. A investigação também incluiu o uso de inibidores farmacológicos e modelo de inibição crônica da eNOS (via L-NAME), com o intuito de elucidar os mecanismos envolvidos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA FISIOLOGIA VASCULAR

A luz é uma forma de radiação eletromagnética visível ao olho humano, com comprimentos de onda aproximados da faixa de 380 e 750 nanômetros (Halliday *et al.*, 2013). No entanto, a chamada luz não visível também desempenha papéis biológicos importantes. A radiação ultravioleta (UV), com comprimento de onda entre aproximadamente 100 e 400 nm, é capaz de induzir efeitos como a síntese de vitamina D na pele, embora também possa causar danos ao DNA e mutações celulares (Diffey, 2002). Por outro lado, a radiação infravermelha (IV), que se estende além do espectro visível (de cerca de 750 nm até 1 mm) e está relacionada à geração de calor, é amplamente utilizada em terapias físicas e fotobiomodulação, sobretudo na faixa do infravermelho próximo (NIR), que penetra profundamente nos tecidos e interage com estruturas celulares como a mitocôndria (Karu, 1999; Hamblin, 2017).

Em linhas gerais, a luz possui comportamento dual: ora como onda, ora como partícula (fóton); sendo fundamental para a regulação de processos biológicos como a visão e a fotossíntese (Pedrotti *et al.*, 2017). Ao interagir com a matéria, a luz expõe suas propriedades, podendo ser absorvida, refletida, refratada ou espalhada (Hecht, 2016).

Nos tecidos humanos, essas interações ópticas variam conforme alguns parâmetros, como o comprimento de onda, potência, irradiância, além das características intrínsecas do tecido biológico, que influenciará na profundidade de penetração e os efeitos fisiológicos resultantes (Jacques, 2013). Essa versatilidade de propriedades e parâmetros abriu caminho para aplicações clínicas, como a fototerapia, cirurgia a laser e, mais recentemente, a fotobiomodulação (Welch e van Gemert, 2011; Tuchin, 2015).

A chamada terapia com LASER de baixa intensidade (*Low-Level Laser Therapy* – LLLT), ou simplesmente fotobiomodulação, surgiu como uma alternativa terapêutica não invasiva, indolor e de baixo custo. Desde 1971, ela vem sendo utilizada em diversos contextos clínicos, com início na cicatrização de feridas e, sendo abordada em diversos trabalhos no contexto de doenças dermatológicas como vitiligo, psoríase e acne (Erceg *et al.*, 2013; Byun *et al.*, 2015). A nomenclatura mais recente, “fotobiomodulação” ou “terapia de fotobiomodulação” (sob a sigla FBM, ou TFBM), foi

criada em uma convenção nos Estados Unidos, buscando englobar tanto o uso de LASER quanto de aparelhos a base de LEDs (Anders, Lanzaforme e Arany, 2015). Portanto, é encontrado na literatura trabalhos que usam as duas nomenclaturas (cujas abreviações são LLLT ou PBM, respectivamente).

Os efeitos vasculares da luz começaram a ser explorados experimentalmente em 1955, quando Furchgott e colaboradores observaram que a luz, em determinadas intensidades, podia induzir o relaxamento de vasos sanguíneos em miógrafo (Furchgott *et al.*, 1955). Esses achados inauguraram o conceito de fotorrelaxamento vascular, posteriormente ampliado por outros estudos que confirmaram o efeito vasodilatador de diferentes comprimentos de onda em músculo liso vascular (Furchgott *et al.*, 1961; Matsunaga *et al.*, 1989; Plass *et al.*, 2012; Oishi *et al.*, 2017; Buzinari *et al.*, 2020; Moraes *et al.*, 2022).

Estudos recentes reforçam que a luz vermelha, em especial na faixa de 660 nm, induz vasodilatação por mecanismos como a fotólise de RS-nitrosotíóis, com consequente liberação de óxido nítrico (NO), um potente modulador do tônus vascular (Keszler *et al.*, 2018; Moraes *et al.*, 2022; Buzinari *et al.*, 2022). Também já foi demonstrado que a aplicação aguda de LASER vermelho (660 nm) na região abdominal de ratos com hipertensão renovascular (modelo 2 rins, 1 clip [2R1C]) provocou queda significativa da pressão arterial ($\Delta \sim 24,5$ mmHg), com efeito duradouro de cerca de 50 minutos (Oishi *et al.*, 2017; Moraes *et al.*, 2020).

Adicionalmente, foi visto que a aplicação crônica de LASER vermelho, duas vezes por semana, foi capaz de normalizar a pressão arterial em 64% dos animais hipertensos tratados, também sob o mesmo modelo de hipertensão renovascular (2R1C) (Schiavon *et al.*, 2023). O modelo 2R1C é caracterizado por hipertensão severa, inflamação sistêmica elevada e marcada disfunção endotelial (Boonla *et al.*, 2014), sendo uma escolha excelente para estudos de fármacos e intervenções não farmacológicas em tecidos vasculares.

Paralelamente, outros estudos reforçam os efeitos anti-inflamatórios da luz vermelha. De Lima *et al.* (2013) mostraram que a irradiação com LASER vermelho aumentou a expressão de PPAR- γ em lavado bronco-alveolar de ratos. Já Lim *et al.* (2013) demonstraram que, em cultura de fibroblastos humanos, o LASER (635 nm) reduziu a produção de Prostaglandina (*PGE2*) e a expressão das enzimas ciclooxigenase-1 e ciclooxigenase-2 (COX-1 e COX-2, respectivamente). Assim, o espectro vermelho parece atuar simultaneamente em vias inflamatórias e endoteliais.

Além dos efeitos locais diretos sobre a parede vascular, a fotobiomodulação desencadeia respostas intracelulares a partir da ativação da citocromo c oxidase, uma enzima mitocondrial que atua como fotorreceptor primário para a luz vermelha e infravermelha (Pastore *et al.*, 2000; Karu, 2010; Chen *et al.*, 2011). A energia absorvida promove alterações no potencial mitocondrial e regula a produção de ATP, espécies reativas de oxigênio (ROS), cálcio intracelular, bem como a formação de óxido nítrico (Ferraresi *et al.*, 2015; Freire e Hamblin, 2016; Hamblin, 2017; Quirk e Whelan, 2020).

Esses eventos iniciais ativam uma cascata de fatores de transcrição - como NF- κ B, Nrf2 e AP-1 – *up-regulating* a expressão de genes envolvidos em proliferação celular, reparo tecidual e resposta anti-inflamatória (Eells *et al.*, 2003; Arany *et al.*, 2014; Ginani *et al.*, 2015). Entre os efeitos documentados estão: o aumento da atividade mitocondrial (Karu, 2010), alteração na expressão gênica (Zhang *et al.*, 2003; Byrnes *et al.*, 2005), modulação inflamatória (Hamblin, 2017) e promoção da regeneração vascular e tecidual (Bai *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2021).

Portanto, a luz, mais do que um estímulo externo, se configura como uma ferramenta reguladora da fisiologia vascular, com efeitos dependentes do comprimento de onda, dose e contexto patológico, abrindo novas perspectivas para o tratamento de doenças cardiovasculares ou que utilizam vias relacionadas ao sistema vascular. E como visto, dentre os mecanismos moleculares envolvidos na resposta vascular à fotobiomodulação, destaca-se de forma central a via do óxido nítrico mediada pela eNOS, cuja atuação é fundamental para a regulação do tônus vascular, tema que será desenvolvido com mais detalhes a seguir.

2.2 VASODILATAÇÃO MEDIADA POR ÓXIDO NÍTRICO: PAPEL DA ENOS

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa produzida endogenamente e possui papel crucial de sinalização na fisiologia vascular, pois é amplamente reconhecido como o principal mediador da vasodilatação endotelial. Sendo produzido em resposta a estímulos físicos e químicos, este mediador atua sobre o músculo liso vascular promovendo relaxamento, redução do tônus vascular e, como resultado, diminuição da pressão arterial. Além de sua função vasodilatadora, o NO também exerce

ações anti-trombóticas, anti-proliferativas e anti-inflamatórias, exercendo papel central na manutenção da homeostase endotelial (Ignarro *et al.*, 1987; Moncada, Palmer e Higgs, 1991).

O óxido nítrico é produzido de diversas formas, no endotélio o NO é formado principalmente pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, do inglês *endotelial Nitric Oxide Sintetase*, ou NOS3), a qual é uma isoforma constitutivamente expressa da família das NOS, um conjunto de enzimas responsáveis pela produção deste mediador, que também inclui a isoforma neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS), também encontradas na literatura como NOS1 e NOS2, respectivamente. A eNOS está localizada preferencialmente em caveolas da membrana plasmática de células endoteliais, onde se associa à caveolina-1, uma proteína que exerce efeito inibitório basal sobre a atividade da enzima (Garcia-Cardena *et al.*, 1996).

A ativação da eNOS ocorre majoritariamente por meio de estímulos mecânicos, como por exemplo, o aumento do fluxo sanguíneo (fenômeno denominado de *shear stress*), e também pela atividade de agonistas como acetilcolina, bradicinina e histamina, cujos mecanismos de ação envolvem a fosforilação da eNOS e/ou elevação do cálcio intracelular e ativação da calmodulina, deslocando a caveolina-1 e permitindo a atividade catalítica da enzima, promovendo a formação de óxido nítrico (Dudzinski e Michel, 2007).

No processo catalítico, a eNOS converte L-arginina em L-citrulina, com a produção concomitante de NO. Vale ressaltar que esta reação depende que a enzima esteja acoplada a diversos cofatores e coenzimas, citando como exemplo a tetraidrobiopterina (BH_4), NADPH, FAD, FMN e próprio oxigênio molecular (Förstermann e Sessa, 2012). A integridade desse sistema enzimático é essencial para a produção de NO funcional, visto que em situações de deficiência de BH_4 ou estresse oxidativo, a eNOS pode se "desacoplar", produzindo espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-) ao invés de NO, contribuindo para a vasoconstrição e, a médio prazo, a disfunção endotelial (Landmesser *et al.*, 2003).

Uma vez produzido, o NO difunde-se para as células do músculo liso adjacente, onde se liga ao grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). A ativação da GCs leva ao aumento da conversão de Guanosina Trifosfato (GTP) em Guanosina monofosfato cíclica (GMP cíclico ou GMPc), que atua como segundo mensageiro para ativar a proteína quinase G (PKG). A PKG promove a abertura de canais de potássio, redução do cálcio intracelular e desfosforilação das cadeias leves de

miosina, resultando em relaxamento do músculo liso vascular e vasodilatação (Bryan, Bian e Murad, 2009).

Para o estudo experimental da via vasodilatadora mediada por NO, diferentes fármacos inibidores da produção ou sequestrantes de óxido nítrico podem ser utilizados como ferramentas farmacológicas, permitindo a caracterização do papel específico de cada componente da cascata de sinalização, como descrito abaixo e também representado na figura 1.

2.2.1 L-NAME (N^G-nitro-L-arginina metil éster)

É um inibidor competitivo da eNOS, ao mimetizar a estrutura da L-arginina e ocupar o sítio catalítico da enzima. Seu uso permite demonstrar se o efeito vasodilatador observado depende da produção endotelial de NO. A supressão da resposta em presença de L-NAME é indicativa de participação direta da eNOS na resposta (Rees *et al.*, 1995). Além disto, vale explorar o efeito deste fármaco *in vivo*, visto que quando administrado de forma crônica na água de beber em concentração de 750 mg/L, o L-NAME é capaz de promover inibição sustentada da eNOS, levando à redução dos níveis de NO biodisponível no endotélio vascular. Como consequência, observa-se também a diminuição dos estoques de S-nitrosotióis (RS-NO), que são formados pela reação do NO com grupos sulfidril de cisteína presentes em proteínas ou em moléculas como a glutathione, dando origem a compostos como a S-nitrosoglutathione (GSNO). Tais compostos funcionam como reservatórios estáveis de NO e exercem papel relevante na sinalização redox e na modulação de diversas funções celulares. A inibição da eNOS por L-NAME reduz a disponibilidade de NO para formação desses derivados, resultando em menor S-nitrosilação de proteínas-alvo e potencial comprometimento de mecanismos vaso-protetores mediados por essa modificação pós-traducional (Rees *et al.*, 1990; Gow *et al.*, 2004; Tsikas, 2005; Moraes *et al.*, 2022).

2.2.2 Hidroxycobalamina

É uma molécula sequestradora-específica de NO, cuja atividade é capaz de neutralizar o NO livre no meio extracelular. Diferentemente do L-NAME, a hidroxycobalamina não interfere na produção de óxido nítrico, mas impede que este atue em suas células e moléculas-alvo. Dessa forma, permite a avaliação da participação do

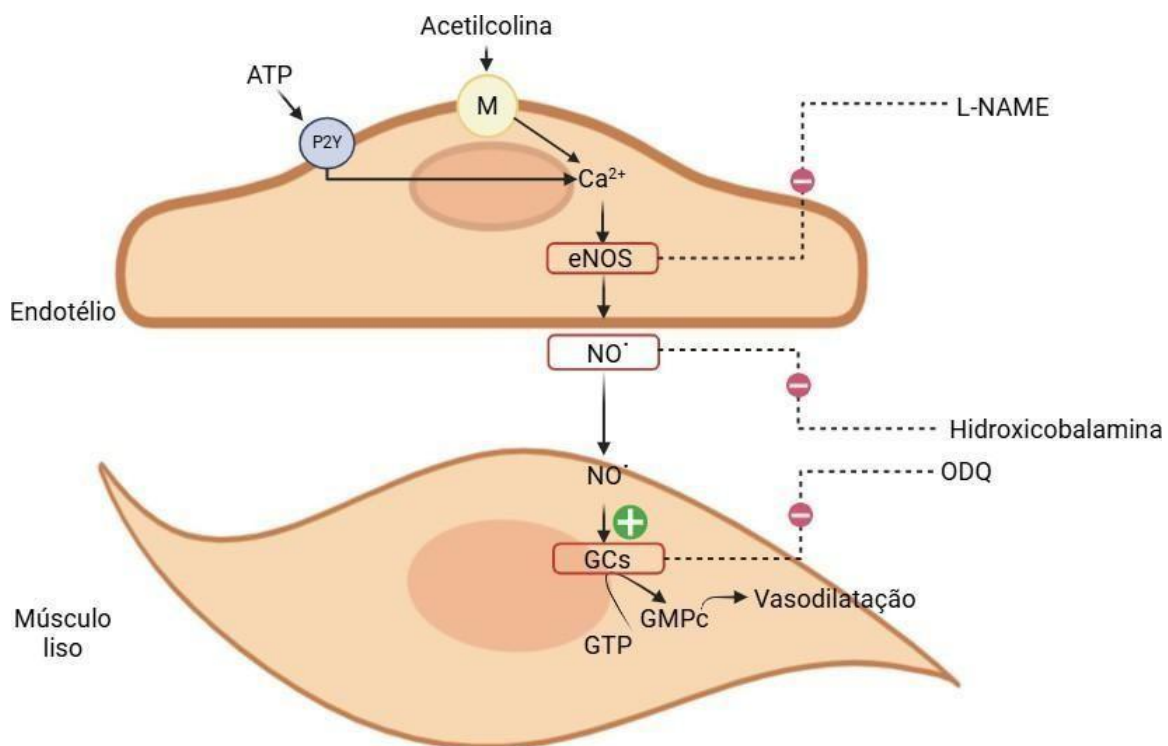
NO bioativo na resposta vasodilatadora. A perda do efeito na presença de hidroxico-balamina reforça que o NO está envolvido como molécula efetora do processo vasodilatador (Feelisch *et al.*, 1995).

2.2.3 ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona)

Trata-se de um inibidor seletivo da guanilato ciclase solúvel (GCs) e sua função é de impedir a conversão de GTP em GMPc, a partir do bloqueio dessa enzima pelo óxido nítrico ao oxidar o grupo heme essencial para sua atividade (Garthwaite *et al.*, 1995).

Seu uso permite testar se a resposta ao NO é mediada pela ativação de GCs e formação de GMPc. A ausência de vasodilatação em presença de ODQ sugere que a via de sinalização é dependente de GMPc (Garthwaite *et al.*, 1995).

Figura 1 – Mecanismo de ação dos fármacos na via de vasodilatação induzida pelo óxido nítrico.



A figura mostra a utilização dos inibidores L-NAME e ODQ, e o sequestrador de óxido nítrico hidroxico-balamina e suas respectivas ações no mecanismo de vasodilatação induzido pelo óxido nítrico. Adaptado de Félétou e Vanhoutte, 2000, recriado no biorender.com.

Essas ferramentas são particularmente úteis em protocolos de reatividade vascular *in vitro* (como em anéis de aorta ou artérias mesentéricas), bem como em modelos *in vivo* ou experimentos celulares, contribuindo para a caracterização mecânica precisa dos efeitos de fármacos, plantas medicinais ou estímulos físicos como a fotobiomodulação.

2.3 ABORDAGENS FARMACOLÓGICAS PARA POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO DA LUZ NA VASCULATURA

A fotobiomodulação tem emergido como uma estratégia terapêutica promissora para doenças cardiovasculares, especialmente por seus efeitos positivos sobre o endotélio vascular, bioenergética mitocondrial, inflamação e estresse oxidativo (Braga *et al.*, 2024; Campos-Rodríguez *et al.*, 2024; Ma *et al.*, 2025). Embora sua aplicação isolada já resulte em melhorias na vasodilatação e na perfusão tecidual, evidências crescentes sugerem que a associação com agentes farmacológicos pode amplificar significativamente seus efeitos, superando limitações relacionadas à penetração da luz e à variabilidade interindividual de resposta.

A FBM, além da liberação de óxido nítrico, induz transitoriamente a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), fundamentais como sinalizadores intracelulares (Migliario *et al.*, 2018). A associação da FBM com antioxidantes, seja de origem natural ou sintética, tem como objetivo mitigar esse aumento transitório, favorecendo o ambiente celular para regeneração e vasodilatação.

Há algumas estratégias farmacológicas que podem potencializar o efeito da luz em contexto vascular, como já observado em estudos anteriores do laboratório. O óxido nítrico (NO) liberado durante a FBM ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), promovendo a formação de GMPc, mensageiro secundário fundamental para a vasodilatação. O aumento do GMPc intracelular resulta na ativação da PKG, que reduz o tônus da musculatura lisa vascular.

Para ampliar esse efeito, duas estratégias farmacológicas são possíveis:

- Inibir a degradação do GMPc via fosfodiesterases (PDEs), como faz o sildenafil (Moraes *et al.*, 2022);
- Bloquear sua extrusão celular via transportadores da família ABC, como o MRP4, inibido por compostos como o MK-571 (Moraes *et al.*, 2022).

Ambas as abordagens foram testadas em modelos de anéis de aorta isolados, onde a adição desses fármacos à FBM aumentou significativamente a resposta vasodilatadora. Esse achado é particularmente promissor para pacientes com disfunção endotelial grave, em que a resposta ao NO é reduzida.

Além disso, o aumento de GMPc também atua na ativação do fator Nrf2, promovendo uma resposta antioxidante adicional (Astort *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017), o que adiciona uma camada de benefício ao efeito hemodinâmico primário.

Além das abordagens farmacológicas clássicas, compostos naturais derivados de plantas medicinais como *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* possuem efeitos sinérgicos com a fotobiomodulação, particularmente por atuarem sobre vias compartilhadas. Ambas as espécies apresentam significativa atividade antioxidante, contribuindo para a redução do estresse oxidativo e para a preservação da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO).

