

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas –
PIPGCF - Associação Ampla UFSCar/UNESP

LUIS HENRIQUE OLIVEIRA DE MORAES

ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS PARA POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO
VASODILATADOR INDUZIDO PELA FOTOBIMODULAÇÃO

SÃO CARLOS-SP

2021

LUIS HENRIQUE OLIVEIRA DE MORAES

ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS PARA POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO
VASODILATADOR INDUZIDO PELA FOTOBIMODULAÇÃO

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

Orientador: Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues

SÃO CARLOS-SP

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha irmã, Edinéia Aparecida de Carvalho Jesus, que faleceu no dia 19 de maio de 2021, por complicações cardiovasculares e Covid-19. Pessoa íntegra, especial e de bom coração, exemplo de filha, de mãe e de irmã para todos nós.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda força e proteção, me permitindo concretizar mais uma etapa da minha vida.

À minha mãe, Dilma de Fátima Oliveira, por todo o carinho, amor, incentivo e criação.

Às minhas irmãs, Edinéia Ap. C. Jesus (*in memoriam*) e Lucineia de Fátima C. Ribeiro, por todo o amor e cuidado ao longo da minha vida, e da vida das minhas sobrinhas lindas, Adrielle de Jesus e Gabrielle de Jesus, Elisa Ribeiro e Lívia Ribeiro.

Ao meu orientador - Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues - por toda a confiança, companheirismo, dedicação e ensinamentos que vão além do laboratório. Mostrou-se durante estes 7 anos de convivência um exemplo de profissional e humano, portanto, meus sinceros agradecimentos.

À Pesquisadora Luciana da empresa DMC por generosamente emprestar o equipamento principal pra execução do presente trabalho.

Aos professores e pesquisadores membros da banca examinadora, Dra. Daniela Bonaventura e Dra. Hilde Buzza, pela disponibilidade, críticas e sugestões que agregarão muito valor à minha dissertação.

Aos meus professores do Mestrado, os quais contribuíram grandiosamente para minha formação como Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aos meus antigos colegas de trabalho, Ariane Martinelli, Bárbara Macedo, Júlio Conceição, Jorge Oishi, Izabela Vatanabe, Carla Rodrigues, Thiago de Moraes e em especial, à Cynthia Castro e Tereza Buzinari, meus principais exemplos de pesquisadoras, que eu tenho muito carinho e admiração.

Aos meus atuais colegas de trabalho, Bianca, Patrícia Garest, Patrícia Correa, Vanessa Castro, Stefany e principalmente a: Bárbara Terroni, Camila P. Sabadini, Nayara S. Formenton Mayer, que suavizaram meus dias de luta por este título, me dando todo apoio, proteção, carinho e cumplicidade.

Às minhas companheiras de Mestrado, Lívia e Emily, por todo compartilhamento e amizade criada nestes dois anos.

Aos meus amigos David Maués, Henrique Matheus, Jaqueline Veríssimo e Lucas Oliveira, por serem meus alicerces durante toda essa jornada, me dando todo o carinho e força que eu precisava.

Ao meu grande companheiro Thiago Nascimento, por toda dedicação, companheirismo, sabedoria, paciência e serenidade, por me entender e fazer o que precisava para acalmar o coração.

Ao meu Psicólogo Paulo e a Médica Gabriela, por toda ajuda, dedicação e profissionalismo durante este período turbulento.

Ao Sr. Sérgio, por cuidar dos animais e por toda ajuda nos experimentos, além dos meus sinceros agradecimentos aos funcionários do Biotério Central pelo cuidado no tratamento dos animais, e ao Professor Wladimir R. Beck por ceder gentilmente um espaço no Biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia.

À funcionária Janaína, por toda prestação de serviço para o nosso Departamento.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), pelo auxílio financeiro para realização desta pesquisa.

Aos ratos Wistar, que involuntariamente doaram suas vidas para a conclusão deste trabalho em prol do estudo de base de terapias utilizadas na saúde humana.

E agradeço também a todos que torceram por mim e que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão deste trabalho.

Muito obrigado!

"A melhor de todas as coisas é aprender.

*O dinheiro pode ser perdido ou
roubado, a saúde e força podem falhar, mas o que você
dedicou à sua mente é
seu para sempre."*

- Louis L. Amour

RESUMO

Trabalhos anteriores indicam que o LASER vermelho (660 nm) induz relaxamento vascular por um mecanismo dependente do Óxido Nítrico (NO). O NO ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC), que produz cGMP, o principal efetor na via de vasodilatação. Uma estratégia farmacológica interessante é controlar os níveis de cGMP intracelular, evitando seu efluxo (com bloqueadores de proteínas multirresistentes, como o MK-571 e a probenecida), ou prevenindo sua degradação (com o sildenafil, que inibe a enzima responsável pela degradação do cGMP, a fosfodiesterase-5 PDE5). O objetivo deste trabalho foi estudar estratégias farmacológicas para melhorar o efeito vasodilatador do LASER em ratos normotensos e hipertensos L-NAME. Foi realizado estudo de reatividade vascular em anéis aórticos isolados de ratos normotensos e hipertensos, com aplicação única de LASER e tratamento com nitroprussiato de sódio (NPS). Em anéis aórticos de ratos normotensos, o MK-571, a probenecida e o Sildenafil potencializaram o relaxamento induzido pelo LASER, em comparação ao controle. A vasodilatação induzida pelo NPS também foi potencializada pelo MK-571, probenecida e Sildenafil, em comparação ao controle. Em anéis aórticos de ratos hipertensos, o efeito vasodilatador induzido pelo LASER e pelo NPS foi potencializado apenas pelo MK-571, em comparação ao controle, sem potencialização pelo Sildenafil. Os resultados põem em evidência que a vasodilatação induzida pelo LASER vermelho é potencializada por MK-571, probenecida e sildenafil em anéis aórticos de ratos normotensos. Porém, em anéis aórticos de ratos hipertensos L-NAME a potencialização na vasodilatação foi induzida apenas pelo MK-571.

Palavras-chave: proteínas multirresistentes; fosfodiesterase, fotobiomodulação; hipertensão; vasodilatação, óxido nítrico.

ABSTRACT

Previous work indicates that the red LASER (660 nm) induces vascular relaxation by a mechanism Nitric Oxide (NO) dependent. NO activates soluble guanylate cyclase (sGC), which produce cGMP, the main effector in the vasodilation pathway. An interesting pharmacological strategy is to control the levels of intracellular cGMP, preventing its efflux (with Multidrug Resistant Proteins blockers, such as MK-571 and probenecid), or preventing its degradation (such as Sildenafil, which inhibits the enzyme responsible for cGMP degradation, the phosphodiesterase-5 PDE5). The aim was to study pharmacological strategies to improve vasodilation LASER effect in normotensive and L-NAME hypertensive rats. It was performed vascular reactivity study in isolated aortic rings from normotensive and hypertensive rats, with a single LASER application and Sodium Nitroprusside (SNP) treatment. In aortic rings from normotensive rats, MK-571, probenecid and Sildenafil potentiated the relaxation induced by LASER, compared to control. The vasodilation induced by SNP was potentiated by MK-571 and Sildenafil, compared to control. In aortic rings from hypertensive rats, vasodilation effect induced by LASER and by SNP was potentiated just by MK-571, compared to control, with no potentiation by Sildenafil. The results support the evidence that the vasodilation induced by red LASER is potentiated by MK-571 and sildenafil in aortic rings from normotensive rats. However, in aortic rings from L-NAME hypertensive rats the potentiation in vasodilation was induced just by MK-571.

Key-Words: multidrug resistance proteins; phosphodiesterase, photobiomodulation; hypertension; vasodilation, nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do Sildenafil

Figura 2: Fórmula estrutural da probenecida e do MK-571

Figura 3: Registro representativo obtido de experimentos de reatividade vascular, por Software LabChart do protocolo de ratos normotensos.

Figura 4: Registro representativo obtido de experimentos de reatividade vascular, por Software LabChart do protocolo de ratos hipertensos.

Figura 5: Registro representativo obtido de experimentos de reatividade vascular, por Software LabChart de ratos normotensos. O estoque de NO foi removido pela L-cisteína e após recuperação pelo NPS, com consequente efeito vasodilatador LASER.

Figura 6: Vasodilatação induzida por LASER vermelho em anéis aórticos de ratos normotensos.

Figura 7: Vasodilatação induzida por NPS em anéis aórticos de ratos normotensos.

Figura 8: Vasodilatação induzida por LASER vermelho em anéis aórticos de ratos normotensos controle e ratos submetidos a tratamento com extrato de beterraba.

Figura 9: Vasodilatação induzida por LASER vermelho em anéis aórticos de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME).

Figura 10: Vasodilatação induzida por LASER vermelho em anéis aórticos de ratos normotensos pré-NPS e pós-NPS.

Figura 11: Vasodilatação induzida por LASER vermelho em anéis aórticos de ratos hipertensos (L-NAME).

Figura 12: Vasodilatação induzida por LASER vermelho em anéis aórticos de ratos hipertensos (L-NAME), após tratamento com NPS.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LLLT- *Low Level Laser Therapy*

GCs – Guanilato Ciclase Solúvel

NO – (do inglês, *Nitric Oxide*) Óxido Nítrico

NPS – Nitroprussiato de Sódio

PDE-5 – Fosfodiesterase-5

ATP – Adenosina Trifosfato

eNOS – NO Sintase endotelial

GMPc – Guanosina Monofosfato cíclica

AMPc – Adenosina Monofosfato cíclica

PKA – Proteína Quinase A

PKG – Proteína Quinase G

COX-1 – Ciclooxigenase 1

COX-2 – Ciclooxigenase 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
3. HIPÓTESE.....	20
4. OBJETIVOS.....	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÃO.....	39
8. REFERÊNCIAS.....	41
9. ANEXOS.....	60

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Terapia a LASER de baixa potência (do inglês, *Low Level Laser Therapy* - LLLT), atualmente relatada como terapia de fotobiomodulação ou simplesmente fotobiomodulação, apresenta-se como alternativa mais econômica, sem (ou com poucos) efeitos colaterais; sendo um método não invasivo e indolor, além de ter sido usada desde 1971, para acelerar a cicatrização de feridas e, atualmente, para o tratamento do vitiligo (Byun et al., 2015), psoríase, acne e outras dermatites (Erceg et al., 2013). A fotobiomodulação reduz processos inflamatórios e edema, altera as respostas micro e macrovasculares e é capaz de promover analgesia (Tomimura et al., 2014).

Em 1955, observou-se em um estudo realizado em miógrafo, que a luz promoveu o relaxamento do vaso sanguíneo (Furchgott et al., 1955). Mais tarde, vários autores demonstraram que há foto-relaxamento com diferentes comprimentos de onda. Desde então, vários estudos têm mostrado várias fontes de luz capazes de promover o relaxamento do músculo liso vascular (Furchgott et al., 1987; Matsunaga e Furchgott, 1989; Plan et al., 2012).

Anteriormente, verificamos que a aplicação aguda de LASER vermelho (660 nm) induziu um importante efeito hipotensivo de longa duração em ratos hipertensos (delta sistólico em torno de: -24,5 mmHg), com aproximadamente 50 minutos de efeito hipotensor. No mesmo trabalho, o LASER vermelho (660 nm) induziu efeito de vasodilatação em anéis aórticos isolados de ratos, por um mecanismo dependente de NO e independente de endotélio e da enzima NO Sintase endotelial (Oishi et al., 2017). Há evidências na literatura de que o NO seja liberado de estoques teciduais, com a fotobiomodulação feita pelo comprimento de onda 660 nm (Oishi et al., 2017; Keszler et al., 2019). Desta forma, diferentes concentrações de estoque de NO podem modular este efeito vasodilatador.

A enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) é o principal alvo do NO, enzima a qual é responsável por catalisar a saída de dois grupos fosfato da molécula de trifosfato de guanosina (GTP), resultando na produção de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (Rapport et al., 1983). Como um segundo mensageiro, GMPc ativa a proteína quinase dependente de GMPc

(PKG), que fosforila proteínas celulares no músculo liso vascular responsáveis pelos efeitos vasodilatadores induzidos pelo NO (Gewaltig et al., 2002).

Uma vez formado, o GMPc pode sofrer diferentes ações: pode ativar seu alvo principal (PKG), pode ser degradado pela enzima fosfodiesterase (PDE), ou pode sofrer efluxo para o ambiente extracelular, por meio de transportadores conhecidos como proteínas de resistência a múltiplas drogas (do inglês, *Multidrug Resistant Protein* - MRP) (Jedlitschky et al., 2000).