Os ginsenosídeos presentes no *P. ginseng* ativam a via PI3K/Akt, promovendo a fosforilação da eNOS e aumentando a produção de NO (Qin *et al.*, 2021), enquanto os chalconóides de *A. keiskei*, como a 4-hydroxyderricin, também estimulam a função endotelial e exercem efeito hipotensor em modelos animais (Ogawa *et al.*, 2007). Essas propriedades tornam essas plantas candidatas ideais para uso combinado com a FBM, contribuindo não apenas para a amplificação da vasodilatação, mas também para a modulação de vias redox e inflamatórias. Dessa forma, a utilização de fitoterápicos em sinergia com luz não apenas amplia a resposta vascular aguda, mas também representa uma estratégia promissora de integração terapêutica, conforme será discutido na próxima seção.

2.4 PROPRIEDADES VASOPROTETORAS DE *Angelica keiskei* e *Panax ginseng*

O uso de plantas medicinais é uma prática tão antiga quanto a própria história da humanidade. Existem registros em textos religiosos como a Bíblia, tanto no Antigo quanto no Novo Testamento, mencionando o uso de espécies como aloés, benjoim e mirra. Desde os primórdios da civilização, o ser humano já utilizava espécies vegetais para alimentação, cura e prevenção de doenças, iniciando assim uma das mais antigas formas de cuidado com a saúde (Silva, 2002).

Na Antiguidade, a medicina estava profundamente conectada à Botânica. Hipócrates, por exemplo, no "*Corpus Hippocraticum*", sistematizou o conhecimento de

sua época, indicando plantas para o tratamento de diversas enfermidades (Silva, 2002). Esse processo de evolução da "arte da cura" se deu de forma empírica, por meio de tentativas, erros e acertos. Povos primitivos foram os primeiros a identificar espécies e partes vegetais adequadas para uso medicinal, assim como a época ideal de colheita e o reconhecimento do habitat (Silva, 2002).

O Brasil, com sua biodiversidade exuberante, possui uma rica história no uso tradicional de plantas medicinais, prática baseada na experiência e passada oralmente de geração em geração (Bruning *et al.*, 2012). As plantas medicinais, segundo a Organização Mundial da Saúde (2002) e Amorozo (2002), são aquelas que possuem, em qualquer de suas partes, substâncias que podem ser utilizadas para tratamento ou prevenção de enfermidades. São amplamente empregadas na medicina alternativa e na cultura popular.

O avanço nas técnicas de isolamento de substâncias e de análise química permitiu identificar, com maior rapidez e precisão, os compostos ativos presentes nos extratos vegetais, marcando um novo momento para a indústria farmacêutica. Além disso, os compostos naturais apresentam vantagens, como:

- Fornecimento de fármacos importantes, muitas vezes de difícil obtenção por síntese química;
- Possibilidade de modificação estrutural, tornando-os menos tóxicos e mais eficazes;
- Uso como base para o desenvolvimento de novos medicamentos com propriedades terapêuticas semelhantes (Robbers, Speedie e Tyler, 1996).

Para grande parte da população, o uso de plantas medicinais é uma alternativa econômica e acessível aos medicamentos sintéticos, que são muitas vezes vistos como caros e agressivos ao organismo (OMS, 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define o medicamento fitoterápico como aquele obtido exclusivamente de matérias-primas vegetais, com qualidade constante e reproduzível, cuja eficácia e segurança devem estar embasadas em levantamentos etno-farmacológicos, literatura técnico-científica ou ensaios clínicos (Nicoletti, 2007).

Reconhecendo a importância estratégica desse setor, o Governo Federal instituiu, por meio de Decreto Presidencial em 17 de fevereiro de 2005, o Grupo de Trabalho Interministerial para desenvolver políticas públicas voltadas ao uso de plantas

medicinais e fitoterápicos (Brasil, 2006). Como resultado, surgiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), oficializada pelo Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006, com ações voltadas para:

- Ampliar o acesso da população aos medicamentos no Sistema Único de Saúde (SUS);
- Valorizar o conhecimento tradicional das comunidades;
- Promover o uso sustentável da biodiversidade brasileira;
- Incentivar a inclusão social, o fortalecimento da agricultura familiar e a geração de emprego e renda (Zuanazzi e Mayorga, 2010).

A base dessa política se ancora no aproveitamento do conhecimento empírico acumulado por gerações, utilizado como ponto de partida para pesquisas científicas, farmacológicas, fitoquímicas e agronômicas, permitindo economia de tempo e de recursos (Brasileiro, 2008).

Dito isto, o uso de plantas medicinais se torna uma estratégia de várias vantagens quando as aplicamos na clínica, especialmente com plantas como *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* utilizadas neste trabalho.

Panax ginseng C.A. Meyer, conhecido popularmente como ginseng vermelho coreano, é uma planta da família *Araliaceae*, amplamente utilizada na medicina tradicional asiática há mais de dois mil anos (Yun, 2001). Na farmacopéia oriental, o ginseng é considerado um tônico revitalizante, associado à longevidade, à melhoria da resistência física e mental e à restauração da homeostase. Suas raízes são as partes mais valorizadas, consumidas secas, moídas, em infusões, cápsulas ou extratos padronizados, como o ginseng vermelho coreano (KRG – Korean Red Ginseng) (Yun, 2001). Devido à sua ampla aceitação terapêutica, *P. ginseng* é atualmente um dos fitoterápicos mais estudados e comercializados no mundo (Baeg e So, 2013).

Farmacologicamente, o ginseng apresenta efeitos vasculares relevantes, especialmente atribuídos aos seus princípios ativos majoritários, os ginsenosídeos. Compostos como Rb1, Rg1, Re e Rg3 demonstram capacidade de estimular a produção de óxido nítrico (NO) via ativação da eNOS, atuando diretamente na vasodilatação e no relaxamento da musculatura lisa vascular (Gillis, 1997). Além disso, os ginsenosídeos também modulam canais de cálcio, receptores adrenérgicos e enzimas como a arginase, favorecendo o acoplamento da NOSe e a amplificação da via GMPc (Ahn *et al.*, 2013). Esses mecanismos compartilham alvos moleculares com a

fotobiomodulação, o que justifica o crescente interesse na associação entre PBM e ginseng para amplificação da resposta vasodilatadora.

O *Panax ginseng*, rico em ginsenosídeos como Rg1, Rb1, Re e frações enriquecidas em protopanaxatriol, estimula fortemente a síntese de NO e a ativação da eNOS em células endoteliais humanas (Gillis, 1997). Estudos com extratos e frações específicas mostraram que a ativação da via PI3K/Akt e AMPK é essencial para essa resposta, levando a aumento de NO e consequente relaxamento da musculatura lisa vascular (Bai *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2013). Modelos animais hipertensos confirmaram o efeito anti-hipertensivo, incluindo redução da pressão arterial e melhora da função vascular.

Complementando essa ação, estudos clássicos com ginsenosídeos puros (ex. Rb1 e Rg1) revelaram que o relaxamento vascular induzido por esses compostos em anéis arteriais e em tecidos como o corpo cavernoso de coelhos é mediado por NO, e pode ser bloqueado por inibidores de NOS como nitro-L-arginina, confirmando que o efeito vasodilatador é dependente de NO e GMPc (Ahn *et al.*, 2013). Além disso, extratos de ginseng vermelho coreano (KG-WE) mostraram inibição de arginase, favorecendo o acoplamento da NOSe, aumento da produção de NO e vasorelaxamento que é revertido por bloqueadores de sGC ou NOS (Shin *et al.*, 2013).

Angelica keiskei (Miq.) Koidz., popularmente conhecida como ashitaba (do japonês, “folha do amanhã”), é uma planta herbácea perene da família *Apiaceae*, nativa das regiões costeiras do Japão, especialmente das ilhas Izu (Baba *et al.*, 1998). Há séculos é utilizada na medicina tradicional japonesa e chinesa como alimento funcional e fitoterápico, sendo atribuídos a ela efeitos benéficos sobre a longevidade, o rejuvenescimento e a vitalidade. Suas folhas e talos são consumidos frescos, secos ou em infusão, além de integrarem preparações culinárias como tempurás, sucos verdes e chás medicinais (Imai e Imai, 2008; Bao, 2014; Su, 2014; Ku *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). A planta possui mais de 100 compostos, incluindo flavonoides, cumarinas, sesquiterpenos, triterpenos entre outros (Kil *et al.*, 2017).

Do ponto de vista farmacológico, *A. keiskei* destaca-se pela presença de chalconas bioativas, principalmente a 4-hydroxyderricin e a xanthoangelol, compostos com comprovadas ações antioxidantes (Qin *et al.* 2014; Guo *et al.* 2013), anti-inflamatórias (Lee *et al.* 2010; Chang *et al.* 2014) e anti-hipertensivas (Shimizu *et al.* 1999).

No ponto de vista da atividade anti-hipertensiva, *Angelica keiskei* contém chalconóides, como o 4-hydroxyderricin, que demonstraram efeitos hipotensores e

vasoativos em modelos animais de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Doses alimentares de 0,07 % desse composto durante 7 semanas suprimiram significativamente o aumento da pressão arterial sistólica, além de reduzirem os níveis de VLDL e ácidos graxos livres, sugerindo potencial terapêutico cardiovascular com ação vasodilatadora indireta e redução de estresse lipídico (Shimizu *et al.* 1999).

Embora os dados diretos sobre vasodilatação em anéis arteriais isolados ainda sejam escassos, esse perfil pode favorecer a função endotelial e melhorar a biodisponibilidade de NO, criando um ambiente propício à ação da fotobiomodulação.

2.5 RACIONAL DO USO DAS PLANTAS PARA POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO VASODILATADOR INDUZIDO PELA LUZ

A combinação de terapias naturais com tecnologias biomédicas tem ganhado destaque na busca por estratégias inovadoras para o tratamento de doenças cardiovasculares. Nesse cenário, a FBM desponta como uma técnica não invasiva capaz de induzir vasodilatação por meio da liberação de óxido nítrico (NO) e ativação da via do GMPc. Paralelamente, compostos de origem vegetal têm sido amplamente estudados por seus efeitos vasorrelaxantes, antioxidantes e anti-inflamatórios, como já descrito na seção anterior. A associação entre FBM e fitoterápicos oferece, portanto, um potencial sinérgico especialmente promissor. Entre as espécies vegetais com propriedades relevantes para essa interação, destacam-se *Angelica keiskei* e *Panax ginseng*.

Tanto o *Panax ginseng* quanto a *Angelica keiskei* possuem princípios ativos que atuam em vias similares às aquelas moduladas pela FBM. Tendo alguns principais mecanismos de interesse, como o aumento da biodisponibilidade de NO, pois ambas as plantas demonstraram, em modelos experimentais, a capacidade de estimular a expressão ou atividade da NOSe (óxido nítrico sintase endotelial), favorecendo a produção de NO e a vasodilatação, o que é um dos principais efeitos também induzidos pela luz, tanto via Citocromo C oxidase (CCO) quanto por fotodissociação de S-nitrosotióis.

Ambas as plantas possuem ação antioxidante complementar: Os ginsenosídeos do *Panax ginseng* e os chalconóides da *Angelica keiskei* promovem a ativação

da via Nrf2, aumentando as defesas antioxidantes endógenas e reduzindo a degradação de NO por ROS, o que potencializa a resposta vasodilatadora da FBM (Yadav *et al.*, 2020; Bahr *et al.*, 2024).

Alguns estudos indicam que extratos de *ginseng* podem inibir fosfodiesterases (PDEs) ou aumentar a sinalização downstream de GMPc, o que converge com as estratégias farmacológicas para potencializar a FBM descritas anteriormente (Mo-raes *et al.*, 2022).

Essa convergência de mecanismos cria um cenário favorável para a ação sinérgica: enquanto a FBM promove a liberação rápida de NO e ativa a guanilato ciclase, os fitocompostos agem na sustentação da via, prolongando ou intensificando o sinal vasodilatador.

A Ashibata, possui diversos flavonoides e chalconas como o 4-hidroxi-derivados de chalcona (4-HD), que demonstram efeitos relaxantes em artérias isoladas, provavelmente mediados por abertura de canais de K⁺ e aumento de NO. Em modelos animais, os extratos de *A. keiskei* melhoram a função endotelial, reduzem a pressão arterial e inibem a oxidação de LDL, um fator chave na disfunção vascular (Shimizu *et al.* 1999).

Panax ginseng é um dos fitoterápicos mais estudados no mundo. Seus principais princípios ativos, os ginsenosídeos, exercem efeitos diretos sobre a vasculatura, promovendo a liberação de NO, bem como bloqueio de canais de cálcio, modulação de receptores adrenérgicos e até influência na expressão gênica de enzimas antioxidantes (Ahn *et al.*, 2013). Em estudos *in vivo*, *P. ginseng* melhora a função vascular em modelos de hipertensão (Jovanovski *et al.*, 2020), diabetes (Jovanovski *et al.*, 2020) e isquemia-reperfusão (Chen *et al.*, 2022).

Ambas as plantas demonstram, portanto, efeitos hemodinâmicos desejáveis, especialmente em condições onde a resposta endógena ao NO está comprometida, exatamente os casos em que a PBM tende a apresentar maior variabilidade de resposta.

A justificativa para combinar PBM com extratos de *Angelica keiskei* ou *Panax ginseng* se apoia no conceito de sinergismo bioativo, em que compostos naturais amplificam os efeitos da luz por prolongamento da ação vasodilatadora (inibição de PDEs, redução de ROS); estímulo adicional à produção de NO (via NOSe e redução da inibição por radicais livres); e estabilização da função endotelial em cenários de disfunção, como hipertensão, aterosclerose e resistência vascular periférica elevada.

Além disso, essa combinação pode ser particularmente vantajosa em pacientes que apresentam contraindicação a vasodilatadores sintéticos, ou que respondem mal às monoterapias.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a potencialização do efeito vasodilatador induzido pelo LASER vermelho a partir do uso de extratos de plantas medicinais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Entender os mecanismos envolvidos na potencialização do efeito vasodilatador induzido pelo LASER vermelho a partir do uso de plantas medicinais;
- Avaliar os efeitos biológicos induzidos pela FBM por meio do LASER vermelho, das plantas e da associação das plantas com a FBM em modelo de hipertensão renovascular;
- Avaliação das respostas *in vitro* sobre a produção de óxido nítrico e atividade antioxidante em cultura de células isoladas HUVEC.

4 HIPÓTESE

A associação dos extratos de plantas medicinais promove sinergismo bioativo que amplifica a resposta vasodilatadora ao LASER vermelho, mediada por mecanismos antioxidantes e dependentes da via do NO.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E APROVAÇÃO ÉTICA

Sessenta Ratos Wistar machos (160–200 g) foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e mantidos no biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia e Exercício Físico do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF-UFSCar). Os animais foram mantidos em condições controladas de luz e temperatura, com livre acesso à ração e à água. Todos os protocolos experimentais seguiram as normas e políticas do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA-UFSCar).

Além disso, foram utilizados camundongos C57BL/6 (10–20 g), fornecidos pelo biotério da *University of Illinois at Chicago* (UIC). Esses animais também foram mantidos sob condições controladas de luz e temperatura, com livre acesso à ração e à água. Os protocolos experimentais seguiram as normas e diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais da *University of Illinois at Chicago*.

5.2 PREPARAÇÃO E DOSAGEM DOS EXTRATOS VEGETAIS

Para o protocolo de padronização da dose dos extratos, foram utilizadas diferentes doses da combinação 1:1 de *Angelica keiskei* e *Panax ginseng* (padronizada triplamente para conter 8% de chalconas, 10% de flavanonas e 0,9% dos ginsenósídeos Rb1, Rg1 e Rg3), administradas por via intraperitoneal de 12 a 16 horas antes do experimento. As doses variaram de 12,5 a 400 mg/kg, utilizando solução salina 0,9% como veículo.

5.3 PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO COM LASER EM ANEIS ISOLADOS

Os ratos foram tratados com diferentes doses da combinação de plantas e, após 12–16 horas, foram eutanasiados por decapitação. As aortas torácicas foram dissecadas e cortadas em anéis de 3 a 5 mm de comprimento, conforme descrito por Rodrigues (Rodrigues *et al.*, 2011), e mantidas em solução de Krebs (mM: NaCl 130, KCl 4,7, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 14,9, glicose 5,5 e CaCl₂ 1,6) a 37 °C, pH 7,4, continuamente borbulhada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os anéis foram montados entre dois ganchos metálicos em um miografo (Mulvany-Halpern, modelo 610,

DMT-USA, Marietta, GA), para estudo de tensão isométrica. O miógrafo estava conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab/8SP, ADInstruments, Austrália), posteriormente ligado a um computador.

Os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão basal de 1,5 g antes da irradiação com o LASER (Moraes *et al.*, 2022). A integridade endotelial foi avaliada pelo grau de relaxamento induzido por acetilcolina (1 $\mu\text{mol/L}$) após contração com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$). O anel era descartado caso o relaxamento com acetilcolina fosse inferior a 80% (Rodrigues *et al.*, 2010). Após o teste de integridade endotelial, uma nova pré-contratação com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$) foi realizada, seguida por uma única aplicação de LASER vermelho (660 nm), com dose de 5,6 Joules (200 mW por 56 segundos), em uma distância de 1 cm do spot (0,0586 cm^2) ao tecido, observando-se a porcentagem de vasodilatação induzida a partir do platô contrátil gerado pela fenilefrina.

Figura 2 – Irradiação do LASER vermelho em anéis aórticos isolados em miógrafo.

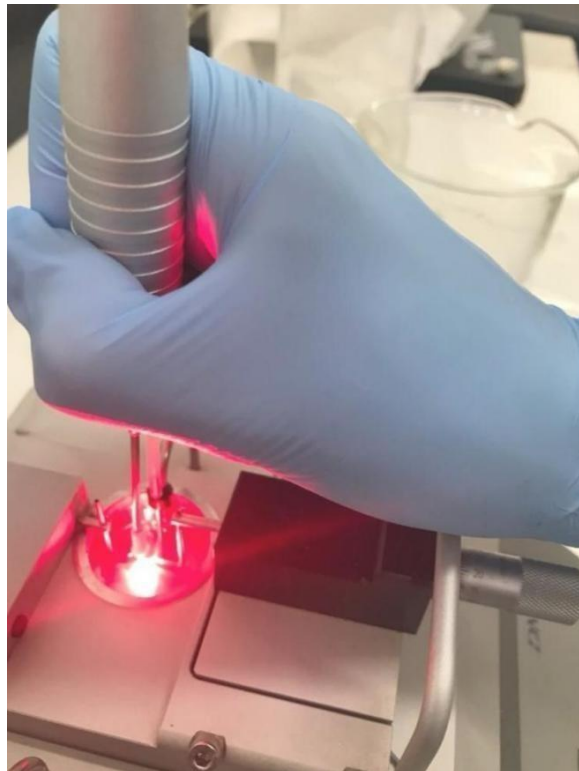


Imagem autoral

5.4 EXPERIMENTOS EM VASOS ISOLADOS COM INIBIDORES DE VIAS DE SINALIZAÇÃO

Em alguns anéis aórticos, o endotélio foi removido mecanicamente utilizando um gancho metálico fino para friccionar suavemente a superfície luminal. A remoção bem-sucedida foi confirmada pela ausência de vasorrelaxamento frente à acetilcolina (10 μ M). Para a inibição farmacológica, os seguintes agentes foram utilizados e incubados no banho de órgãos por 30 minutos antes da aplicação do LASER: L-NAME (N^G -Nitro-L-arginina metil éster, 100 μ M), para inibir a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS); ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona, 10 μ M), como inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs); hidroxocobalamina (100 μ M), como sequestrador do radical NO; e L-cisteína (1 mM), para quebrar os estoques de S-nitrosotiois. Após a incubação com os inibidores, todos os segmentos arteriais foram pré-contráídos com fenilefrina (1 μ M) até atingirem um platô estável antes da exposição ao LASER vermelho (660 nm). As alterações no tônus vascular foram registradas utilizando um sistema de miografia com fio.