Em células endoteliais coronárias humanas e células musculares lisas vasculares, foi verificado a presença de MRP4 e MRP5 (Sassi et al., 2008). Alguns estudos relatam que a expressão de MRP4 é elevada na artéria pulmonar de pacientes com hipertensão pulmonar, em artérias de ratos submetidos à hipóxia (Haraet al., 2011) e em plaquetas de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização (Mattiolo et al., 2011).

O objetivo principal deste trabalho foi estudar ferramentas farmacológicas para potencializar o efeito vasodilatador induzido pela luz LASER vermelha de baixa potência (660 nm) em vasos isolados, utilizando drogas capazes em atuar na via do GMPc, tanto inibindo seu efluxo quanto controlando sua degradação, além de identificar drogas capazes de potencializar o relaxamento em tecido de baixo estoque de NO, usando anéis aórticos de ratos hipertensos induzidos por cloridrato de éster metílico de N (G) - nitro-L-arginina (L-NAME).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Mecanismo de vasodilatação

Sendo uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas, o óxido nítrico (NO) possui baixo peso molecular, sendo solúvel tanto em meio hidrofílico, quanto hidrofóbico. Tais características conferem ao NO alta difusibilidade ($3300 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) pelas células, sendo classificado como mensageiro biológico, que independe de transportadores específicos (Chen et al., 2007). Portanto, as ações fisiológicas do NO estão mais relacionadas a suas propriedades físico-químicas do que necessariamente por sua conformação espacial e interações com receptores de membrana (Feldman et al., 1993).

O NO é considerado um importante modulador fisiológico do tônus vascular, possuindo ação fisiológica sobre diversos leitos vasculares, produzindo efeito vasodilatador por diversos mecanismos, com o objetivo de diminuir a concentração intracelular de cálcio $[\text{Ca}^{2+}]$ no músculo liso vascular (Ignarro, 2000). No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs), alterando a conformação desta enzima, tornando-a ativa. A enzima GCs catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (Rapoport et al., 1983).

O GMPc é um segundo mensageiro capaz de ativar a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), esta proteína realizar a fosforilação de diversas proteínas celulares, resultando no relaxamento do músculo liso vascular devido à diminuição do influxo de Ca^{2+} , através da inibição da liberação e/ou aumento do armazenamento de Ca^{2+} no retículo sarco-endoplasmático (Gewaltig e Kojda, 2002). O NO também é capaz de promover relaxamento por via independente de GMPc. No caso, esta pequena molécula realiza ativação direta dos canais de potássio, resultando em hiperpolarização da membrana celular (Bolotina et al., 1994) e ativação da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático aumentando o armazenamento do Ca^{2+} no interior desta organela (Cohen et al., 1999).

2.3 Mecanismos de regulação intracelular do GMP cíclico

Um sinal bioquímico gerado por um hormônio ou neurotransmissor é capaz de gerar uma resposta biológica no interior da célula. Este processo denominamos de “transdução de sinal”, mecanismo pelo qual pode ser classificado em dois grupos: Transdução de sinal através de receptores intracelulares e transdução de sinal através de receptores de superfície celular ou de membrana. O AMPc e o cálcio são os mensageiros secundários de maior representatividade, embora as células possuam sistemas de sinalização mais especializados, como por exemplo, o sistema da Guanilato Ciclase solúvel (GCs) (produzindo o segundo mensageiro GMPc) e o Óxido Nítrico (Champe e Harvey, 1994).

A GCs é responsável por diversas funções fisiológicas, através da conversão de GTP em seu segundo mensageiro, o GMPc. É uma proteína citosólica heterodimérica que apresenta quatro subunidades: duas α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) que são as subunidades maiores e duas β ($\beta 1$ e $\beta 2$), subunidades menores. Cada uma destas subunidades possui um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme), além de uma região de dimerização, e, um domínio catalítico C-terminal. Vale ressaltar que é necessário a expressão das duas subunidades para que ocorra a atividade catalítica da enzima (Rothkegel et al., 2006).

Diversas moléculas ativam a GCs, sendo o óxido nítrico a principal molécula endógena que é capaz de ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-ferrosnitrosil. Esta ligação promove mudanças conformacionais na enzima GCs, levando sua ativação e consequente produção de GMPc (Piora et al., 2011; Danielewski et al., 2005). Dentre os efeitos produzidos pelo GMPc no músculo liso, podemos citar os seguintes mecanismos: (1) inibição da geração de IP₃; (2) aumento do sequestro de Ca²⁺ citosólico; (3) desfosforilação da cadeia leve da miosina; (4) inibição do influxo de Ca²⁺; (5) ativação de Proteínas Kinases; (6) estimulação da Ca²⁺-ATPase de membrana (7) e abertura de canais de potássio (Keh et al., 1996; Pernollet et al., 1996; Mayer et al., 1998; Trepakova et al., 1999). Alguns doadores de óxido nítrico, como o nitroprussiato de sódio (NPS), são bastante utilizados como ferramenta para se entender o papel fisiológico e patológico da via do NO-GMPc (Feelisch et al., 1998).

No que diz respeito ao controle intracelular de GMPc, há uma família de proteínas envolvidas no transporte de drogas e metabólitos endógenos através das membranas celulares, as quais são chamadas de “proteínas de resistência à multidrogas” (ou Transportadores ABC), que compreendem 7 subfamílias (MRP1, MRP2, MRP3 e etc.). A identificação e caracterização da MRPs foram iniciadas em 1992, com a clonagem da MRP1 (Pankey et al., 2011). De modo geral, as MRPs realizam o efluxo de diversas substâncias, de forma unidirecional (do meio intracelular para o meio extracelular) com gasto de uma molécula de ATP de energia, sendo a isoforma 4 a responsável pela extrusão de diversas substâncias, dentre elas os nucleosídeos cíclicos AMPc e GMPc (Jedlitschky et al., 2000).

Estudo anterior demonstrou que a expressão proteica do MRP4 está elevada em artérias pulmonares de pacientes com hipertensão pulmonar, comparada as artérias pulmonares de indivíduos controle, além de que, em camundongos com MRP4 silenciada há um aumento expressivo de GMPc e AMPc intracelular bem como valor reduzido destes nucleotídeos cíclicos no meio extracelular (Hara et al., 2011). Foi visto também que, o aumento dos níveis intracelulares de AMPc e GMPc após inibição de MRP4 levou ainda a maior ativação de PKA e PKG (Hara et al., 2011; Decouture et al., 2015). Estes dados corroboram com a ideia de que o bloqueio desta proteína pode ser uma estratégia interessante para o aumento dos efeitos biológicos do GMPc em células do músculo liso vascular.

2.4 Drogas que atuam na via do GMP cíclico

Neste trabalho, foram prospectadas drogas que tivessem relato na literatura sobre ação inibitória na via de degradação ou de extrusão do GMPc. Àqueles relacionados a inibição de degradação do GMPc são os inibidores de Fosfodiesterase-5 (PDE-5), como o Sildenafil. Já para evitar a extrusão de GMP cíclico, foi utilizado a Probenecida e o MK-571, que são agentes farmacológicos capazes de bloquear o transportador ABC.

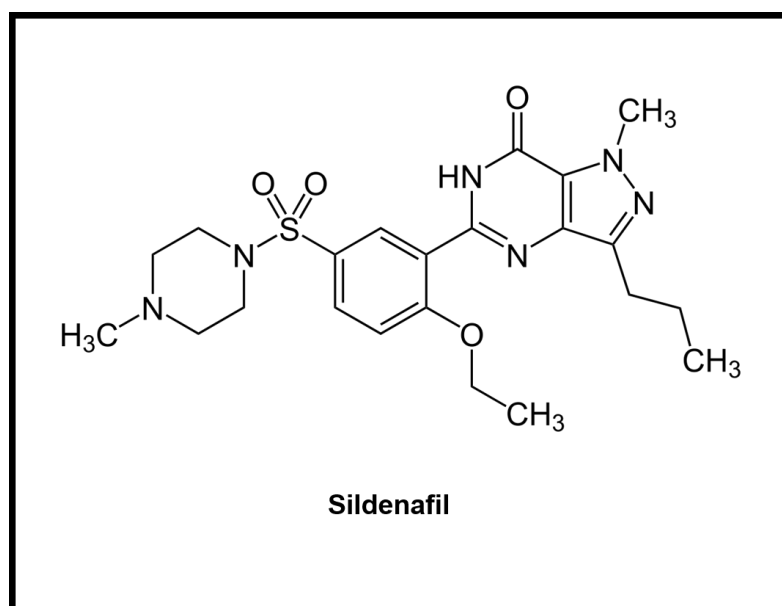
2.4.1 Sildenafil

O sildenafil, um inibidor da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), é um medicamento aprovado pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos

utilizado para o tratamento de hipertensão arterial pulmonar e disfunção erétil (Velayati et al., 2016; Yafi et al., 2017). Este medicamento é capaz de reduzir a degradação do GMPc, aumentando assim a sensibilidade do músculo liso vascular ao NO endógeno e exógeno, promovendo vasodilatação (Bivalacqua et al., 2013). De fato, melhorias na função endotelial foram relatadas após o uso de sildenafil em diferentes populações (Deyoung et al., 2012; Halcox et al., 2002; Schwartz et al., 2013).

As interações do sildenafil com outras drogas que não sejam doadores de NO também são possíveis. Níveis elevados de GMPc modulam a atividade de outras isoformas de fosfodiesterase (por exemplo, fosfodiesterase 3) *in vitro* (Wallis et al., 1999; Degerman et al., 1997; Lugnier et al., 1999). Logo, é plausível que a interação com a luz possa potencializar os efeitos deste fármaco.

Fig. 1: Fórmula estrutural do Sildenafil.



2.4.2 Probenecida

A probenecida é um agente uricosúrico utilizado na clínica para o tratamento de gota, e vem sendo estudado com associação a outros fármacos pela sua capacidade de bloquear de forma inespecíficas as MRPs (Giacomini et al., 2010). Foi verificado que a probenecida é capaz de aumentar, por exemplo, a exposição de N-acetilcisteína no cérebro e também no plasma, a

partir da inibição das isoformas MRP1 e MRP3. A fins de conhecimento, a maior exposição de N-acetilcisteína cerebral revela-se como uma terapia antioxidante em determinadas fisiopatologias relacionadas ao sistema nervoso central (Hagos et al., 2017).

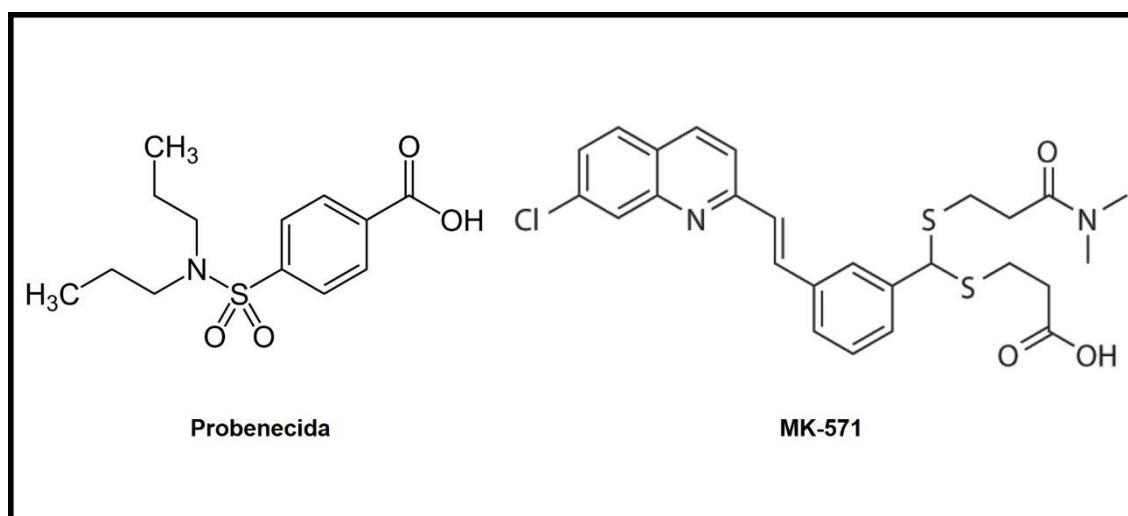
2.4.3 MK-571

Por inibir de modo eficaz os transportadores ABC, o MK 571 ((3-(3-(2-(7-chloro-2-quinolinyl) ethenyl) phenyl) ((3-dimethylamino) oxopropyl) thio) methyl) thio) propanoic acid) é uma das principais ferramentas farmacológicas utilizadas para se avaliar o papel destas proteínas. Sua ação ocasiona o aumento intracelular de nucleotídeos cíclicos em diferentes tipos celulares e tecidos, como artérias (Hara et al., 2011), fibroblastos (Sinha et al., 2013) e plaquetas (Borgognone et al., 2012).