5.5 AVALIAÇÃO TERAPÊUTICA *in vivo* NO MODELO 2R1C

5.5.1. Medida da Pressão Arterial (método não invasivo)

Para o protocolo *in vivo*, a pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida nos animais acordados pela técnica de pletismografia de cauda (NIBP System-ADInstruments), antes do procedimento cirúrgico de indução da hipertensão e seis semanas após este procedimento cirúrgico, para animais 2R1C. Foram utilizados os animais do grupo 2R1C que apresentaram PAS maior ou igual a 140 mmHg.

5.5.2. Cirurgia da indução da Hipertensão Renovascular (2R1C)

Para obtenção de ratos com hipertensão renal 2R1C, foi utilizada a técnica descrita por Goldblatt (1934) e adaptada por Shaffenburg (1959) para pequenos animais onde, a constrição parcial de uma artéria renal, com o rim contra-lateral íntegro, ocasiona um aumento da pressão arterial. Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (2,5 mg/kg) e depois submetidos a uma laparotomia para implante de um clipe de prata com abertura de 0,2 mm na artéria renal, como descrito previamente (Rodrigues *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2010). Os animais controles denominados sham-operados ou dois rins (2R) foram submetidos à operação, sem a implantação do clipe de prata na artéria renal.

5.5.3. Grupos experimentais aplicados nos modelos 2R1C e Sham

Após indução da hipertensão nos animais 2R1C, foi iniciado o protocolo de tratamento executado durante 21 dias. Os animais foram divididos em 8 grupos, como descrito no quadro abaixo:

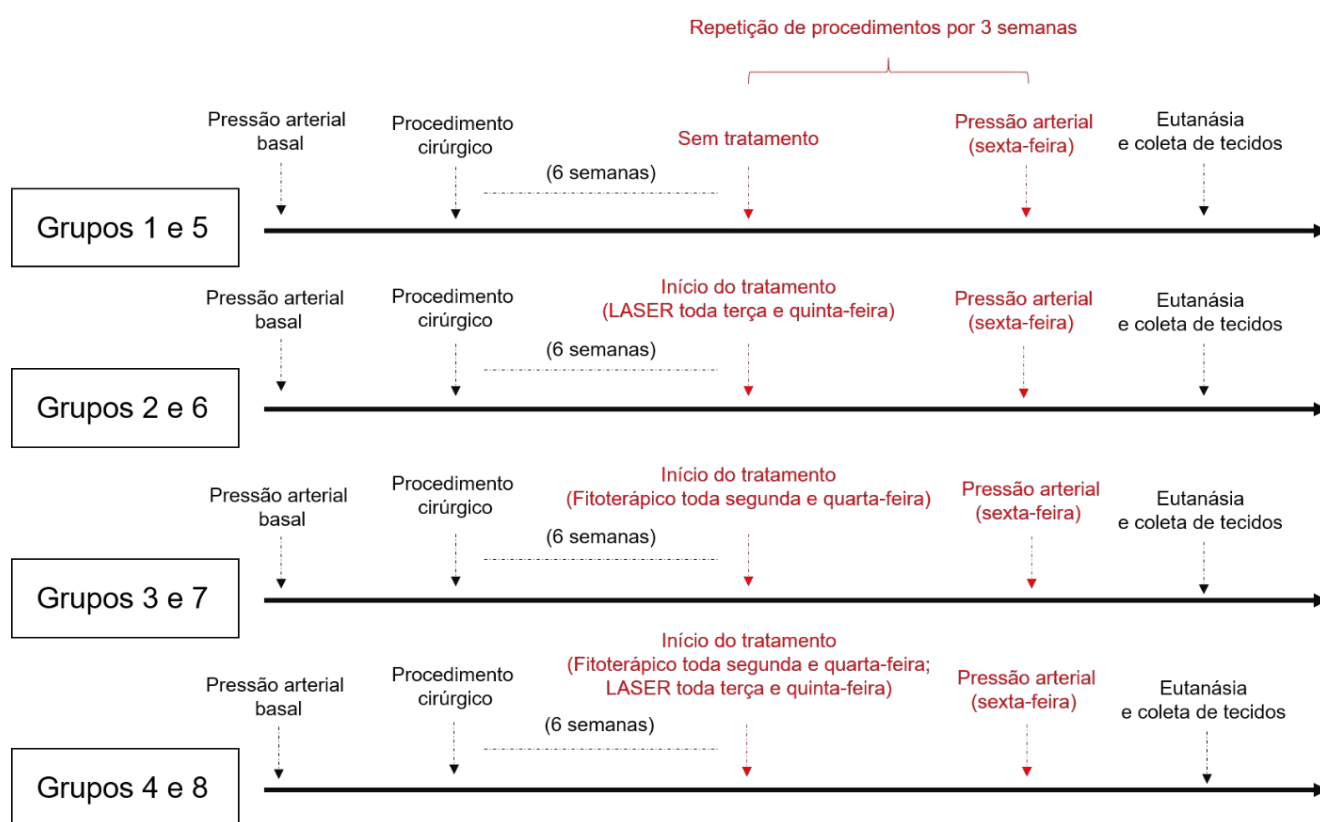
Grupo 1	Animais 2R1C (sem tratamento)
Grupo 2	Animais 2R1C (LASER 2x na semana)
Grupo 3	Animais 2R1C (Fitoterápicos 2x na semana)
Grupo 4	Animais 2R1C (Associação LASER + Fitoterápico, 2x na semana cada)
Grupo 5	Animais Sham (sem tratamento)
Grupo 6	Animais Sham (LASER 2x na semana)
Grupo 7	Animais Sham (Fitoterápicos 2x na semana)
Grupo 8	Animais Sham (Associação LASER + Fitoterápico, 2x na semana cada)

Tabela 1: Divisão dos grupos e seus respectivos tratamentos

No final de cada semana, foi avaliada a pressão arterial sistólica destes animais por pletismografia de cauda, conforme descrito na seção 5.5.1, a fim de acompanhar mudanças na pressão durante o tratamento de 21 dias.

Os animais dos grupos 3, 4, 7 e 8 receberam 50 mg/kg da associação de fitoterápicos via intraperitoneal durante as 3 semanas. Os dias de administração das plantas ocorreu em dias alternados ao dia da aplicação do LASER, como demonstrado na figura abaixo (figura 4).

Figura 3 – Linha do tempo esquematizando os procedimentos realizados *in vivo*



5.5.4 Parâmetros do LASER utilizado nos experimentos *in vivo*

Nos grupos 2, 4, 6 e 8, ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R1C) foram tratados com FBM por 3 semanas, utilizando aparelho LED cujos parâmetros de irradiação foram: comprimento de onda do vermelho (λ) = 660 nm: operação contínua; 56 s por ponto (3 pontos); tamanho do ponto = 0,0295 cm²; potência óptica média de 100 mW; energia de 5,6 J por ponto; irradiância de 3,40 W/cm²; fluência de 190 J/cm² por ponto. A aplicação foi feita na cauda dos animais, em 3 pontos diferentes simultaneamente, em contato com a pele, conforme demonstrado na figura 3.

Figura 4 – Irradiação da luz sob a cauda dos animais para avaliação dos efeitos do LASER sozinho ou em conjunto com a associação de plantas



Imagem autoral

5.5.5 Avaliações morfológicas

Após a eutanásia, as tíbias dos animais foram cuidadosamente dissecadas e removidas. O comprimento de cada tíbia foi mensurado com o auxílio de uma régua milimetrada, servindo como parâmetro de normalização para as análises subsequentes. Em seguida, os rins (direito e esquerdo) e o coração foram retirados, limpos de tecido conjuntivo e pesados em balança analítica.

A partir desses dados, foram calculados os índices de hipertrofia cardíaca e renal, expressos como a multiplicação da massa do órgão (em gramas) * 100, dividido pelo comprimento da tíbia (em milímetros). Essa abordagem permitiu uma avaliação comparativa da morfometria relativa dos órgãos entre os diferentes grupos experimentais, minimizando a influência do peso corporal total dos animais.

5.6 RESPOSTA VASCULAR À ACETILCOLINA E NITROPRUSSATO DE SÓDIO APÓS TRATAMENTOS

Os ratos foram eutanasiados por decapitação seis semanas após a cirurgia, e as aortas torácicas foram dissecadas e cortadas em anéis de 3-5 mm de comprimento como descrito previamente por Rodrigues (Rodrigues *et al.*, 2011), mantidas em solução de Krebs a 37 °C, pH 7.4, continuamente borbulhada com 95% de O₂ e 5% CO₂, montadas entre dois ganchos metálicos em um miógrafo (MulvanyHalpern, modelo 610 DMT-EUA, Marietta, GA), para estudo de tensão isométrica. O miógrafo é conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab/8SP, ADInstruments, Austrália) e este a um computador.

Os anéis da aorta foram submetidos a uma tensão de 1,5 g antes do início da curva concentração-efeito. A integridade endotelial foi avaliada pelo grau de relaxamento induzido por 1 µmol/L de acetilcolina após contração do anel aórtico com fenilefrina (0,1 µmol/L). O anel foi descartado se o relaxamento com acetilcolina fosse menor do que 80% em aortas de rato 2R (sham) e 60% em aortas de rato 2R1C (Rodrigues, 2010). Após o teste da integridade endotelial, foram aplicados os seguintes protocolos:

Protocolo 1: Em todos os grupos, após estabilização do anel no aparelho, houve a realização da curva concentração-efeito para acetilcolina (concentrações variando entre 10⁻⁹ a 10⁻⁴ µM).

Protocolo 2: Em todos os grupos, após estabilização do anel no aparelho, houve a realização da curva concentração-efeito para Nitroprussiato de sódio (10⁻¹⁰ a 10⁻⁵ µM).

5.7 MODELO CRÔNICO DE INIBIÇÃO DA ENOS (TRATAMENTO COM L-NAME)

Para avaliar o envolvimento da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no vasorrelaxamento induzido pelo LASER e seu possível aumento pelos extratos vegetais, foi estabelecido um modelo de inibição crônica do NO em doze ratos Wistar machos. Os animais receberam L-NAME (N[^]G[^]-Nitro-L-arginina metil éster) na água de beber por três semanas, a fim de esgotar os estoques endógenos de óxido nítrico (NO). Durante esse período, os ratos foram mantidos individualmente para possibilitar monitoramento preciso. A eficácia da inibição do NO foi confirmada por medidas da

pressão arterial sistólica por pletismografia de cauda não invasiva, sendo selecionados apenas os animais com valores sistólicos superiores a 140 mmHg para os testes de reatividade vascular.

Após a confirmação da hipertensão, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos ($n = 5\sim 6$ por grupo): um grupo não recebeu tratamento com extratos vegetais, enquanto o outro foi tratado por via intraperitoneal com a combinação de *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* na dose de 100 mg/kg, administrada de 12 a 16 horas antes da eutanásia. Após a eutanásia, a aorta torácica foi dissecada e cortada em anéis de 3 a 5 mm, montados em sistema de miografia com fio para registro da tensão isométrica.

Para a avaliação funcional, parte dos anéis foi pré-contraída com fenilefrina ($1\ \mu\text{M}$) e submetida à irradiação com LASER vermelho (660 nm), a fim de avaliar o vasorrelaxamento. Outro conjunto de anéis foi estimulado com acetilcolina ($10\ \mu\text{M}$) após pré-contração com fenilefrina, com o objetivo de investigar respostas endoteliais dependentes de acetilcolina.

5.8 REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE CAMUNDONGOS

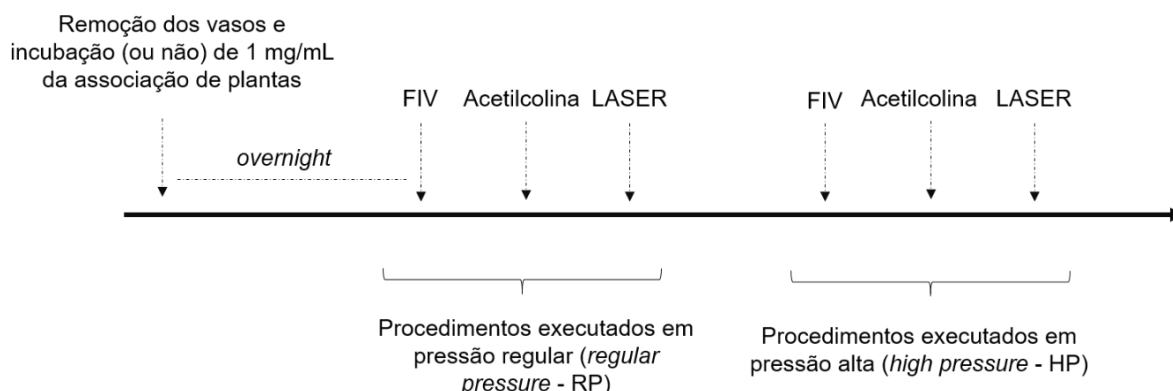
O leito mesentérico dos camundongos foi isolado e os anéis arteriais mesentéricos foram extraídos para reatividade vascular induzida pelo fluxo. Os vasos foram então inseridos em uma câmara de fluxo contendo solução de Krebs a $37\ ^\circ\text{C}$, pH 7,4, continuamente borbulhada com 95% de O_2 e 5% de CO_2 . Os vasos isolados foram submetidos a experimentos com variações de gradiente de fluxo/pressão e também à aplicação de acetilcolina e LASER em duas condições distintas: *regular pressure* e *high pressure*. Para esse protocolo, os vasos foram previamente tratados por 12 horas com a combinação de fitoterápicos e mantidos em incubadora celular com meio específico para células endoteliais (meio EBM). A figura abaixo (figura 5) ilustra o protocolo seguido.

Para a irradiação do LASER, foi utilizado o aparelho PHOTON LASE III® (DMC Equipamentos, São Carlos, Brasil) para irradiar segmentos isolados de vasos mesentéricos. A irradiação foi realizada a uma distância aproximada de 1 cm do tecido, com tempo de exposição de 15 segundos.

O LASER opera em modo contínuo com potência média de 100 mW e área do feixe de aproximadamente $0,04\ \text{cm}^2$. A energia total fornecida por amostra foi de

1,5 joules, correspondendo a uma densidade de energia teórica de 37,5 J/cm². Vale ressaltar que, devido à distância de 1 cm entre a fonte do laser e o tecido.

Figura 5 – Esquema representativo dos procedimentos realizados em microvasos de camundongos



Após a realização dos protocolos descritos acima, foram utilizados novos vasos pré-incubados com a associação de plantas para teste de vias a partir da vasodilatação induzida pelo LASER. Para tal experimento, foram utilizados a catalase (2.500 U/mL), L-NAME (100 µM) e Apamina (1 µM).

5.9 EXPERIMENTOS *in vitro*

5.9.1 Ensaio de Citotoxicidade

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método de análise colorimétrico 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT). As células HUVEC foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma concentração de 5x10⁴ células por poço e mantidas a 37 °C em uma estufa contendo 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram tratadas com a associação de *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* durante 1 hora, nas concentrações 0,01, 0,1, 1 e 10 mg/mL. Em seguida, 5 mg/mL de MTT foi adicionado, seguido de 4 horas de incubação em estufa. Após este tempo, foram adicionados 100 µL de dimetilsulfoxido (DMSO) e a placa foi posta no agitador de placas durante 10 minutos. A absorbância foi avaliada no comprimento de onda de 540 nm utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax GeminiXS, Molecular Devices). Este experimento foi executado em 3 placas, gerando 3 repetições

independentes em diferentes passagens celulares. Cada placa foi realizada a triplicata dos tratamentos ou do grupo controle.

5.9.2 Quantificação do NO intracelular em HUVEC

As células endoteliais foram plaqueadas em placas de 96 poços com concentração de 5×10^4 de células por poço, mantidas a 37°C em estufa de CO_2 a 5%. Os experimentos foram iniciados após 24 horas do plaqueamento. Neste protocolo, determinados poços foram previamente incubados com a associação de plantas (10 mg/mL) por período *overnight*. Parte destes poços receberam a incubação de L-NAME (100 μM) e outros receberam a incubação de CuSO_4 (5 μM) 30 minutos antes da incubação da sonda. Após este período, a detecção do NO intracelular foi obtida pela incubação com a sonda seletiva fluorescente diacetato diaminodifluorofluoresceína (DAF-2DA – 10 μM) que ao reagir com trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) (produto de oxidação do NO) produz o composto fluorescente DAF-2T (Nakatsubo *et al.*, 1998). A leitura foi realizada em fluorímetro SpectraMax GeminiXS (Molecular Devices) com onda de excitação e emissão: 485 nm e 538 nm, respectivamente, e o experimento foi executado em 3 placas, gerando 3 repetições independentes em diferentes passagens celulares. Cada placa foi realizada a triplicata dos tratamentos ou do grupo controle.

5.9.3 Quantificação de O_2^- em HUVEC

A detecção do radical superóxido (O_2^-) foi obtida pela utilização da sonda lucigenina e a leitura foi realizada em fluorímetro SpectraMax GeminiXS (Molecular Devices) com excitação de 455 nm e emissão de 505 nm. A lucigenina é uma sonda específica para detectar radical superóxido (O_2^-) por fontes enzimáticas e celulares a partir da xantina oxidase, citocromo, NADPH microssomal e NADPH oxidase. O radical superóxido reduz a lucigenina a seu radical cátion, que reage com um segundo radical O_2^- formando o dioxetano, uma molécula rica em energia, que ao decair, emite um fóton (Munzel *et al.*, 2002).

As células endoteliais foram plaqueadas em placas de 96 poços com concentração de 5×10^4 e foram mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO_2 . Os experimentos foram realizados após 24 horas. As células foram tratadas com concentrações de 10 e 100 mg/mL da associação de fitoterápicos. O estímulo da produção de ânion superóxido foi realizado utilizando LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), sendo que em determinados poços

houve a associação das plantas com o LPS para avaliar a diminuição das espécies reativas de oxigênio. Este experimento foi executado em 3 placas, gerando 3 repetições independentes em diferentes passagens celulares. Cada placa foi realizada a triplicata dos tratamentos ou do grupo controle.

5.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após a coleta dos dados, a análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 8.0.

Os dados foram analisados de forma apropriada por meio de ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls para determinar a significância das diferenças entre os grupos dentro de cada ensaio, em casos de 3 ou mais grupos envolvidos no experimento. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$) para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

Para casos de 2 grupos comparativos, foi realizado um teste t seguido de pós-teste de Tukey, adotando o nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EFEITO DOSE-DEPENDENTE DA ASSOCIAÇÃO DE *A. keiskei* e *P. ginseng* NA VASODILATAÇÃO INDUZIDA POR LASER

A associação entre estratégias farmacológicas e a fotobiomodulação representa uma abordagem terapêutica promissora, com aplicações potenciais em diversas áreas da medicina translacional. Estudo prévio, como Moraes *et al.* (2022), demonstrou que o acúmulo intracelular de GMP cíclico, seja pela prevenção de seu efluxo ou pela inibição de sua degradação, pode potencializar os efeitos da luz nos vasos sanguíneos, aumentando assim sua ação vasodilatadora. Como já mencionado, para este trabalho, são estudadas novas estratégias farmacológicas para aumentar o efeito vasodilatador, agora utilizando plantas medicinais.