Estudos demonstraram que o MK-571 é capaz de exercer um inotropismo cardíaco positivo, além de relaxamento da musculatura lisa de artéria pulmonar diante do maior acúmulo intracelular de AMPc visto em pacientes (Carillion et al., 2015) e de AMPc e GMPc em animais (Hara et al., 2011).

Diante da importante propriedade de inibição da extrusão de GMPc e AMPc para o meio extracelular, através dos transportadores ABC, e lembrando que os nucleotídeos cíclicos são mediadores importantes no controle de vários processos cardiovasculares e plaquetários, o estudo destas proteínas e o entendimento do seu papel na fisiologia Cardiovascular é importante para o desenvolvimento de terapias eficientes para o tratamento de patologias como aterosclerose (Belleville-Rolland et al., 2016) e trombose (Jedlitschky et al., 2012), além de estudos em pesquisa básica, como a potencialização do efeito da luz via acúmulo de GMPc (Moraes et al., 2021).

Fig. 2: Fórmula estrutural da Probenecida e do MK-571



2.5 Formação de estoques de Óxido Nítrico

A S-nitrosilação é um processo fisiológico de extrema importância para a função cardiovascular (Stamler, 1994; Wink et al., 1998; Maron; Tang; Loscalzo, 2013) sendo capaz de regular vários mecanismos celulares, como atividades enzimáticas, manutenção do equilíbrio redox intracelular e a morte celular programada (Hess et al., 2005).

Neste processo, há a ligação do NO a um determinado metal de transição ou também há a possibilidade de ligação a um grupamento tiol. Se este processo ocorre no grupo tiol de uma cisteína, a reação é denominada s-nitrosilação. Se esta reação ocorre em um metal de transição, denominaremos de nitrosilação de metal (Fernando et al., 2019).

Os S-nitrosotióis agem como doadores de NO através de um processo denominado denitrosilação, o qual consiste na clivagem homolítica da ligação S-Nitrosil, ocorrendo na presença de agentes redutores como: íons metálicos de cobre (Cu^{2+}), ascorbato, aumento da temperatura e luz ultravioleta (UV), (Manoj et al., 2009; Zhang et al., 2017; Fernando et al., 2019) há relatos também que podem ocorrer por Fotobiomodulação (Oishi et al., 2017; Keszler et al. 2018). Sendo a fotólise uma maneira alternativa de obter a clivagem da ligação S-Nitrosil (Hunter; Schoenfisch, 2015).

2.6 Fotobiomodulação no tecido vascular

Como já destacado, a fotobiomodulação surge como um método menos dispendioso, não invasivo e indolor, já sendo utilizado para diversos tratamentos na estética, odontologia e fisioterapia.

Além dos pontos já citados, sabe-se que em modelo animal, a irradiação de ratos com LASER vermelho (660 nm) induz aumento de PPAR γ em lavado bronquioalveolar (de Lima et al., 2013). Lim e colaboradores (Lim et al., 2013) verificaram, em cultura de fibroblastos humanos, que a irradiação com LASER vermelho (635 nm), em baixa potência, diminuiu a produção de prostaglandina E2 (PGE2), bem como diminuiu a expressão da cicloxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2).

Considerando-se que o LASER vermelho (660 nm) pode induzir liberação de NO, aumentar a expressão PPAR γ , e diminuir a expressão de COX-1 e COX-2; esta faixa de LASER pode ser útil na melhora da função endotelial, e da inflamação vascular observada na Hipertensão Arterial. Considerando também que há aumento de NO provindo da reação de fotólise diante da fotobiomodulação (Keszler et al., 2019), e que este NO seja capaz de perfundir o músculo liso e ativar a Guanilato Ciclase solúvel, elevando a produção de GMPc, então temos uma estratégia interessante que consiste em bloquear os meios de degradação e extrusão de GMPc a fim de aumentar o efeito vasodilatador tanto em ratos normotensos quanto em ratos hipertensos no modelo L-NAME, como foi proposto neste trabalho.

HIPÓTESE

3 HIPÓTESE

Bloqueadores de MRPs e/ou a inibição de fosfodiesterase potencializa o efeito vasodilatador induzido pelo LASER vermelho (660 nm).

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Identificar drogas capazes de potencializar o efeito vasodilatador induzido pelo LASER vermelho (660 nm), atuando em vias de sinalização no músculo liso, envolvendo tanto a inibição da degradação quanto o bloqueio do efluxo de GMP cíclico intracelular.

4.2 Objetivos Específicos

- Verificar qual droga proporciona a maior eficácia na vasodilatação induzida pelo LASER vermelho, em anéis aórticos isolados;
- Em ratos hipertensos (modelo L-NAME), verificar se o efeito vasodilatador induzido pelo LASER vermelho é potencializado por estas drogas;
- Verificar se em anéis aórticos de ratos normotensos a utilização prévia do extrato de beterraba potencializa o efeito vasodilatador induzido pelo LASER;
- Verificar a dependência de estoques de óxido nítrico para o efeito vasodilatador induzido pelo LASER;

MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 21 ratos Wistar machos (entre 180 a 250 g), fornecidos pelo Hospital Central de Animais da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos, sob o número de protocolo: 7936070618.

Para o modelo de rato hipertenso induzido por cloridrato de éster metílico de N (G) -nitro-L-arginina (L-NAME), a droga foi administrada na água de beber dos animais, para aumentar os valores da pressão arterial por inibição da produção de nítrico óxido por NOS (óxido nítrico sintase), causando um desequilíbrio entre fatores vasoconstritores e fatores vasodilatadores (Rodrigues et al., 2017). O tratamento da água da bebida foi realizado por 2 semanas, e a pressão desses ratos foi medida por meio do software LabChart.

5.2 Parâmetros do laser

Foi utilizado o equipamento Photon Laser da empresa DMC Equipments, programado com comprimento de onda de 660 nm, potência de 100 mW (área do spot: 0,0586 cm²) por 56 segundos, sob irradiância de 1,71 W/cm², resultando na energia de 5,6 Joules por aplicação.