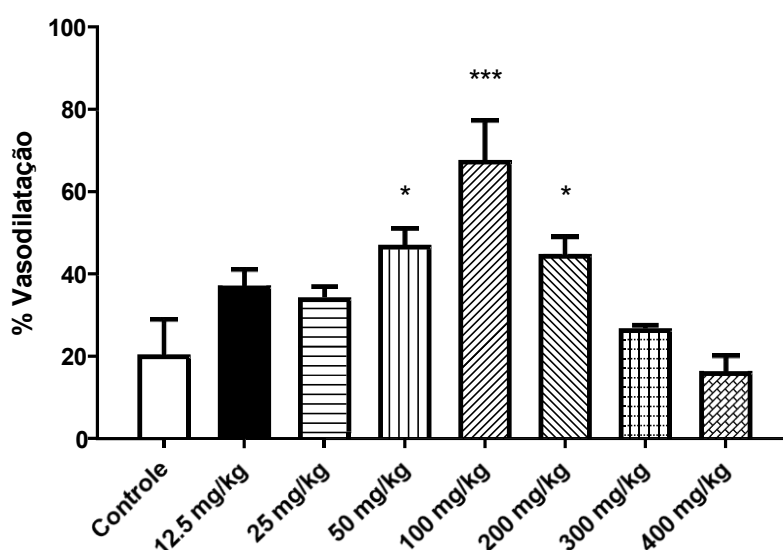
A Figura 6 mostra a porcentagem de relaxamento induzido pelo LASER em anéis isolados de aorta de ratos previamente tratados com a combinação de *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* em diferentes doses, variando de 12,5 mg/kg a 400 mg/kg, bem como a resposta vasodilatadora induzida pela FBM em animais não tratados (grupo controle). Os dados demonstraram um aumento no efeito do LASER nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg ($47,08 \pm 1,98\%$; $67,71 \pm 4,70\%$; $44,90 \pm 2,02\%$, respectivamente), em comparação com o grupo controle e também com os animais tratados com as doses de 12,5, 25, 300 e 400 mg/kg.

A vasodilatação é um processo fisiológico crucial para a regulação do tônus vascular e da perfusão tecidual, especialmente em situações como cicatrização de feridas, controle da pressão arterial e regeneração tecidual. A dilatação dos vasos garante a entrega adequada de oxigênio e nutrientes, sendo essencial tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Whitney *et al.*, 1990).

Além do uso isolado da FBM, sua combinação com plantas medicinais pode reduzir custos, modular efeitos adversos e otimizar os desfechos terapêuticos. Essa estratégia utiliza o sinergismo entre a luz e extratos vegetais padronizados, conforme investigado neste estudo. Como demonstrado na Figura 6, doses de 50, 100 e 200 mg/kg do extrato foram eficazes em potencializar a vasodilatação induzida pela FBM, mesmo após uma única aplicação intraperitoneal. No entanto, doses iguais ou superiores a 300 mg/kg comprometeram esse efeito, sugerindo um fenômeno de fotoinibi-

ção, resposta compatível com a curva de Arndt-Schulz, que postula que doses excessivas podem inibir o efeito terapêutico desejado, como previamente relatado (Moraes *et al.*, 2020).

Figura 6 – Relaxamento induzido por LASER (660 nm) em aortas isoladas de ratos tratados com *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* em diferentes dosagens. As barras representam os valores obtidos da porcentagem média de relaxamento para os grupos que receberam diferentes doses da planta entre 12 a 16 horas antes da decapitação ($n = 4$), com doses variando de 12.5 a 400 mg/kg. * Representa a diferença observada entre as doses de 50 e 200 mg/kg para os demais grupos e *** representa a diferença observada entre os vasos dos animais que receberam a dosagem de 100 mg/kg para os demais grupos, com respectivos p-valor < 0.05 e 0.001 .



6.2 ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO: ENVOLVIMENTO DA VIA NOSe

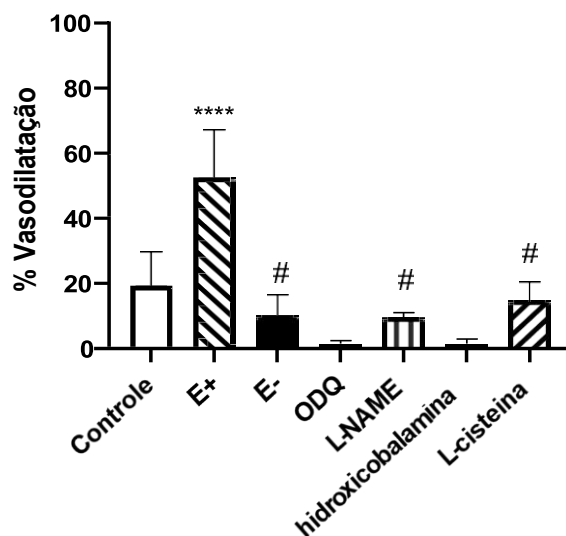
A hipótese mais aceita para o mecanismo de vasodilatação induzida pela FBM envolve a liberação de óxido nítrico (NO) a partir de estoques intracelulares, como os S-nitrosotióis, por meio de fotólise (Keszler *et al.*, 2018; Buzinari *et al.*, 2020). Esses estoques, acumulados durante períodos de produção excessiva de NO, funcionam como reservatórios para liberação rápida. Esse mecanismo também foi observado em estudos com luz verde (Sexton *et al.*, 1994), reforçando a generalização do efeito fotolítico.

Para avaliar a participação da via do NO, diferentes inibidores farmacológicos foram empregados. O tratamento com L-NAME, um inibidor da NOS, reduziu signifi-

cativamente o efeito vasodilatador da FBM, embora não o tenha abolido completamente (Figura 7). A pré-incubação com L-cisteína, que degrada S-nitrosotiois antes da aplicação da luz, também reduziu o efeito, sugerindo que os estoques de NO são essenciais para a ação da FBM. A remoção do endotélio produziu efeito semelhante a incubação com L-NAME e ficou semelhante ao controle sem tratamento com os fitoterápicos, reforçando a dependência de componentes endoteliais para a resposta à luz.

O uso de hidroxycobalamina, um sequestrador de NO, confirmou o envolvimento desse mediador na vasodilatação induzida pela FBM. De forma semelhante, a inibição da guanilato ciclase solúvel por ODQ aboliu completamente o efeito, confirmando que a ativação da GCs é necessária para a vasodilatação induzida pelo LASER vermelho, conforme demonstrado por Oishi *et al.* (2017). Esses dados reforçam que o efeito da FBM depende não apenas da disponibilidade de NO, mas também da integridade da via de sinalização intracelular associada.

Figura 7 – Relaxamento induzido por LASER (660 nm) em aortas isoladas de ratos previamente tratados com *Panax ginseng* e *Angelica keiskei*, na presença de alguns inibidores para investigação do mecanismo de ação. As barras representam o percentual médio e erro padrão médio (EPM) de vasodilatação mediante a aplicação do LASER sobre os anéis aórticos. O grupo controle representa os anéis de animais que não foram previamente tratados com a associação de fitoterápicos, já os demais grupos tiveram o tratamento 24 horas antes do ensaio. **** representa a diferença observada entre o grupo E+ (endotélio preservado) em relação aos grupos controle, E- (endotélio removido), ODQ, Hidroxycobalamina e L-cisteína, com p-valor < 0.0001. # representa a diferença observada entre os grupos E-, L-NAME e L-cisteína vs demais grupos, com p-valor < 0.01.



6.3 AVALIAÇÃO TERAPÊUTICA *in vivo* NO MODELO 2R1C

6.3.1 Efeito sobre a Pressão Arterial

A figura 8A demonstra a evolução da pressão arterial sistólica (PAS) ao longo de 3 semanas no protocolo experimental envolvendo a aplicação da luz em animais 2R1C e sua respectiva comparação com o grupo 2R1C (controle sem luz). É visto que não houve a redução da pressão arterial destes animais em nenhum período do protocolo, demonstrando que a aplicação da luz na cauda, 2 vezes na semana, não surte efeito em relação aos valores de PAS.

A figura 8B ilustra a evolução da pressão arterial sistólica (PAS), também ao longo de três semanas do protocolo experimental, envolvendo os grupos de animais com hipertensão renovascular induzida, tratados ou não com a combinação de extratos vegetais. Foi observada redução da PAS no grupo tratado com a combinação de plantas a partir da segunda semana de tratamento (*Pg* e *Ag* - 2R-1C: $130,03 \pm 6,21$ mmHg, $n = 6$), em comparação aos animais 2R1C não tratados (Controle 2R-1C: $169,87 \pm 12,86$ mmHg, $n = 5$). Essa diminuição da pressão arterial se manteve na terceira semana (*Pg* e *Ag* - 2R-1C $130,58 \pm 12,286$ mmHg, $n = 6$). Apesar da tendência de queda da pressão arterial no grupo tratado, a diferença não atingiu significância estatística ao final de três semanas de tratamento, indicando que esse período pode não ser suficiente para uma mudança drástica na pressão arterial em animais hipertensos.

Já a figura 8C nos relata os níveis de pressão arterial sistólica ao longo do tempo em animais com hipertensão renovascular, tratados ou não com a associação de LASER e fitoterápicos. Para tal figura, é visto que na terceira semana de tratamento houve uma queda de PAS resultando em diferença significativa entre o grupo tratamento (LASER + *Pg* e *Ak* - 2R1C: $134,4 \pm 6,46$ mmHg, $n = 5$) comparada ao controle 2R1C (2R1C: $167,3 \pm 5,758$ mmHg, $n = 4$). Esses dados corroboram com a ideia de que a associação das plantas possa potencializar o efeito hipotensivo induzido pelo LASER, atuando de forma sinérgica e não somativa, já que o LASER sozinho não induziu queda na pressão arterial.

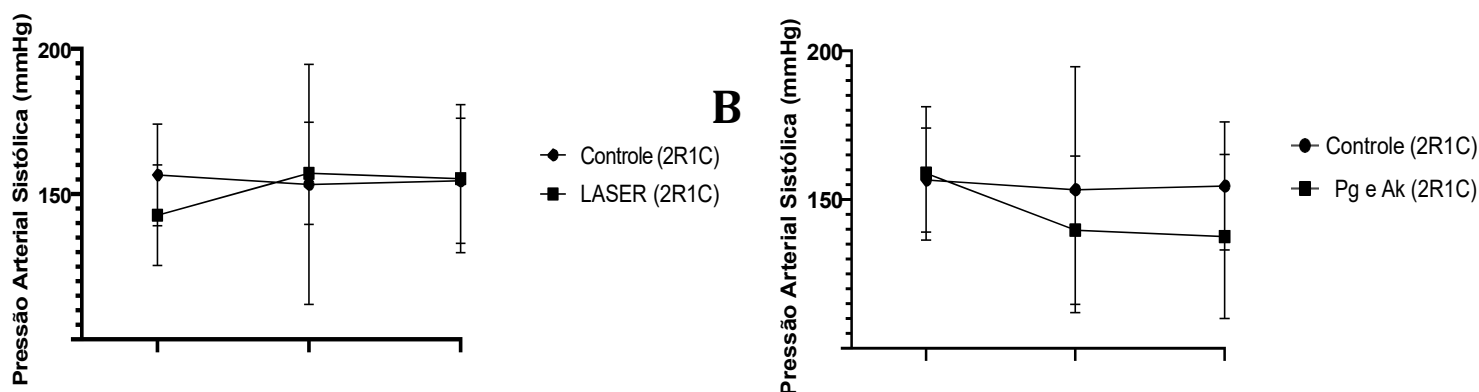
O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças cardiovasculares é amplamente documentado na literatura (Sem e Samanta, 2015; Rouhi-Boroujeni *et al.*, 2017; Ajebli e Eddouks, 2020). No entanto, a maioria dessas plantas está associ-

ada a mecanismos predominantemente antioxidantes, anti-inflamatórios ou diuréticos, como no caso das principais espécies estudadas para fins vasculares, *Hibiscus sabdariffa* (Hopkins *et al.*, 2013) e *Allium sativum* (Brace, 2002; Imaizumi *et al.*, 2023).

Estudos que abordam o papel das plantas medicinais nas vias de produção de óxido nítrico (NO), como proposto neste estudo, ainda são escassos. Além de investigar a via de formação de NO, este estudo também destaca um sinergismo entre moléculas bioativas que atuam em paralelo por meio de mecanismos antioxidantes. O modelo Goldblatt (2 rins, 1 clipe) é amplamente reconhecido como um modelo experimental adequado para investigar a disfunção endotelial, uma vez que apresenta elevação sustentada da pressão arterial (Mannemuddhu, Ojeda e Yadav, 2020) e aumento da angiotensina II sérica (Kim *et al.*, 2016) estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), agravando o estresse oxidativo vascular.

Neste estudo, observamos que os extratos vegetais promoveram um efeito hipotensor significativo neste modelo, quando associado com a irradiação da luz. A dose de 50 mg/kg foi eficaz na redução da pressão arterial a partir da segunda semana de tratamento, nas condições de tratamento isolado com as plantas ou associação com LASER. No entanto, a ausência de diferenças estatisticamente significativas com o grupo apenas tratados com as plantas pode estar associada a limitações metodológicas, como o uso de um pletismógrafo de cauda. Embora seja uma técnica não invasiva e amplamente utilizada por sua praticidade e semelhança com a medida indireta em humanos, esse método apresenta limitações de precisão, influenciadas por variáveis como estresse de manuseio e temperatura da cauda, o que pode comprometer a confiabilidade dos dados, como já observado em estudos na literatura (Jamieson *et al.*, 1997).

Figura 8 – Análise da Pressão Arterial ao longo do tempo sob diferentes tratamentos em animais hipertensos modelo 2 Rins, 1 Clipe. O gráfico mostra a variação da pressão arterial ao longo das semanas (no total de 11 semanas) de animais tratados com a associação dos fitoterápicos e dos animais sem tratamento, a partir da 9ª semana, ambos grupos submetidos à cirurgia de clipagem renal. Cada ponto demonstrado no gráfico é referente ao valor médio e erro padrão da pressão arterial dos grupos Controle (2R1C) (n = 4) e Pg + Ak (2R1C) (n = 6).



100

1

2

3

Semanas

100

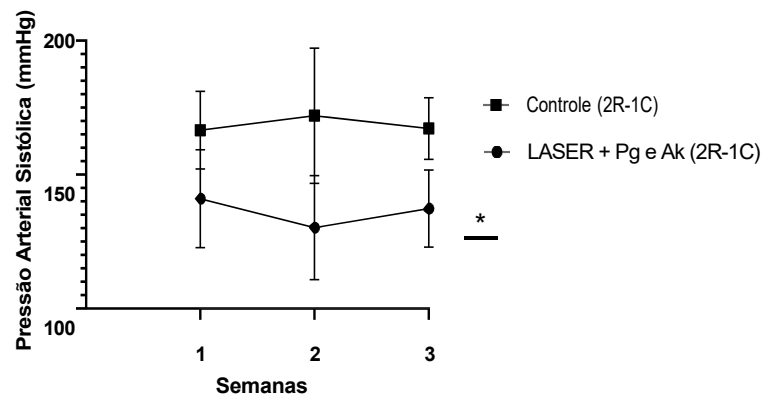
1

2

3

Semanas

C



6.3.2 Alterações morfológicas nos rins e coração

As análises morfológicas de hipertrofia cardíaca e renal são importantes, principalmente em modelo 2R1C, para acompanhar a efetividade da cirurgia e também um possível efeito benéfico no tratamento proposto sob estes dois órgãos.

A figura 9 (A-F) nos mostra as análises destes índices de hipertrofia renal e cardíaca em animais tratados com LASER, ou tratados com fitoterápicos (*Pg* e *Ak*), ou tratados com a associação LASER + *Pg* e *Ak*, sendo todos estes tratamentos comparados aos grupos 2R1C e Sham.

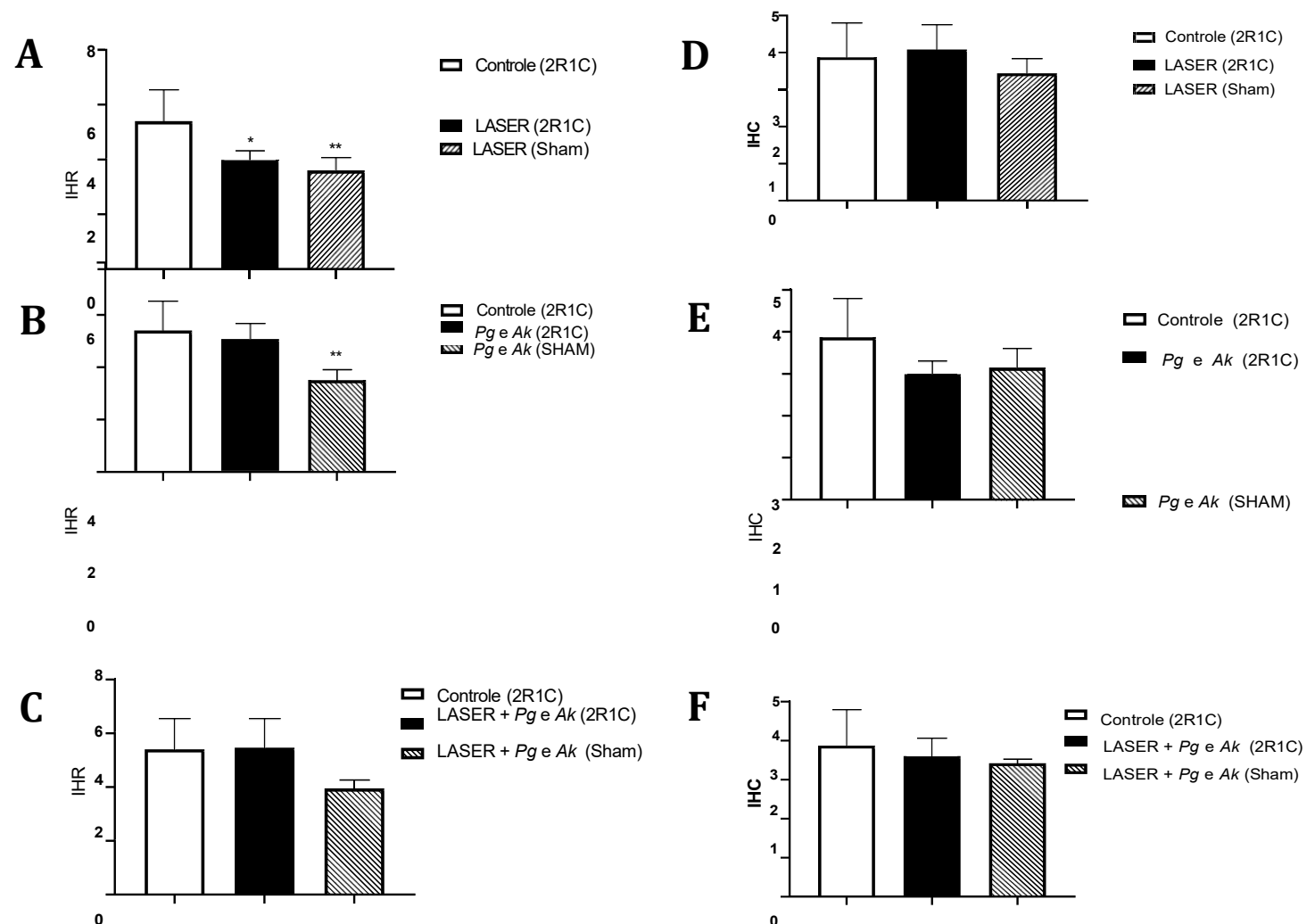
Foi visto na figura 9A que os animais tratados com o LASER houve uma redução do índice de hipertrofia renal ($3,984 \pm 0,153$, $n = 5$), comparado aos animais 2R1C ($5,406 \pm 0,643$, $n = 3$) e sendo semelhante aos animais Sham ($3,604 \pm 0,176$, $n = 7$).

Os demais resultados não houveram diferença significativa quanto a estas alterações morfológicas.

Um estudo de 2009 (Sussai *et al.*, 2009) em ratos com obstrução ureteral unilateral (UUO) demonstrou que a FBM aplicada durante a cirurgia (laser AlGaAs, 780 nm, densidade de energia de $22,5 \text{ J/cm}^2$, potência de 30 mW, 30 s em nove pontos) reduziu significativamente a fibrose intersticial renal e a expressão de marcadores inflamatórios e pro fibróticos como IL-6, MCP-1 e TGF- β 1, restringindo o avanço da lesão renal crônica.

Também há outros trabalhos demonstrando o efeito nos rins, como no estudo em ratos Wistar com diabetes induzida por estreptozotocina (STZ), o qual os pesquisadores usaram LASER (faixa de 670 nm), 9 J/cm² por dia durante 14 semanas, resultando em achados significativos da função renal, como diminuição de creatinina e BUN sérico e da razão BUN/creatinina, aumento das atividades de catalase e Na⁺/K⁺-ATPase e redução do estresse oxidativo e maior expressão de citocromo c oxidase e de marcadores mitocondriais (Lim *et al.*, 2010), demonstrando que o efeito do LASER visto no trabalho da presente tese já é explorado em outras fisiopatologias associadas ao sistema renal, tendo efeitos com direta aplicação sobre rins ou com efeitos renais a partir de aplicação na pele de animais.

Figura 9 – Análise dos índices de hipertrofia renal e hipertrofia cardíaca sob diferentes tratamentos em animais hipertensos modelo 2 rins, 1 clipe e o grupo sham. As barras representam a média e o erro padrão médio dos índices de hipertrofia renal (IHR) para as imagens 9A-C e índice de hipertrofia cardíaca para as imagens 9D-F. * representa diferença significativa dos valores médios de hipertrofia renal entre o grupo LASER (2R1C) e o grupo Controle (2R1C) com p-valor < 0.05. ** representa a diferença significativa dos valores médios de hipertrofia renal dos grupos LASER (sham) da figura 9A e *Pg* e *Ak* (sham) da figura 9B em relação aos seus respectivos controles (Controle [2R1C]) com p-valor < 0.01.

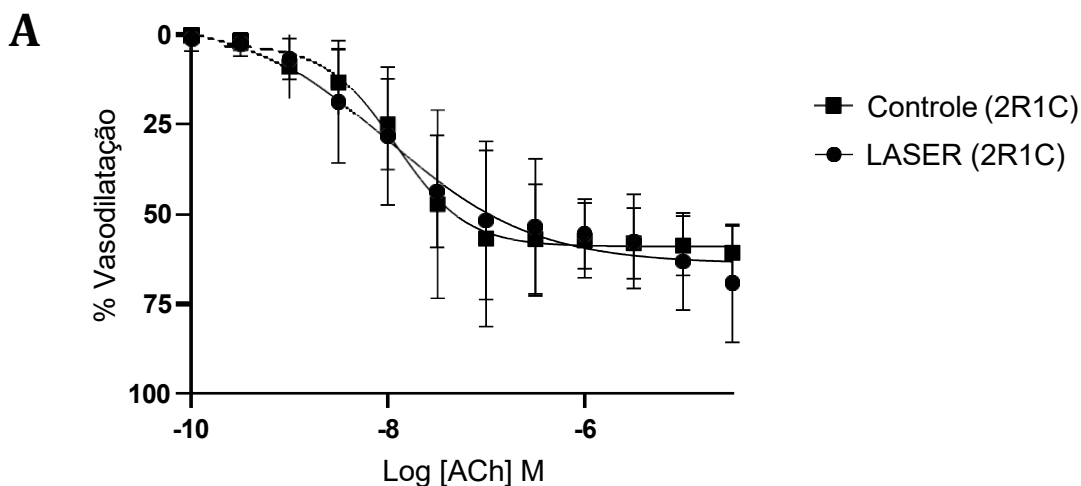


6.4 RESPOSTA VASCULAR À ACETILCOLINA E NITROPRUSSATO DE SÓDIO APÓS TRATAMENTOS

Em relação à função endotelial, a resposta vasodilatadora dependente do endotélio foi avaliada pela curva concentração-efeito para acetilcolina. Para o estudo independente do endotélio, foram construídas curvas concentração-efeito para o doador de NO Nitroprussiato de sódio (NPS).

As figuras 10 e 11 representam a curva concentração-efeito para acetilcolina e NPS, respectivamente, da comparação dos grupos 1 e 2 (item 5.5.3 da seção de métodos), sendo estes os grupos Controle (2R1C) e LASER (2R1C). É visto que não houve diferenças significativas para os valores de pD_2 e $Emax$ nos animais tratados com o LASER, tanto para as curvas de acetilcolina quanto para NPS. Isto se deve ao fato da duração do tratamento (3 semanas) e a quantidade irradiada na semana (2 vezes na semana), visto que trabalhos anteriores do grupo mostram que só o efeito do LASER é capaz de reduzir a pressão arterial dos animais, mas não há estudos sobre a função endotelial após o tratamento com LASER, no modelo 2R-1C. Vale ressaltar que há um percentual de animais que são responsivos à luz, como visto no trabalho de Schiavon e colaboradores (2023), resposta que pode ter ocorrido neste trabalho.

Figura 10 – Análise da função endotelial por reatividade vascular via acetilcolina em animais controle (2R1C) vs tratados com LASER (2R1C). Gráficos da curva concentração efeito de acetilcolina em animais 2R1C com ou sem tratamento com LASER. Cada ponto é referente ao percentual médio e erro padrão médio de relaxamento induzido por acetilcolina para a figura 10A. Nas figuras 10B e 10C cada barra representa a média e o erro padrão médio dos valores de pD_2 e $Emax$, respectivamente, obtidos a partir da construção da curva sigmoidal concentração-efeito de acetilcolina.



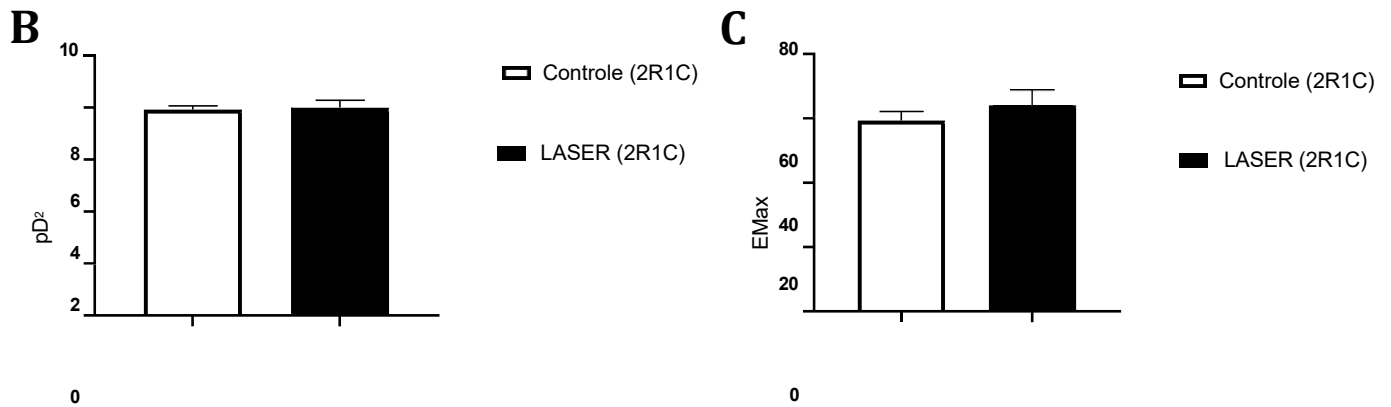
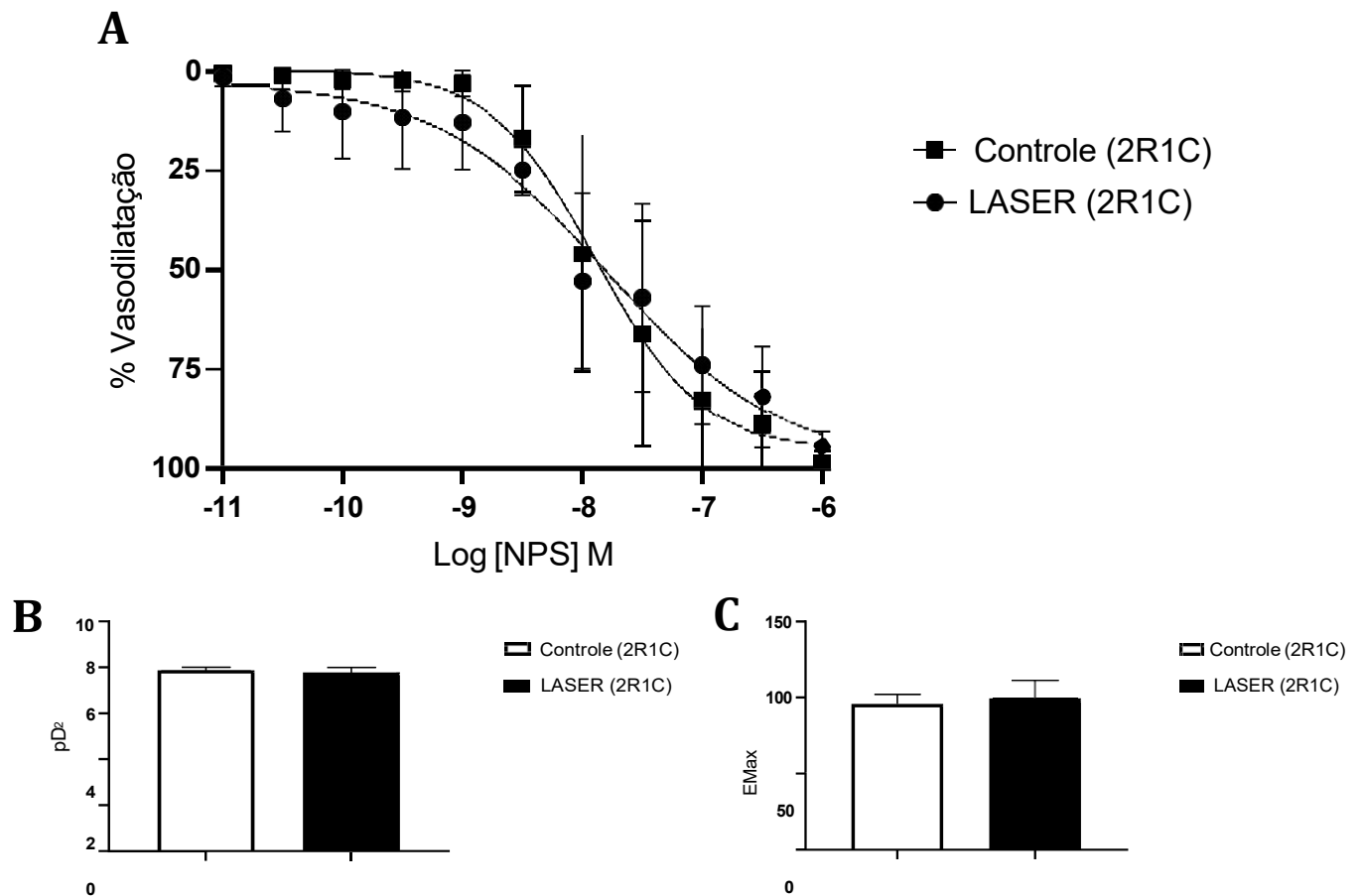


Figura 11 – Análise da função endotelial por reatividade vascular via nitroprussiato de sódio em animais controle (2R1C) vs tratados com LASER (2R1C). Gráficos da curva concentração efeito de acetilcolina em animais 2R1C com ou sem tratamento com LASER. Cada ponto é referente ao percentual médio e erro padrão médio de relaxamento induzido por NPS para a figura 11A. Nas figuras 11B e 11C cada barra representa a média e o erro padrão médio dos valores de pD₂ e E_{max}, respectivamente, obtidos a partir da construção da curva sigmoideal concentração-efeito de NPS.



A Figura 12 demonstra um deslocamento para a esquerda da curva concentração-efeito da acetilcolina para os animais tratados com a combinação de plantas

(Pg e Ak – 2R1C: $7,65 \pm 0,11$, $n = 6$), quando comparados aos animais não tratados (2R1C: $7,92 \pm 0,14$, $n = 5$). Além disso, alterações na resposta vasodilatadora máxima foram observadas para o grupo tratado ($96,6 \pm 3,2$, $n = 6$) em comparação ao grupo não tratado ($59,3 \pm 2,9$, $n = 5$).

A Figura 13 detalha os efeitos dos extratos combinados na resposta vascular ao nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de óxido nítrico e vasodilatador independente do endotélio. O objetivo foi investigar uma possível ação antioxidante dos extratos nos vasos sanguíneos, refletida pela modulação da ação vasodilatadora direta do NPS.

Embora não tenha sido observada diferença significativa no efeito vasodilatador máximo entre os vasos dos animais tratados ($97,34 \pm 4,04$, $n = 6$) e não tratados ($95,77 \pm 6,28$, $n = 5$), foi identificado um deslocamento na curva concentração-efeito do nitroprussiato de sódio, resultando em um deslocamento nos valores de pD_2 para os animais tratados ($8,39 \pm 0,1$, $n = 6$) em comparação aos animais não tratados ($7,88 \pm 0,12$, $n = 5$). Essas descobertas *in vitro* confirmam os resultados dos protocolos de reatividade vascular e fornecem informações cruciais sobre o possível mecanismo de ação desses extratos.

Em relação aos resultados apresentados nas Figuras 12 e 13, observa-se melhora da função endotelial nos animais tratados, evidenciada pelas curvas de concentração-efeito para acetilcolina. Essas curvas avaliam a resposta do subtipo de receptor muscarínico M3, localizado nas células endoteliais, ao seu respectivo agonista. Esse receptor é essencial como ferramenta farmacológica para o controle do tônus vascular, pois sua ativação promove o influxo de cálcio, formando o complexo cálcio-calmodulina, que estimula a atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Zuccolo *et al.*, 2017), sendo essencial para estudos de funcionalidade do endotélio.

As alterações observadas em pD_2 e $Emax$ indicam aumento da sensibilidade do receptor à acetilcolina e reversão da disfunção endotelial induzida pela hipertensão. Essa reversão é demonstrada pela restauração do relaxamento vascular para quase 100% em anéis aórticos previamente comprometidos.

Esse efeito pode ser atribuído às propriedades farmacológicas das plantas utilizadas. O *Panax ginseng* é amplamente descrito na literatura como uma planta capaz de modular a atividade da NOSe por meio de ginsenosídeos como Rb1 e Rg1 (Ahn *et al.*, 2013; Irfan *et al.*, 2020). Esses compostos estimulam a sirtuína-1 (SIRT1),

uma desacetilase envolvida na ativação da NOSe (Ren *et al.*, 2021; Lou *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2024). A desacetilação da enzima aumenta sua atividade, amplificando a resposta vasodilatadora à acetilcolina, como demonstrado nos dados apresentados.

Na curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS), observou-se que os animais tratados não apresentaram alteração no relaxamento máximo, porém houve aumento significativo nos valores de pD_2 . Como o NPS é um doador direto de NO que atua no músculo liso, esse resultado sugere melhora na sensibilidade da guanilato ciclase solúvel, possivelmente devido à redução do estresse oxidativo local. Essa atividade pode ser atribuída ao xantoangelóis presente na *Angelica keiskei*, compostos com reconhecidas ações antioxidante (Zhang *et al.*, 2019) e hipoglicemiante (Enoki *et al.*, 2007). A redução de ROS, especialmente o ânion superóxido (O_2^-), próximo ao músculo liso vascular favorece a ação de doadores de NO como o SNP, como já demonstrado em diversos estudos com compostos antioxidantes (Guzik *et al.*, 2000; Kangussu *et al.*, 2015; Guerra-Ojeda *et al.*, 2022).

Figura 12 – Análise da função endotelial por reatividade vascular via acetilcolina em animais controle (2R1C) vs tratados com Pg e Ak (2R1C). Gráfico da curva concentração efeito de acetilcolina em animais 2R1C com ou sem tratamento da associação de fitoterápicos. Cada ponto é referente ao percentual médio e erro padrão médio de relaxamento induzido por acetilcolina para 12A. Na figura 12B, cada barra representa a média e erro padrão médio obtidos a partir da construção da curva sigmoidal concentração-efeito para acetilcolina. **** representa a diferença entre os grupos controle e pré-tratado com fitoterápicos, com p-valor < 0.001 para os valores de $eMax$.

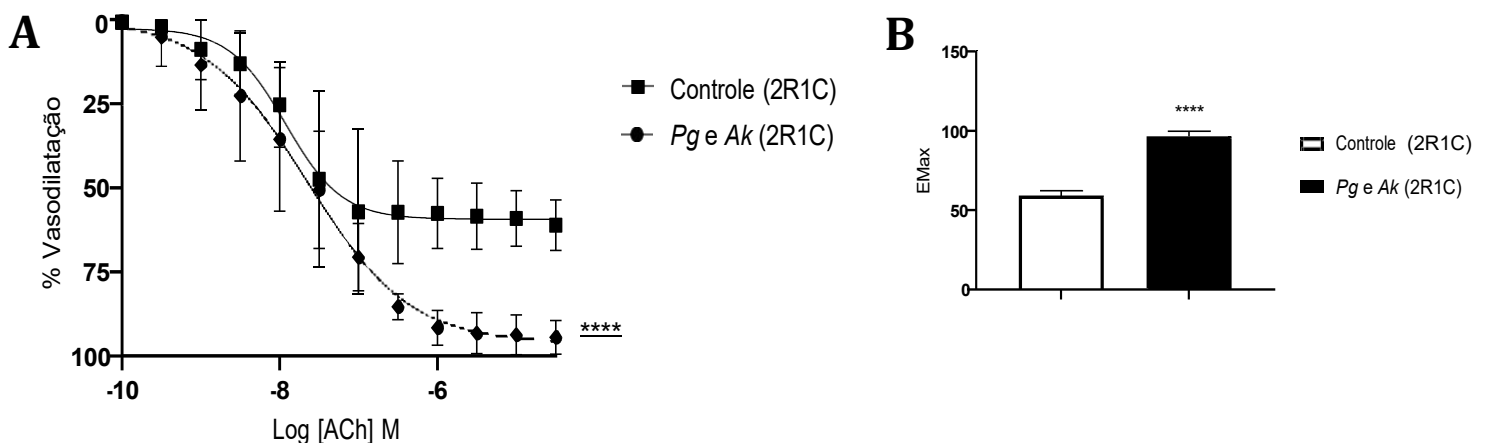
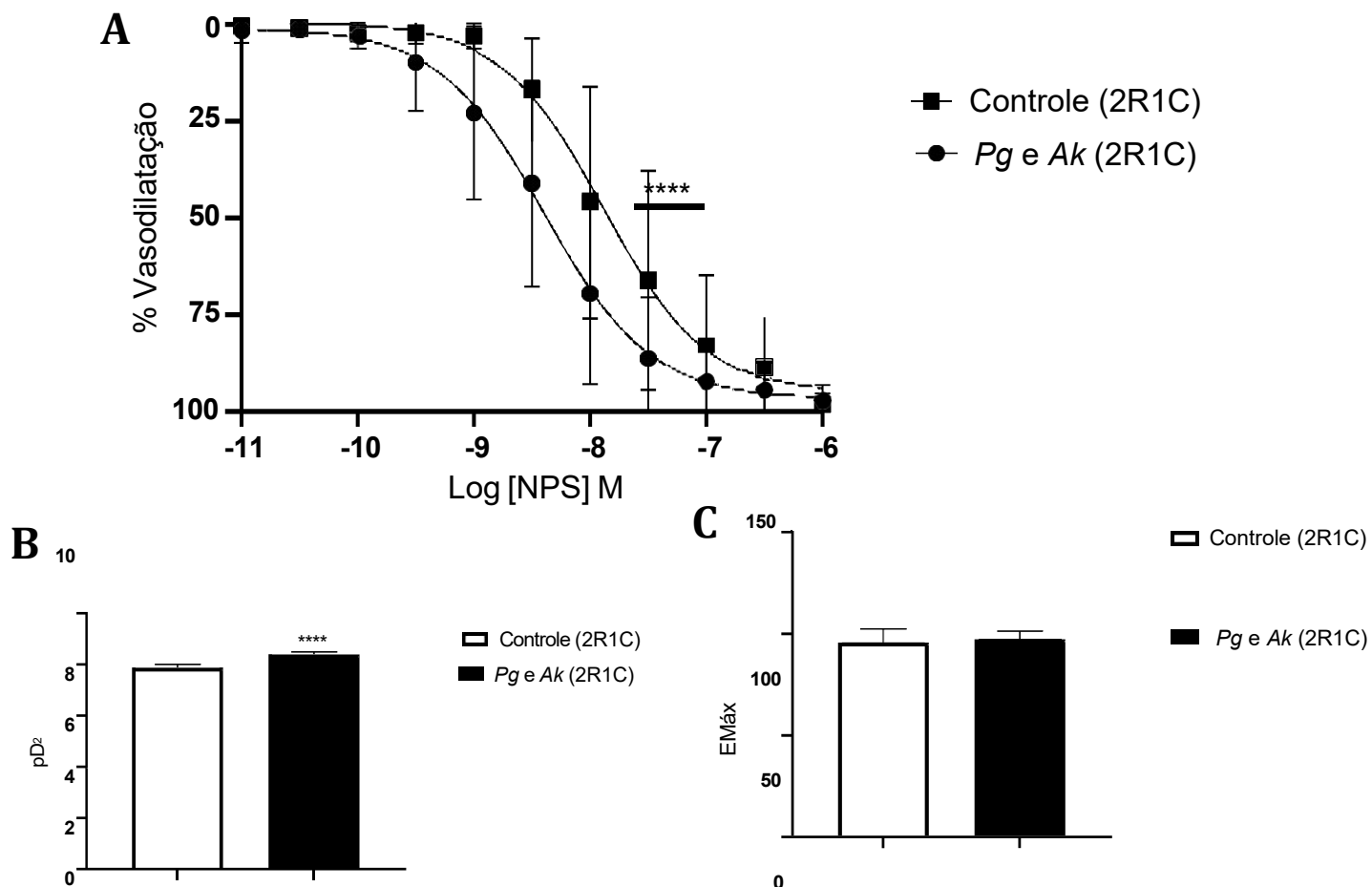