5.3 Reatividade vascular

Para registro da tensão isométrica, foram utilizados preparos de aorta torácica isolados desses ratos, os quais foram eutanasiados por decapitação. A artéria aórtica foi retirada, isolada e dissecada, sendo cortada em anéis de aproximadamente 4 mm de comprimento e mantida em solução de Krebs. Os anéis aórticos foram montados no miógrafo entre dois ganchos de metal e mantidos em banho de órgão isolado contendo 5 mL de solução fisiológica de Krebs, para análise da tensão isométrica. Os anéis aórticos foram estimulados com fenilefrina EC50 (0,1 µmol/L) até que as contrações fossem reproduzidas (Paulis et al., 2010). Para ambos os protocolos era necessária a presença de endotélio, portanto, os experimentos foram conduzidos somente em aortas de ratos que apresentavam relaxamento mínimo de 80% para os animais

normotensos, e relaxamento mínimo de 60% para animais hipertensos, após a aplicação da Acetilcolina (1 $\mu\text{mol/L}$). Após estes testes, foram iniciados protocolos específicos para cada objetivo. Para estabilização, as preparações permaneceram em repouso por 60 minutos sob tensão basal de 1,5 g.

Foram realizados os seguintes protocolos: Tanto em ratos normotensos quanto em ratos hipertensos, houve incubação prévia do fármaco (com MK-57, probenecida, nitrito de sódio ou sildenafil) por 30 minutos, ou nenhuma incubação do fármaco correspondente ao grupo controle. Após esse tempo, as aortas foram estimuladas com fenilefrina EC_{50} (0,1 $\mu\text{mol/L}$) e foi realizada a aplicação do LASER diretamente nos anéis aórticos. (

Após a aplicação do LASER pode-se verificar relaxamento, com posterior estabilização do tônus anterior, e novo tratamento foi realizado com aplicação única de Nitroprussiato de Sódio (NPS) em baixa concentração (2×10^{-9} M) conforme consta no registro representativo (Figuras 3 e 4). O NPS foi utilizado como controle positivo, como doador de óxido nítrico.

Fig. 3: Registro representativo obtido de experimentos de reatividade vascular, por Software LabChart do protocolo de ratos normotensos.

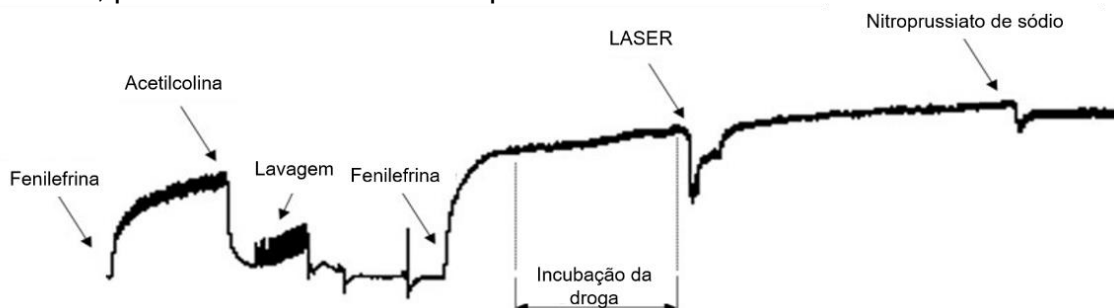
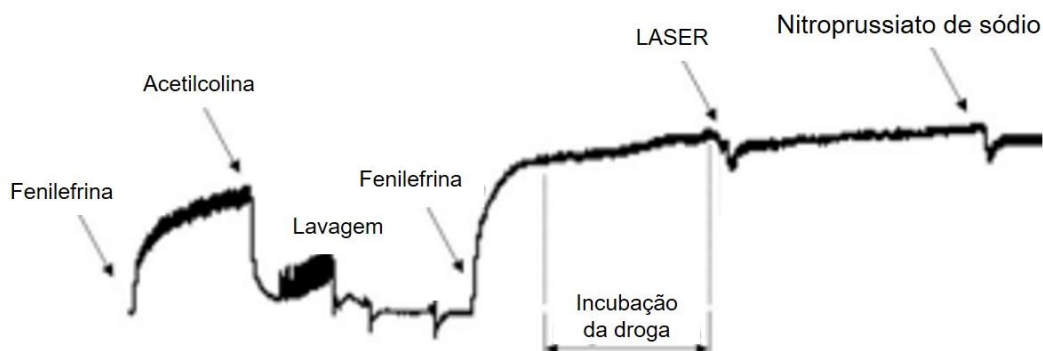


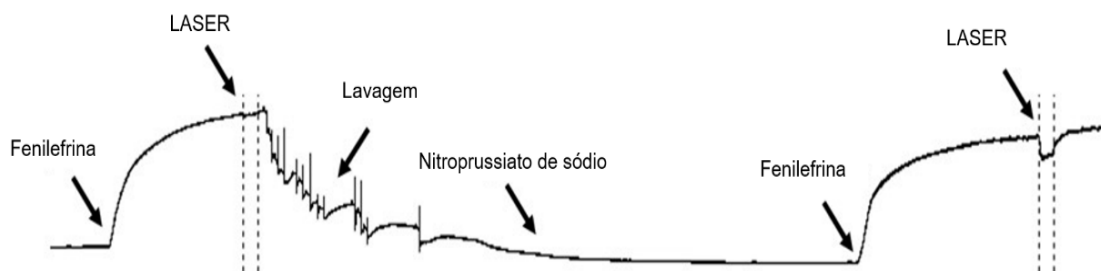
Fig. 4: Registro representativo obtido de experimentos de reatividade vascular, por Software LabChart do protocolo de ratos hipertensos.



Em outro protocolo, o cloridrato de L-cisteína (3 M) foi incubado por 30 minutos, para remover o estoque de tecido de NO (Alencar et al., 2003). Após o tratamento, foi realizada pré-contração (Fenilefrina 10^{-7} M) com posterior aplicação de LASER.

Na aplicação do LASER, os anéis aórticos foram lavados várias vezes com solução de Krebs para retornar à tensão basal antes da contração com fenilefrina. Quando a tensão basal foi atingida, o NPS do fármaco (2×10^{-9} M) foi incubado por 30 minutos, para restaurar o estoque de NO no tecido e uma nova contração foi feita com fenilefrina. Após estabilizar a contração, novo estímulo LASER foi realizado e foi observada resposta vasodilatadora (Figura 3).

Figura 5: Registro representativo obtido de experimentos de reatividade vascular, por Software LabChart de ratos normotensos. O estoque de NO foi removido pela L-cisteína e após recuperação pelo NPS, com consequente efeito vasodilatador LASER.