Figura 13 – Análise da função endotelial por reatividade vascular via nitroprussiato de sódio em

animais controle (2R1C) vs tratados com *Pg* e *Ak* (2R1C). Gráficos da curva concentração efeito de NPS em animais 2R1C com ou sem tratamento da associação de fitoterápicos. Cada ponto é referente ao percentual médio e erro padrão médio de relaxamento induzido por NPS para a figura 13A. Nas figuras 13B e 13C, cada barra representa a média e erro padrão médio dos valores de pD_2 e $Emax$, respectivamente. **** representa a diferença entre os grupos controle e pré-tratado com fitoterápicos, com p -valor < 0.001 para os valores de pD_2 .



Já as figuras 14 e 15 representam respectivamente as curvas concentração efeito para acetilcolina e NPS em animais tratados (ou não) com a associação LASER + *Pg* e *Ak* em animais hipertensos.

Podemos observar que para a curva de acetilcolina não houve diferença nos valores de pD_2 , mas há um aumento no relaxamento máximo induzido por acetilcolina no grupo que recebeu a associação de tratamentos ($82,22 \pm 1,84\%$, $n = 4$) comparado ao grupo Controle ($59,920 \pm 2,679\%$, $n = 4$).

Já para a curva de NPS, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com a associação da luz e plantas em comparação ao grupo controle.

Figura 14 – Análise da função endotelial por reatividade vascular via acetilcolina em animais controle (2R1C) vs tratados com LASER + *Pg* e *Ak* (2R1C). Para 14A, cada ponto é referente ao

percentual médio e erro padrão médio de relaxamento induzido por acetilcolina. Para 14B, cada barra representa os valores médios e erro padrão médio de E_{max} obtidos a partir da curva sigmoidal concentração-efeito para acetilcolina. *** representa a diferença entre os grupos controle e pré-tratado com a combinação LASER e fitoterápicos, com p -valor < 0.001 para os valores de $eMáx$.

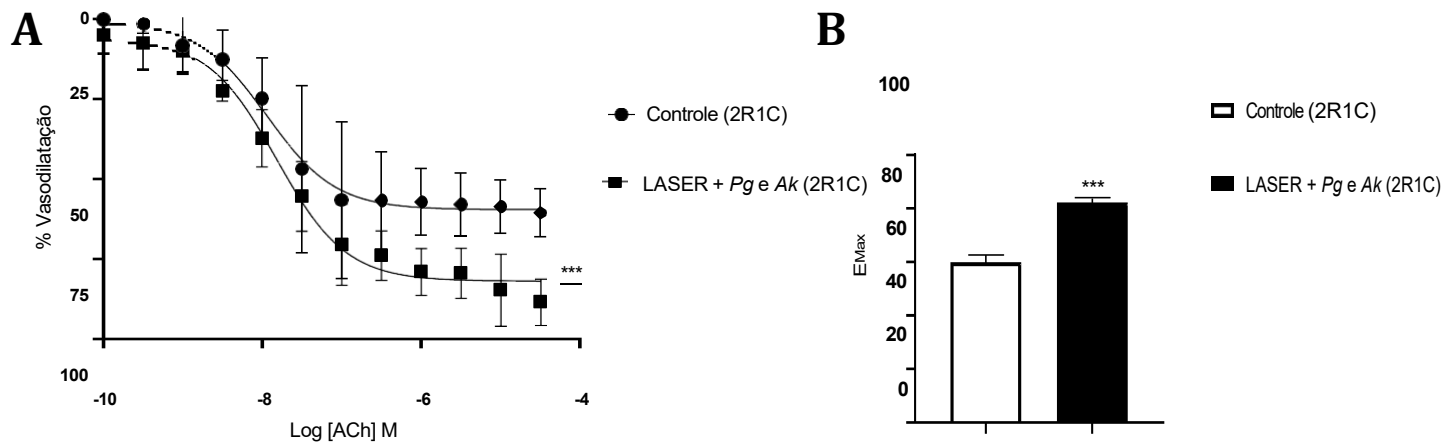
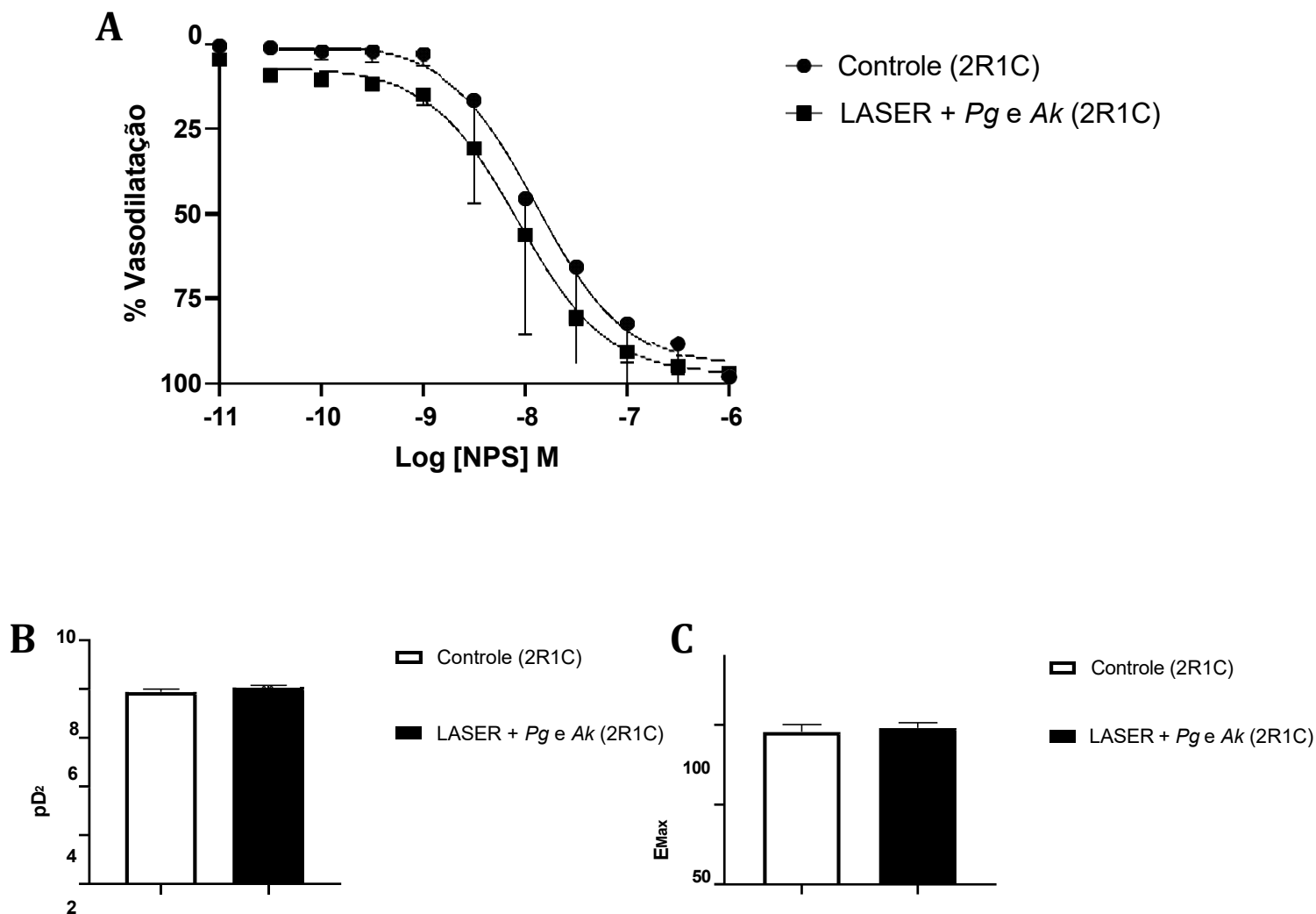


Figura 15 – Análise da função endotelial por reatividade vascular via nitroprussiato de sódio em animais controle (2R1C) vs tratados com LASER + Pg e Ak (2R1C). Em 15A cada ponto é referente ao percentual médio e erro padrão médio de relaxamento induzido por NPS. Para 15B e 15C, cada barra representa a média e o erro padrão médio de pD_2 e E_{max} construídos a partir da curva sigmoidal concentração-efeito para NPS.



0

0

6.5 INFLUÊNCIA DE *Angelica keiskei* E *Panax ginseng* NA RESPOSTA VASODILATADORA À LUZ E ACETILCOLINA EM AORTA DE RATOS COM INIBIÇÃO DE ENOS

Em experimentos com animais tratados cronicamente com L-NAME, o efeito da FBM foi praticamente abolido, independentemente da administração prévia dos extratos (Figura 16A). Isso indica que os compostos vegetais podem elevar os estoques celulares de NO de forma dependente de eNOS para elevar o efeito do LASER, uma vez que a produção endotelial estava bloqueada. No entanto, ao testar a resposta à acetilcolina, os animais tratados com os extratos apresentaram maior vasodilatação em comparação ao grupo com L-NAME sem tratamento (Figura 16B).

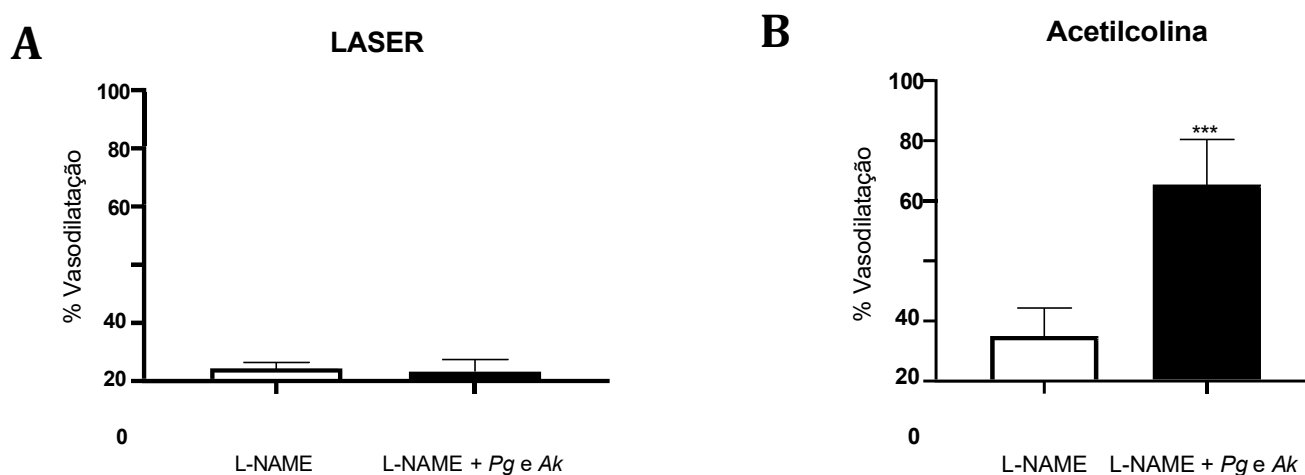
A acetilcolina, utilizada como ferramenta farmacológica para avaliação da função endotelial, atua sobre receptores muscarínicos M3 presentes nas caveolas endoteliais, desencadeando a cascata Ca^{2+} /calmodulina/eNOS. Em animais tratados com L-NAME, a resposta à acetilcolina é tipicamente abolida devido à inibição da enzima. Ainda assim, a resposta a acetilcolina é parcialmente restaurada em animais pré-tratados com os extratos sugerindo que as plantas medicinais também estejam potencializando a vasodilatação dependente do endotélio que não seja dependente de eNOS e NO, mas sim de fator hiperpolarizante dependente de endotélio ou outro componente da via. Ainda, a atividade antioxidante promovida pelos fitoterápicos pode ter contribuído para potencialização do relaxamento induzido pela acetilcolina, salvando mais NO livre no tecido.

Entretanto, o aumento da produção de NO nem sempre é benéfico. Em ambientes com excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS), o NO pode reagir com ânions superóxido formando peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio associada à vasoconstrição e lesão endotelial (Zou *et al.*, 2004; Lubos, Handy e Loscalzo, 2008; Incalza *et al.*, 2017). Nesse contexto, destaca-se o sinergismo entre *Panax ginseng* e *Angelica keiskei*. Os ginsenosídeos do ginseng estimulam a produção de NO por meio da ativação da eNOS (Gao *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2024), enquanto os xantoangelóis da *Angelica keiskei* exercem atividade antioxidante, neutralizando ROS

e prevenindo a formação de peroxinitrito (Matsuura *et al.*, 2001; Yasuda *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2019). Esse equilíbrio entre produção e preservação de NO é essencial para a eficácia da estratégia terapêutica.

Embora muitos estudos utilizem a aorta torácica como modelo experimental, a regulação da pressão arterial ocorre principalmente em microvasos, como os encontrados nos leitos mesentérico, cerebral e dérmico (Munoz *et al.*, 2020). Esses vasos de resistência são fundamentais para a regulação hemodinâmica e constituem alvos ideais para estudos do tônus vascular.

Figura 16 – Relaxamento induzido por FBM em aortas isoladas de ratos tratados com L-NAME. As barras representam os valores obtidos em porcentagem de relaxamento para o grupo L-NAME e o grupo L-NAME + *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* (grupo Pg e Ak), que receberam o fitoterápico 12 h antes da decapitação. Não há diferença significativa no relaxamento induzido por LASER nos vasos dos animais tratados com a combinação de *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* (n = 6) em comparação ao grupo L-NAME (n = 6).



6.6 ESTUDO EM MICROVASOS MESENTÉRICOS: EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE PLANTAS SOB DIFERENTES GRADIENTES DE PRESSÕES

As Figuras 17 a 20 apresentam os resultados obtidos em microvasos mesentéricos. Sob condições de pressão regular e elevada, o tratamento com extratos padronizados – diretamente nos vasos isolados - não alterou significativamente a vasodilatação induzida por fluxo (FIV) em comparação aos controles. Como a FIV depende

da ativação de sensores mecanossensíveis pelo estresse de cisalhamento, esses resultados sugerem que os compostos não atuam nessa via ou que podem necessitar de metabolismo prévio para exercerem efeito.

Mesmo em concentrações potencialmente sub-ótimas (1 mg/mL), foi observada uma mudança no pD2 das curvas de acetilcolina em vasos sob pressão regular tratados com os extratos (*Pg* e *Ak*: $7,735 \pm 1,841e-008$, $n = 6$) em relação ao controle (Controle: $6,268 \pm 5,4e-007$, $n = 6$), semelhante ao efeito visto em animais com L-NAME. Isso reforça a hipótese de que as plantas medicinais atuam sobre a eNOS, mas não influenciam a sinalização mecanossensível. Sob condições de alta pressão, não foi observada reversão da disfunção vascular com os extratos, sugerindo que, nessas situações, os extratos vegetais não restauram a responsividade endotelial.

Curiosamente, mesmo sem diferenças significativas nos desfechos da FBM nesses modelos, o uso da fotobiomodulação em microvasos representa um avanço metodológico. A maior parte da literatura existente é baseada em experimentos com anéis de aorta, e não em vasos de resistência, tornando este estudo uma contribuição original para a fisiologia vascular experimental.

Em relação aos dados observados na figura 20, provavelmente não houve inibição da via justamente pelo fato das plantas não potencializarem o efeito da luz, seja por questão da concentração utilizada, ou da necessidade de administração do fármaco no organismo do animal para metabolização dos compostos para haver uma potencialização da vasodilatação.

Figura 17 – Estudo da participação de fitoterápicos no relaxamento de vasos mesentéricos isolados de camundongos induzidos por FIV (Vasodilatação Induzida por Fluxo). Curvas cumulativas de fluxo-efeito realizadas em artérias mesentéricas pré-contráidas com endotelina-1. Cada ponto representa a média e o Erro Padrão Médio (EPM) dos dados obtidos em determinações independentes. FIV Pressão Regular (RP) – Controle significa o grupo controle sob pressão regular; FIV (RP) – *Pg* e *Ak* representa o grupo tratado com 1 mg/mL de fitoterápicos (*Angelica keiskei* e *Panax ginseng*) 12 horas antes do experimento, sob pressão regular.