5.4 Análise estatística

Após a coleta, a análise estatística dos resultados foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0. Os dados foram analisados adequadamente usando ANOVA de uma via seguida por um pós-teste de Newman-Keuls para determinar a significância da diferença entre os grupos dentro do mesmo ensaio. Foi adotado nível de significância de 5% para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em anéis aórticos de ratos normotensos, o MK-571 ($46,20 \pm 5,45\%$; $n = 6$), a probenecida ($40,12 \pm 4,40\%$; $n = 6$) e o sildenafil ($59,40 \pm 1,86\%$; $n = 6$) potencializaram o relaxamento induzido pelo LASER, em comparação ao controle ($26,46 \pm 1,62\%$; $n = 6$) como mostrado na figura 6. Como controle positivo, foi usada baixa concentração de NPS como doador de NO, para induzir vasodilatação. Como esperado, a vasodilatação induzida pelo NPS foi potencializada por Sildenafil ($85,58 \pm 8,64\%$; $n = 6$), MK-571 ($51,51 \pm 19,55\%$; $n = 6$) e probenecida ($25,351 \pm 19,682\%$; $n = 6$) em comparação com o controle ($5,62 \pm 2,21\%$, $n = 6$, $p < 0,05$), conforme mostrado na figura 7.

Figura 6: Vasodilatação induzida por LASER vermelho em anéis aórticos de ratos normotensos. * representa a diferença entre Controle vs MK-571; Probenecida vs Controle e Sildenafil vs Controle, com valor de $p < 0,05$.

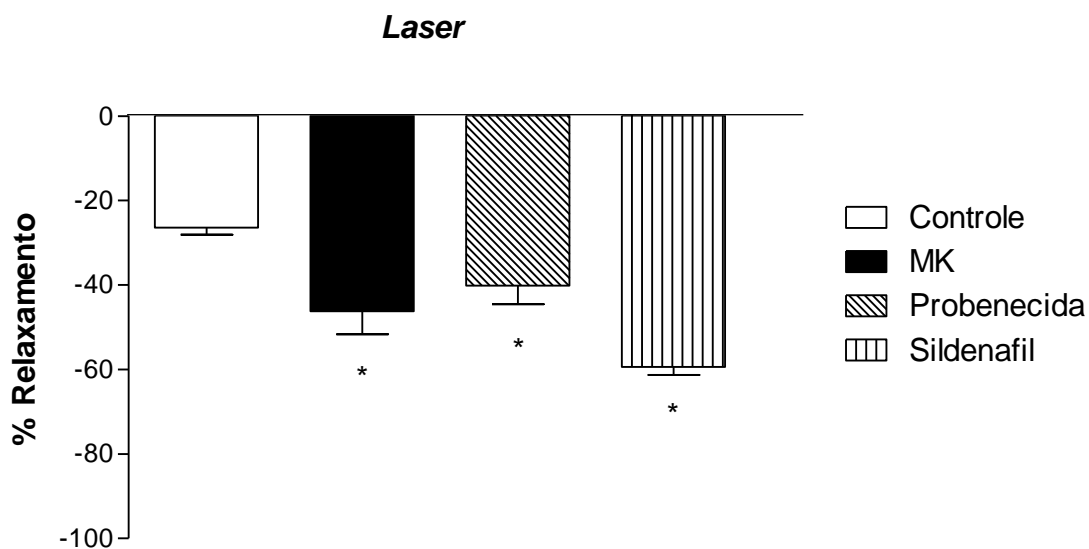
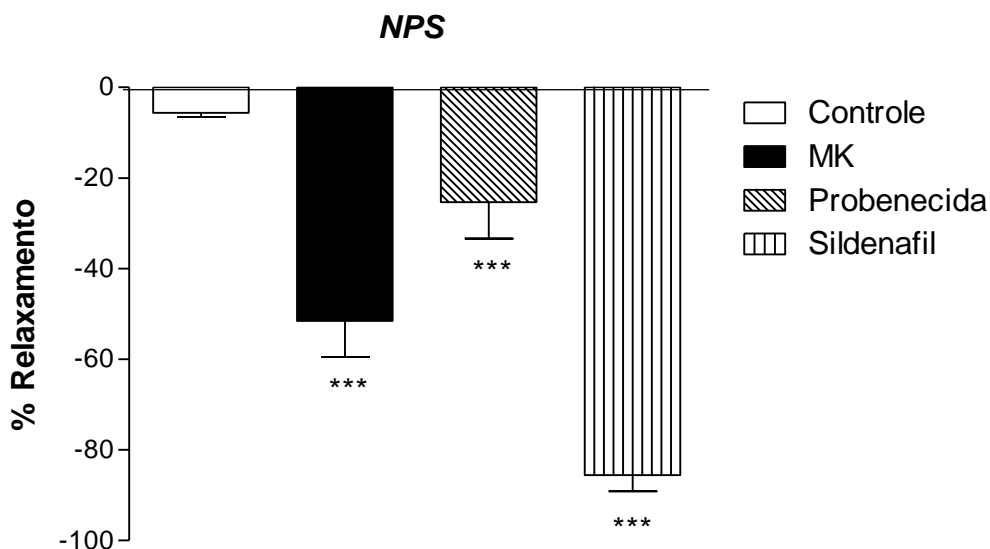


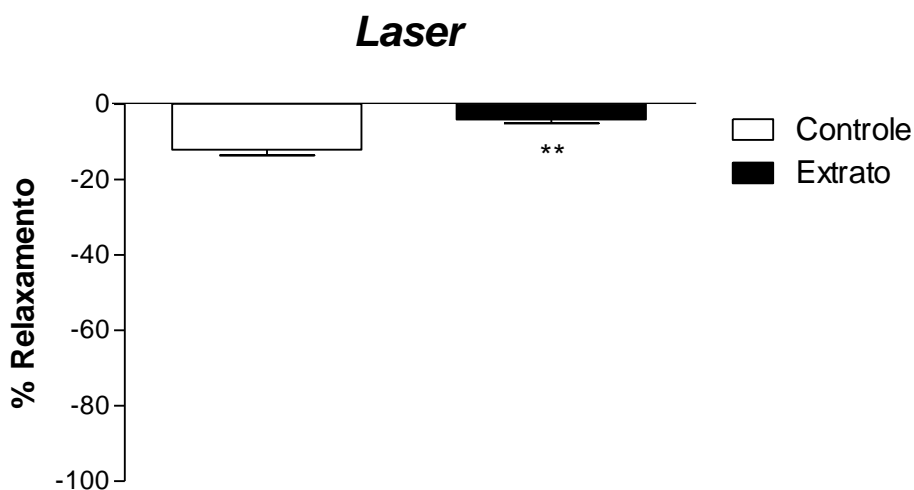
Figura 7: Vasodilatação induzida por NPS em anéis aórticos de ratos normotensos. *** representa a diferença entre Controle vs MK-571; Sildenafil vs Controle; e MK 571 vs Sildenafil, com valor de $p < 0,05$.