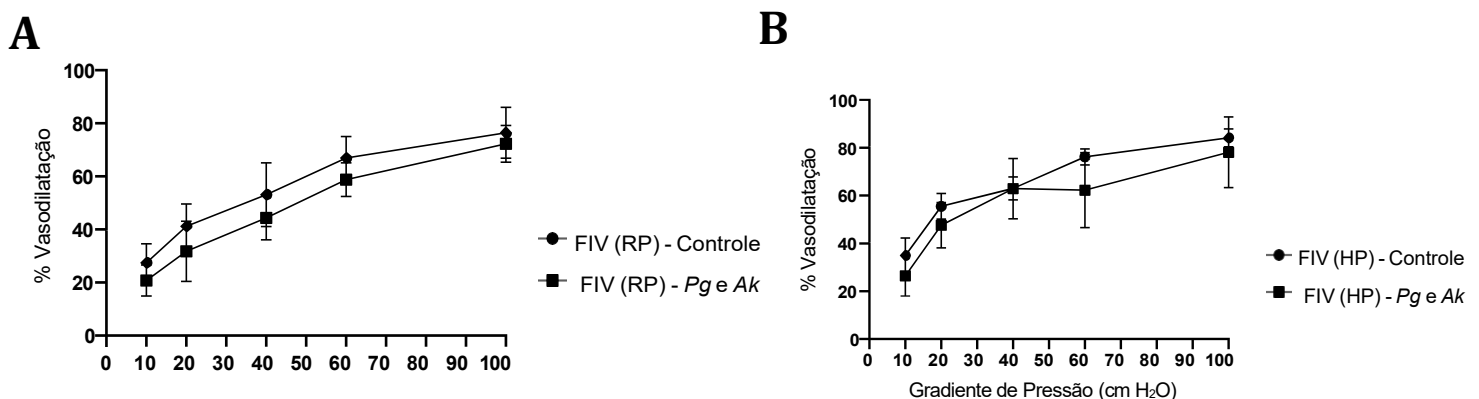


Figura 18 – Estudo da participação de fitoterápicos no relaxamento de vasos mesentéricos isolados de camundongos induzidos por acetilcolina em condições de pressão regular e alta. Curvas cumulativas de fluxo-efeito realizadas em artérias mesentéricas pré-contraídas com endotelina-1. Cada ponto representa a média e o Erro Padrão Médio (EPM) dos dados obtidos em determinações independentes. FIV Pressão Regular (RP) – Controle significa o grupo controle sob pressão regular; FIV (RP) – *Pg* e *Ak* representa o grupo tratado com 1 mg/mL de fitoterápicos (*Angelica keiskei* e *Panax ginseng*) 12 horas antes do experimento, sob pressão regular. **** Representa diferença observada nos valores de pD₂ entre o grupo tratado com a associação de plantas e o controle, com p-valor < 0,0001.

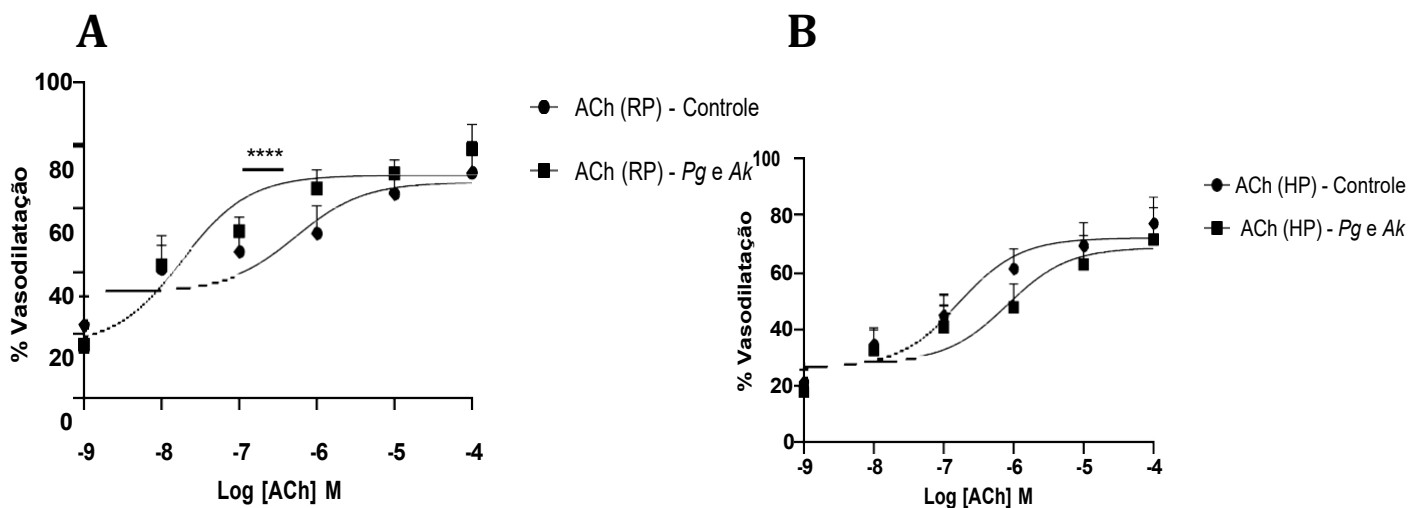


Figura 19 – Estudo da participação de fitoterápicos no relaxamento de vasos mesentéricos isolados de camundongos induzidos por LASER, submetidos a pressão regular e alta. Curvas cumulativas de fluxo-efeito realizadas em artérias mesentéricas pré-contraídas com endotelina-1. Cada ponto representa a média e o Erro Padrão Médio (EPM) dos dados obtidos em determinações independentes. FIV Pressão Regular (RP) – Controle significa o grupo controle sob pressão regular; FIV (RP) – *Pg* e *Ak* representa o grupo tratado com 1 mg/mL de fitoterápicos (*Angelica keiskei* e *Panax ginseng*) 12 horas antes do experimento, sob pressão regular.

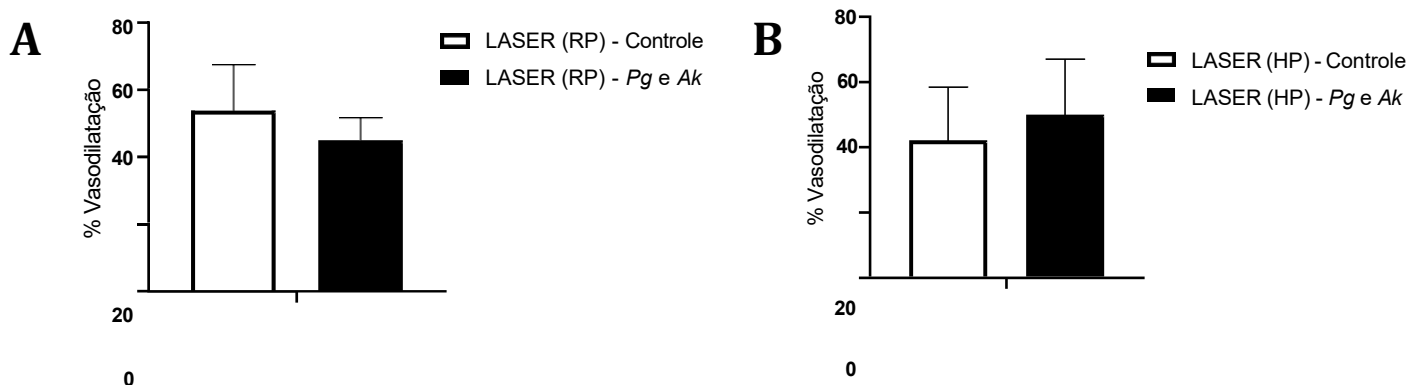
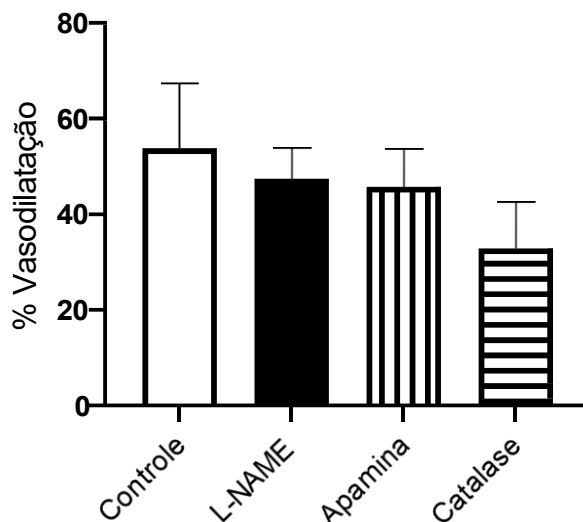


Figura 20 – Investigação do mecanismo de vasodilatação induzido por LASER a partir da

participação de fitoterápicos incubados em vasos mesentéricos isolados. Curvas cumulativas de fluxo-efeito realizadas em artérias mesentéricas pré-contraídas com endotelina-1. Cada ponto representa a média e o Erro Padrão Médio (EPM) dos dados obtidos em determinações independentes. FIV Pressão Regular (RP) – Controle significa o grupo controle sob pressão regular; FIV (RP) – *Pg* e *Ak* representa o grupo tratado com 1 mg/mL de fitoterápicos (*Angelica keiskei* e *Panax ginseng*) 12 horas antes do experimento, sob pressão regular.



6.7 ESTUDOS *in vitro* EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

A Figura 21 correlaciona a porcentagem de absorbância de células HUVECs não tratadas ($100,018 \pm 0,018\%$, $n = 3$) com diferentes concentrações de extratos padronizados (0,01 mg/mL: $99,587 \pm 12,305\%$, $n = 3$; 0,1 mg/mL: $94,233 \pm 3,224\%$, $n = 3$; 1 mg/mL: $100,266 \pm 4,127\%$, $n = 3$; 10 mg/mL: $101,98 \pm 8,17\%$, $n = 3$). Os resultados indicam que as concentrações utilizadas não alteram a viabilidade celular, como demonstrado pela comparação com um agente citotóxico de referência na literatura, o triton ($32,786 \pm 10,875\%$, $n = 3$).

Experimentos em cultura celular reforçam os achados obtidos *in vivo*. Inicialmente, foi realizada uma análise de citotoxicidade para determinar a concentração ótima do extrato. Não foram observadas alterações na viabilidade das células endoteliais até 10 mg/mL, parâmetro adotado nas análises subsequentes.

As Figuras 22 e 23 demonstram que essa concentração promove um aumento significativo nos níveis intracelulares de NO, detectados pela sonda DAF. Esse achado reforça a ação dos compostos presentes nos extratos vegetais. Na presença de L-NAME, um inibidor competitivo e reversível da eNOS, foi observada

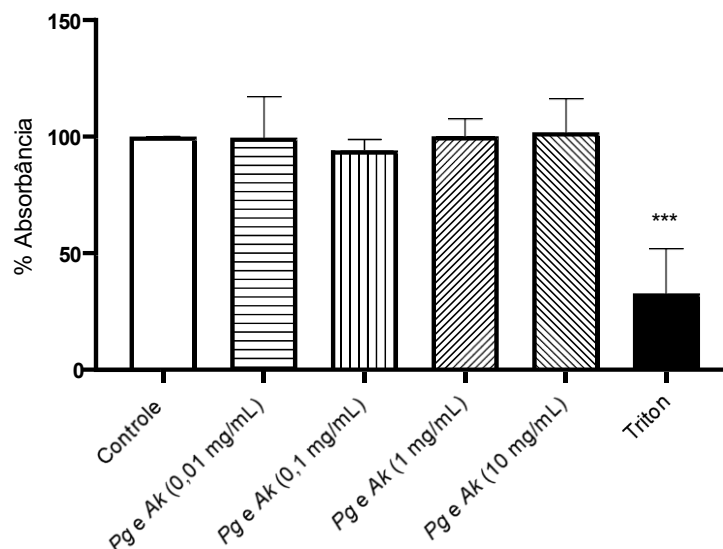
uma redução na produção de NO promovida pelos extratos, sugerindo que o mecanismo de ação está intrinsecamente relacionado à ativação da eNOS.

Para investigar o papel dos estoques intracelulares de NO, como os S-nitrosotióis (RS-NO), utilizou-se a coincubação com CuSO_4 , um cátion conhecido por catalisar a liberação de NO desses estoques. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com extratos e aqueles cotratados com CuSO_4 , indicando que o aumento de NO promovido pelas plantas não depende da mobilização de S-nitrosotióis, mas sim da ativação enzimática da eNOS.

Na Figura 23, o uso da sonda de lucigenina permitiu quantificar a produção de ânion superóxido em culturas celulares. A exposição ao lipopolissacarídeo (LPS), um conhecido ativador de TLR4 e indutor da NADPH oxidase, aumentou significativamente os níveis de O_2^- , simulando disfunção endotelial (Martino *et al.*, 2023). A coincubação com extratos vegetais reduziu esse aumento, potencializando sua ação antioxidante. Esse efeito é principalmente atribuído aos xantoangelóis de *Angelica keiskei*, que reduzem a produção de ROS, protegendo a integridade endotelial (Zhang *et al.*, 2019).

A redução do estresse oxidativo é essencial para a restauração da função vascular, pois permite que as vias dependentes de NO operem com mais eficiência. Assim, a sensibilidade à vasodilatação por SNP, observada em experimentos com anéis aórticos, pode ser explicada pela menor presença do ânion superóxido e pela preservação da via NO-cGMP.

Figura 21 – Estudo da viabilidade celular utilizando o composto MTT. Análise da viabilidade celular mediante aumento da concentração da associação de fitoterápicos em células endoteliais da veia de cordão umbilical humana. Cada barra representa a média e erro padrão médio (EPM) da porcentagem de fluorescência em relação ao controle dos dados obtidos em determinações independentes. *** expressa a diferença entre todos os grupos ($n = 3$) vs o triton ($n = 3$), utilizado com agente citotóxico.

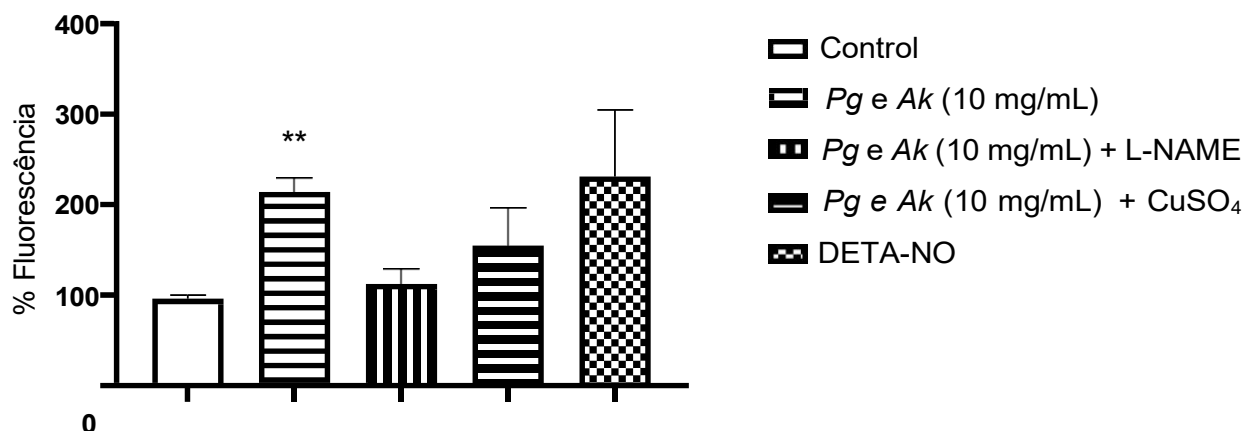


A Figura 22 fornece informações essenciais sobre o mecanismo de ação da combinação de plantas nas células endoteliais, especificamente em relação à produção de óxido nítrico (NO). O gráfico representa a porcentagem de fluorescência emitida pela sonda DAF, conhecida por ser utilizada para associar o aumento da fluorescência à formação de NO. Nela temos um grupo controle de HUVECs não tratadas ($96,105 \pm 2,388\%$, $n = 3$); a combinação de *Pg* e *Ak* a 10 mg/mL ($214,063 \pm 8,606\%$, $n = 3$); e o doador de óxido nítrico DETA-NO ($231,147 \pm 42,627\%$, $n = 3$). Os resultados demonstram que extratos na concentração de 10 mg/mL estimulam as células a produzir e liberar óxido nítrico, efeito comparável ao uso direto de um doador de NO.

Ainda é utilizado o L-NAME e CuSO_4 como ferramentas farmacológicas para investigar a via de liberação de NO. A associação de plantas na concentração de 10 mg/mL aumenta a produção de óxido nítrico ($214,063 \pm 8,606\%$, $n = 3$), conforme observado. Entretanto, quando essa mesma concentração de extratos é coincubada com L-NAME ($112,593 \pm 9,228\%$, $n = 3$) e CuSO_4 ($154,787 \pm 23,996\%$, $n = 3$), a produção de NO é reduzida, indicando a participação desses compostos na modulação da produção de óxido nítrico pelos extratos.

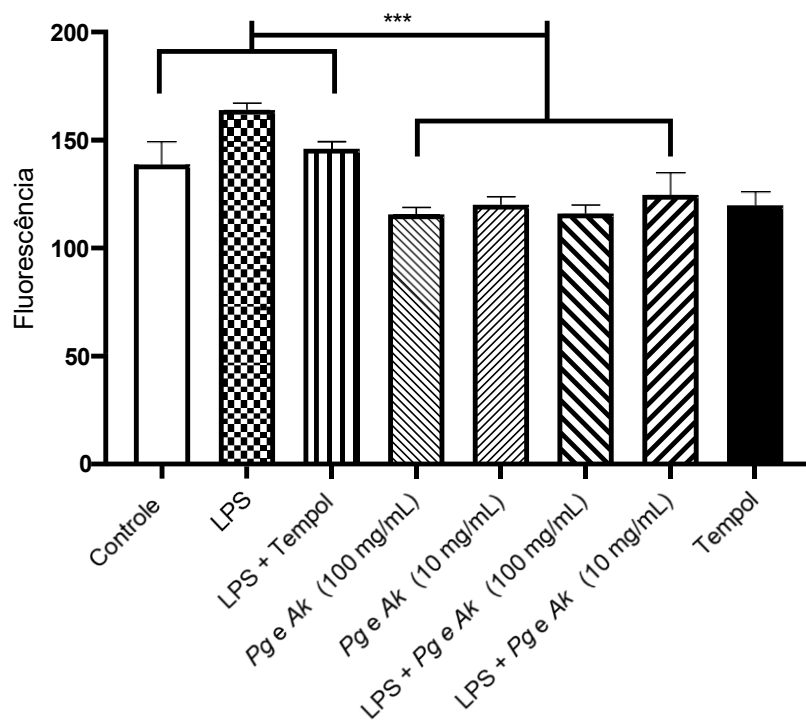
Figura 22 – Análise da produção de óxido nítrico em células endoteliais da veia umbilical humanas (Huvec). Gráfico de barra demonstrando o percentual médio de fluorescência refletindo a produção de óxido nítrico liberado por células endoteliais. Cada barra representa a porcentagem e erro padrão médio de fluorescência entre os grupos controle ($n = 3$), *Pg* + *Ak* na concentração de 1 mg/mL ($n = 3$), *Pg* + *Ak* na concentração de 10 mg/mL ($n = 3$) e do doador de óxido nítrico DETA-NO ($n = 3$).

* e ** representam a diferença entre os grupos *Pg* + *Ak* de 10 mg/mL e DETA-NO para os grupos controle e *Pg* + *Ak* 1 mg/mL, respectivamente e com os respectivos p-valores de 0.05 e 0.001.



A Lucigenina, uma sonda mais seletiva para ânion superóxido (O_2^-), uma espécie reativa de oxigênio que pode induzir vasoconstrição e, em excesso, disfunção endotelial, foi usada para avaliar o estresse oxidativo. A Figura 23 mostra a fluorescência de células controle não tratadas ($138,757 \pm 5,846\%$, $n = 3$); células tratadas com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ($164,007 \pm 1,799\%$, $n = 3$), conhecido por induzir a produção de ânion superóxido principalmente via ativação do complexo NADPH oxidase, mediada pela sinalização do receptor Toll-like 4 (TLR4); células tratadas com o agente antioxidante tempol ($119,81 \pm 3,421\%$, $n = 3$); e células tratadas com duas concentrações diferentes de *Pg* e *Ak* (10 mg/mL: $120,09 \pm 2,57\%$, $n = 3$) e 100 mg/mL ($115,68 \pm 2,21\%$, $n = 3$), bem como seus respectivos tratamentos em associação com o indutor de formação de ânion superóxido (LPS). Os resultados revelam que as concentrações de 10 mg/mL ($124,63 \pm 7,02\%$, $n = 3$) e 100 mg/mL ($116,025 \pm 2,705\%$, $n = 3$) dos extratos, em associação com LPS, reduziram significativamente a produção de ânion superóxido, superando inclusive o efeito do agente antioxidante tempol.

Figura 23 – Análise da produção de espécies reativas de oxigênio via sonda Lucigenina. Os resultados estão expressos na absorbância observada no tempo de 15 minutos, tempo escolhido devido ao estado de platô da técnica (ou seja, quando não houve mais aumento da fluorescência). *** indica diferenças entre LPS + *Pg* e *Ak* (nas concentrações de 10 e 100 mg/mL) e *Pg* e *Ak* (10 e 100 mg/mL) vs Controle os demais tratamentos: LPS e LPS + Tempol.



6.8 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho apresenta dados inéditos sobre o uso de plantas medicinais potencializando o efeito vasodilatador e hipotensor induzido pela luz. No entanto, precisamos ressaltar algumas limitações deste trabalho que podem ser facilmente sanadas com estudos futuros.

A primeira limitação é a utilização da pletismografia de cauda como modelo de análise da Pressão arterial. Como já mencionado, há estudo mostrando que é um modelo que pode trazer variáveis ao processo (Jamieson *et al.*, 1997), como movimentações dos animais, estresse, baixa ou alta temperatura da cauda, entre outros fatores.

Também é válido ressaltar a importância de se realizar estudos por outras vias de administração. A via utilizada neste trabalho (via intraperitoneal), é uma via importante de administração de fármacos, e traz consigo características interessantes para a sua utilização em estudos pré-clínicos, como por exemplo, a facilidade em administração (sendo mais executável que a via oral por gavagem), tem boa absorção sistêmica, é compatível com múltiplas administrações, além de ter menor volume do que a via oral. No entanto, é necessário estudos que se assemelham mais com a

administração de fitoterápicos em humanos, na forma de comprimidos ou soluções líquidas por via oral.

Outro ponto importante é a falta de estudos sobre farmacocinética e concentrações séricas de marcadores das plantas nos sangues destes animais. Esta é uma medida extremamente importante para definir parâmetros como tempo de meia vida, taxa de excreção, toxicidade e *wash-out* do organismo.

Em relação à aplicação do LASER, é importante definir uma área compatível em seres humanos com a aplicação caudal em roedores. Também padronizar dosagens de FBM em humanos, com atuação cardiovascular, já que não há estudos envolvendo esses parâmetros para aplicação cardiovascular.

Sobre as perspectivas futuras, com base nos resultados obtidos, diversas linhas de investigação podem ser exploradas:

- Estudos em modelos *in vivo*: A confirmação dos efeitos observados *in vitro* em modelos animais completos é essencial para validar a eficácia e segurança da associação FBM + fitoterápicos em condições fisiológicas mais complexas;
- Desenvolvimento de formulações combinadas: Avaliar a possibilidade de desenvolver sistemas de liberação tópica ou sistêmica que integrem FBM com compostos ativos derivados de *P. ginseng* e *A. keiskei*;
- Exploração de outros marcadores moleculares: Investigar a modulação de vias relacionadas ao estresse oxidativo, à inflamação vascular e a outras isoformas da NOS, como a iNOS, pode ampliar a compreensão dos mecanismos envolvidos;
- Avaliação clínica: Em longo prazo, ensaios clínicos controlados poderão avaliar a aplicabilidade dessa associação em pacientes com hipertensão resistente, disfunção endotelial ou outras condições vasculares crônicas;
- Interações farmacodinâmicas: A caracterização das interações entre FBM e diferentes classes de fitocompostos poderá abrir novas possibilidades terapêuticas, inclusive em doenças cardiovasculares associadas ao envelhecimento ou à síndrome metabólica.

7 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados desta tese demonstram que a associação de fotobiomodulação (FBM) com fitoterápicos como *Panax ginseng* e *Angelica keiskei* promove efeitos vasodilatadores superiores aos observados com as terapias isoladas, mesmo em condições de disfunção endotelial induzida pelo modelo Goldblatt 2R1C. Esses efeitos parecem ser mediados principalmente pela via do óxido nítrico (NO), com envolvimento da eNOS e, possivelmente, de mecanismos antioxidantes endógenos.

Os experimentos com anéis de aorta revelaram que tanto a FBM quanto os extratos vegetais atuam sinergicamente na restauração da reatividade vascular, com impacto positivo sobre a vasodilatação dependente do endotélio. Tais achados contribuem para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos e reforçam o potencial translacional de estratégias integrativas que aliem terapias não farmacológicas e compostos naturais na modulação da função endotelial.

8 REFERÊNCIAS

- AHN, H. Y. et al. *Panax ginseng* extract rich in ginsenoside protopanaxatriol offers combinatorial effects in nitric oxide production via multiple signaling pathways. *SpringerPlus*, v. 2, n. 1, p. 96, 2013. DOI: 10.1186/2193-1801-2-96.
- AMOROZO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 16, n. 2, p. 189–203, 2002.
- ANDERS, J. J.; LANZAFAME, R. J.; ARANY, P. R. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 33, n. 4, p. 183–184, 2015. DOI: 10.1089/pho.2015.9848.
- ARANY, P. R. et al. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. *Science Translational Medicine*, v. 6, n. 238, p. 238ra69, 2014.

BAI, C. X. et al. Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K⁺ current and the L-type Ca²⁺ current by ginsenoside Re, an ingredient of *Panax ginseng*, in guinea-pig cardiomyocytes. *British Journal of Pharmacology*, v. 142, n. 3, p. 567–575, 2004. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705814.

BAI, J. et al. Low level laser therapy promotes bone regeneration by coupling angiogenesis and osteogenesis. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 12, n. 1, p. 432, 2021. DOI: 10.1186/s13287-021-02493-5.

BOONLA, O. et al. Curcumin improves endothelial dysfunction and vascular remodeling in 2K-1C hypertensive rats by raising nitric oxide availability and reducing oxidative stress. *Nitric Oxide*, v. 42, p. 44–53, 2014. DOI: 10.1016/j.niox.2014.09.001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 136 p.

BRASILEIRO, B. G. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, Brasil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, n. 4, 2008.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 17, n. 10, p. 2675–2685, 2012.

BRYAN, N. S.; BIAN, K.; MURAD, F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Frontiers in Bioscience*, v. 14, p. 1–18, 2009.

BUZINARI, T. C. et al. Photobiomodulation induces hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Lasers in Medical Science*, v. 35, n. 3, p. 567–572, 2020. DOI: 10.1007/s10103-019-02849-7.

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. DOI: 10.1007/s10103-022-03551-x.

BYRNES, K. R. et al. Low power laser irradiation alters gene expression of olfactory ensheathing cells in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 37, n. 2, p. 161–171, 2005.

BYUN, J. W. et al. A successful helium-neon laser and topical tacrolimus combination therapy in one child with vitiligo. *Dermatologic Therapy*, 2015.

CHEN, A. C. H. et al. Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS ONE*, v. 6, n. 7, e22453, 2011.

CHEN, J. et al. Panax ginseng against myocardial ischemia/reperfusion injury: A review of preclinical evidence and potential mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 300, 115715, 2023. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115715.

DE LIMA, F. M. et al. Low-Level Laser Therapy restores the oxidative stress balance in acute lung injury induced by gut ischemia and reperfusion. *Photochemistry and Photobiology*, v. 89, n. 1, p. 179–188, 2013.

DE MORAES, L. H. O. et al. Multidrug-resistant protein inhibitor and phosphodiesterase inhibitor potentiate the vasodilator effect induced by photobiomodulation in isolated aortic rings. *Lasers in Medical Science*, v. 37, n. 2, p. 1209–1216, 2022. DOI: 10.1007/s10103-021-03374-2.

DIFFEY, B. L. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, v. 28, n. 1, p. 4–13, 2002. DOI: 10.1016/S1046-2023(02)00204-9.

DOS SANTOS CARVALHO SCHIAVON, M. 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. 1, p. 252, 2023. DOI: 10.1007/s10103-023-03918-8.

DUDZINSKI, D. M.; MICHEL, T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovascular Research*, v. 75, n. 2, p. 247–260, 2007.

EELLS, J. T. et al. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal

toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 100, n. 6, p. 3439–3444, 2003.

ERCEG, A. et al. The efficacy of pulsed dye laser treatment for inflammatory skin diseases: a systematic review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 69, n. 4, p. 609–615.e8, 2013.

FEELISCH, M. et al. Understanding the mechanism of NO scavenging by oxyhemoglobin and its physiological relevance. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 25, p. 14705–14708, 1995.

FERRARESI, C. et al. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3–6 hours. *Photochemistry and Photobiology*, v. 91, n. 2, p. 411–416, 2015.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FREIRE, F. et al. Photodynamic therapy of oral *Candida* infection in a mouse model. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 159, p. 161–168, 2016. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.03.049.

FURCHGOTT, R. F. et al. Relaxation of arterial strips by light, and the influence of drugs on this photodynamic effect. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 113, p. 29, 1955.

FURCHGOTT, R. F. et al. The photoactivated relaxation of smooth muscle of rabbit aorta. *Journal of General Physiology*, v. 44, p. 499–519, 1961.

GARCIA-CARDEÑA, G. et al. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 44, p. 27237–27240, 1996.

GARTHWAITE, J. et al. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Molecular Pharmacology*, v. 48, n. 2, p. 184–188, 1995.

GILLIS, C. N. *Panax ginseng* pharmacology: a nitric oxide link? *Biochemical*

Pharmacology, v. 54, n. 1, p. 1–8, 1997. DOI: 10.1016/s0006-2952(97)00193-7.

GINANI, F. et al. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. *Lasers in Medical Science*, v. 30, n. 8, p. 2189–2194, 2015.

GOW, A. J. et al. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 287, n. 2, p. L262–L268, 2004.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. *Fundamentals of Physics*. 10. ed. Hoboken: Wiley, 2013.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophysics*, v. 4, n. 3, p. 337–361, 2017.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *APL Photonics*, v. 2, n. 4, 041101, 2017. DOI: 10.1063/1.4973901.

HECHT, E. *Optics*. 5. ed. Boston: Pearson, 2016.

HUANG, S. J. et al. Photobiomodulation therapy to promote angiogenesis in diabetic mice with hindlimb ischemia. *Photobiomodulation, Photomedicine and Laser Surgery*, v. 39, n. 7, p. 453–462, 2021. DOI: 10.1089/photob.2020.4896.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 84, n. 24, p. 9265–9269, 1987.

JACQUES, S. L. Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in Medicine & Biology*, v. 58, n. 11, p. R37–R61, 2013. DOI: 10.1088/0031-9155/58/11/R37.

JOVANOVSKI, E. et al. Vascular effects of combined enriched Korean Red Ginseng (*Panax ginseng*) and American ginseng (*Panax quinquefolius*) administration in individuals with hypertension and type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Complementary Therapies in Medicine*, v. 49, 102338, 2020. DOI: 10.1016/j.ctim.2020.102338.

KARU, T. I. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life*, v. 62, n. 8, p. 607–610, 2010.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 49, n. 1, 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. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 649, p. 47–52, 2018. DOI: 10.1016/j.abb.2018.05.006.

KIL, Y. S. et al. *Angelica keiskei*, an emerging medicinal herb with various bioactive constituents and biological activities. *Archives of Pharmacal Research*, v. 40, n. 6, p. 655–675, 2017. DOI: 10.1007/s12272-017-0892-3.

LANDMESSER, U. et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n. 8, p. 1201–1209, 2003.

LIM, J. et al. Effects of low-level light therapy on streptozotocin-induced diabetic kidney. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 99, n. 2, p. 105–110, 2010.

LIM, W. et al. Modulation of lipopolysaccharide-induced NF- κ B signaling pathway by 635 nm irradiation via heat shock protein 27 in human gingival fibroblast cells. *Photochemistry and Photobiology*, v. 89, n. 1, p. 199–207, 2013.

MATSUNAGA, K.; FURCHGOTT, R. F. Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 248, n. 2, p. 687–695, 1989.

MIGLIARIO, M. et al. Near infrared low-level laser therapy and cell proliferation: The emerging role of redox sensitive signal transduction pathways. *Journal of Biophotonics*, v. 11, n. 11, e201800025, 2018.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology,

pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v. 43, n. 2, p. 109–142, 1991.

MORAES, T. F. et al. Energy-dependent effect trial of photobiomodulation on blood pressure in hypertensive rats. *Lasers in Medical Science*, v. 1, p. 1–6, 2020.

NICOLETTI, M. A. et al. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. *Revista Infarma Ciências Farmacêuticas*, v. 19, n. 1, p. 32–50, 2007.

Ogawa H, Okada Y, Kamisako T, Baba K. Beneficial effect of xanthoangelol, a chalcone compound from *Angelica keiskei*, on lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Mar;34(3):238-43. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04578.x. PMID: 17250645.

OISHI, J. C. et al. Hypotensive acute effect of photobiomodulation therapy on hypertensive rats. *Life Sciences*, v. 178, p. 56–60, 2017. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.04.011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. *Traditional medicine: definitions*. 2008. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/traditional-complementary-and-integrative-medicine>. Acesso em: 14 mai. 2023.

PASTORE, D.; GRECO, M.; PASSARELLA, S. Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. *International Journal of Radiation Biology*, v. 76, n. 6, p. 863–870, 2000.

PEDROTTI, F. L.; PEDROTTI, L. S.; PEDROTTI, L. M. *Introduction to Optics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2017.

PLASS, C. A. et al. Light-induced vasodilation of coronary arteries and its possible clinical implication. *Annals of Thoracic Surgery*, v. 93, n. 4, p. 1181–1186, 2012.

Qin GW, Lu P, Peng L, Jiang W. Ginsenoside Rb1 Inhibits Cardiomyocyte Autophagy via PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway and Reduces Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Am J Chin Med*. 2021;49(8):1913-1927. doi: 10.1142/S0192415X21500907. Epub 2021 Nov 13. PMID: 34775933.

QUIRK, B. J.; WHELAN, H. T. What lies at the heart of photobiomodulation: light,

cytochrome c oxidase, and nitric oxide - review of the evidence. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, v. 38, n. 9, p. 527–530, 2020. DOI: 10.1089/photob.2020.4905.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603–613, 2001.

REES, D. D. et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *British Journal of Pharmacology*, v. 101, n. 3, p. 746–752, 1990.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 1–14.

SILVA, R. B. L. A Etnobotânica de plantas medicinais da comunidade quilombola de Curiaú, Macapá-AP. 2002. 172 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Manaus, AM, 2002.

SHIN, W. et al. Korean red ginseng inhibits arginase and contributes to endothelium-dependent vasorelaxation through endothelial nitric oxide synthase coupling. *Journal of Ginseng Research*, v. 37, n. 1, p. 64–73, 2013. DOI: 10.5142/jgr.2013.37.64.

SUSSAI, D. A. et al. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. *Lasers in Medical Science*, v. 25, p. 115–120, 2010.

TSIKAS, D. Analysis of S-nitrosothiols in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 340, n. 1, p. 1–10, 2005.

TUCHIN, V. V. *Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis*. 3. ed. Bellingham: SPIE Press, 2015.

WELCH, A. J.; VAN GEMERT, M. J. C. (Ed.). *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue*. 2. ed. New York: Springer, 2011.

ZHANG, Y. et al. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 120, n. 5, p. 849–857, 2003.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. *Química Nova*, v. 33, n. 6, p. 1421–1428, 2010.

APÊNDICE A – Artigo 1

Enhancement of laser-induced vasodilation by medicinal plants: the eNOS-dependent and antioxidant actions of *Panax ginseng* and *Angelica keiskei*

Luis Henrique Oliveira de Moraes^{1,2*}, Camila Pereira Sabadini¹, Nayara Formenton da Silva¹, Thiago Augusto do Nascimento³, Tereza Cristina Buzinari⁴, Natália Fernanda do Couto², Shane A. Phillips², Gerson Jhonatan Rodrigues¹.

¹ Department of Physiological Sciences, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil.

² Department of Physical Therapy, College of Applied Health Science, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, United States of America

³ Chemistry Institute, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

⁴ Department of Physiology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Abstract

Photobiomodulation (PBM) is a promising non-pharmacological approach to improve vascular function via nitric oxide (NO)-mediated pathways. However, its effectiveness can be limited under conditions of endothelial dysfunction. This study investigated whether *Panax ginseng* and *Angelica keiskei*, two medicinal plants known for their antioxidant and vasorelaxant properties, can enhance PBM-induced vasodilation through mechanisms involving endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Aortic rings from Wistar rats were treated with increasing doses of a standardized plant extract combination and exposed to 660 nm laser irradiation. Optimal doses (50–200 mg/kg) significantly potentiated PBM-induced vasodilation, an effect abolished by pharmacological inhibition of NO signaling and endothelium removal. In a chronic eNOS inhibition model (L-NAME), the plant combination did not restore PBM effects but partially recovered acetylcholine-induced vasorelaxation, suggesting endothelial compensation. In mesenteric arteries, the herbal treatment improved acetylcholine sensitivity but did not alter flow-induced or laser-induced vasodilation, especially under hypertensive conditions. These findings highlight a synergistic interaction between phytotherapy and PBM, mediated primarily by eNOS activation and redox modulation, with potential translational relevance for vascular disorders.

Key-words: photobiomodulation, nitric oxide, endothelial function, vasodilation, *Panax ginseng*, *Angelica keiskei*, eNOS, antioxidant

APÊNDICE B – Artigo 2

Modulation of endothelial function by *Panax ginseng* and *Angelica keiskei* in experimental hypertension

Luis Henrique Oliveira de Moraes^{1,2*}, Camila Pereira Sabadini¹, Nayara Formenton da Silva¹, Thiago Augusto do Nascimento³, Raiani Maira Santana Simonato⁴, Tereza Cristina Buzinari⁵, Gerson Jhonatan Rodrigues¹

¹ Department of Physiological Sciences, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil.

² Department of Physical Therapy, College of Applied Health Science, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, United States of America.

³ Chemistry Institute, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Genetics and Evolution, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil.

Abstract

Endothelial dysfunction represents one of the main pathophysiological mechanisms of renovascular hypertension, contributing significantly to the progression of cardiovascular disease. This study investigated the effect of intermittent administration of a combination of *Panax ginseng* and *Angelica keiskei* in rats subjected to the 2-kidney-1-clip (2K1C) hypertensive model. Although the reduction in systolic blood pressure did not reach statistical significance, the treatment promoted improved endothelium-dependent vasodilation and increased sensitivity to nitric oxide, as evidenced by the concentration-response curves to acetylcholine and sodium nitroprusside. In vitro assays with human endothelial cells confirmed increased intracellular NO production and reduced superoxide anion, indicating the potent antioxidant action of the extracts. These effects appear to be mediated by ginsenosides and xanthoangelols, bioactive compounds capable of positively modulating eNOS activity and mitigating oxidative stress. The findings of this study suggest that the combination of *P. ginseng* and *A. keiskei* constitutes a promising herbal strategy for restoring endothelial function in the context of arterial hypertension.

Keywords: endothelial dysfunction; nitric oxide; oxidative stress; *Panax ginseng*; *Angelica keiskei*; hypertension; medicinal plants.

ANEXO A - Título do Anexo

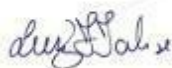
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Utilização de fitoterápicos para potencialização dos efeitos induzidos pelo LASER vermelho", protocolada sob o CEUA nº 4320090622 (ID 001788), sob a responsabilidade de **Gerson Jhonatan Rodrigues** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 08/05/2023.

We certify that the proposal "Use herbal medicines to potentiate the effects induced by red LASER", utilizing 120 Heterogenics rats (120 males), protocol number CEUA 4320090622 (ID 001788), under the responsibility of **Gerson Jhonatan Rodrigues** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 05/08/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**Vigência da Proposta: de 03/2023 a 06/2025 Área: **Ciências Fisiológicas**Origem: **Biotério Central da UFSCAR**Espécie: **Ratos heterogênicos**sexo: **Machos**idade: **40 a 60 dias**Quantidade: **120**Linhagem: **Wistar**Peso: **100 a 250 g**

São Carlos, 07 de agosto de 2025



Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