Como visto, as proteínas de multirresistência são responsáveis pelo transporte de várias substâncias, incluindo nucleotídeos cíclicos (cGMP e cAMP) (Jedlitschky et al., 2000). O aumento dos níveis intracelulares desses segundos mensageiros após a inibição de MRP4 (com o uso de MK-571 e probenecida, por exemplo) resulta em uma maior ativação de PKG e PKA, pela via clássica cGMP e cAMP, respectivamente (Hara et al., 2011). Como bem descrito, o sildenafil é um inibidor da Fosfodiesterase tipo 5, responsável por catalisar a clivagem hidrolítica da ligação 3' fosfodiéster dos nucleotídeos cíclicos, controlando seus níveis intracelulares. Considerando que o LASER vermelho (660 nm) é capaz de induzir vasodilatação por um mecanismo dependente de NO (Oishi et al., 2017), os resultados sugerem que a potencialização da vasodilatação induzida por LASER mediada por MK-571, probenecida e sildenafil se deve ao maior acúmulo de cGMP intracelular em células do músculo liso e nas células do endotélio. O aumento da concentração de GMPc em células musculares lisas resulta na ativação de PKG, que induz o relaxamento dessa célula por diversos mecanismos (Decouture et al., 2015; Cornwell et al., 1991; Furukawa et al., 1991; Fischer et al., 2002). Além disso, o acúmulo intracelular de GMPc nas células endoteliais é capaz de estimular a produção de NO, por um mecanismo dependente de NOS (Lincoln et al., 1994). Dessa forma, nossos resultados mostraram que as estratégias farmacológicas citadas contribuem para o aumento da sensibilidade do tecido vascular à vasodilatação induzida pelo LASER vermelho.

Para os animais tratados por 14 dias com a solução de extrato de beterraba diluída na água de beber, foi visto que na reatividade vascular dos anéis destes ratos não houve aumento da resposta vasodilatadora induzida pelo LASER ($4,004 \pm 2,674\%$; $n = 7$), comparado ao controle ($12,026 \pm 4,364\%$; $n = 8$), inclusive percebe-se uma diminuição da resposta dos animais submetidos a este tratamento, conforme mostrado na figura 8.

Fig. 8: Vasodilatação induzida por LASER vermelho em anéis aórticos de ratos normotensos controle e ratos submetidos a tratamento com extrato de beterraba. ** representa a diferença entre Controle vs Extrato de Beterraba, com valor de $p < 0,05$.

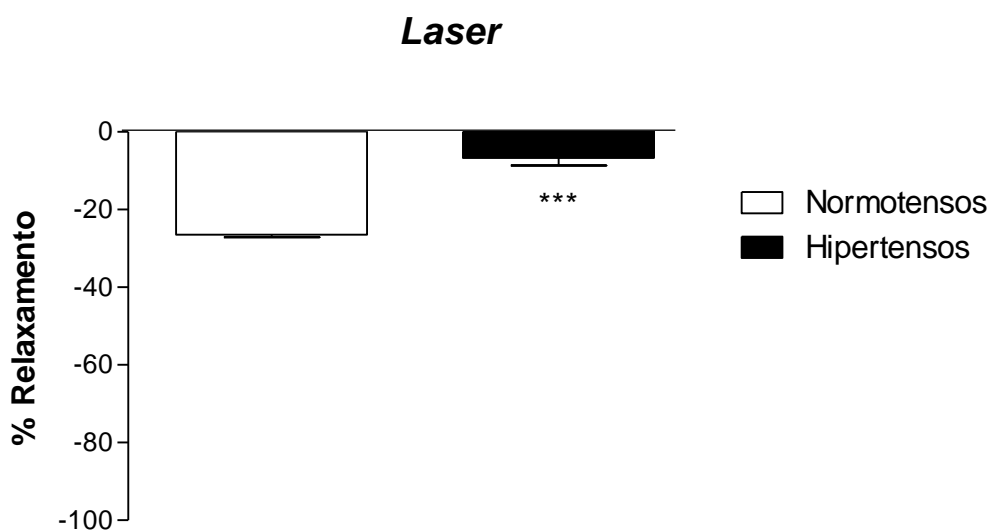


Nitrato e compostos polifenólicos presentes em frutas e vegetais estão envolvidos na suplementação e melhoria das vias de produção de NO (Bondonno, Croft, Ward, Considine, & Hodgson, 2015; Duarte, Francisco, & Perez-Vizcaino, 2014). Dentre os vegetais, a beterraba e a rúcula são fontes ricas em nitrato e polifenóis na dieta. A beterraba contém altos níveis de nitrato com uma faixa de 644 a 1800 mg/kg (Lidder & Webb, 2013). Contém ainda compostos fenólicos benéficos à saúde, como ácido cumárico, ácido ferúlico, bem como betalaínas e betacianinas, que são responsáveis pela pigmentação vermelha na planta (Georgiev et al., 2010). Por conta dos altos níveis de nitrato, esperava-se que a suplementação do extrato de beterraba na água de beber dos animais fosse aumentar a atividade das vias de produção do óxido nítrico na forma de nitratos, e a partir da enzima nitrato redutase, haveria a

conversão futura de nitrato para nitrito e de nitrito para NO. No entanto, em um trabalho publicado (Andrade et al., 2004) foi demonstrado que em amostras de Beterraba encontramos em torno de $0,81 \pm 0,01$ mcg/g de cobre (Cu), sendo o cobre o agente responsável por catalisar a decomposição dos estoques de NO, diminuindo a concentração de RSNO, logo, explicaria a diminuição da resposta vasodilatadora do LASER em anéis de animais previamente tratados com o extrato de Beterraba.

Em anéis aórticos de ratos hipertensos L-NAME (pressão arterial sistólica: $167,11 \pm 13,92$ mmHg, $n = 9$) a vasodilatação induzida por LASER vermelho é menor ($6,75 \pm 4,90\%$, $n = 7$), em comparação com ratos normotensos ($26,45 \pm 1,62\%$; $n = 6$, $p < 0,05$), conforme mostrado na figura 9. Os ratos hipertensos L-NAME são mediados pela inibição de NOS.

Fig. 9: Vasodilatação induzida por LASER vermelho em anéis aórticos de ratos normotensos e hipertensos (L-NAME). *** representa a diferença entre normotenso vs hipertenso, com valor de $p < 0,05$.

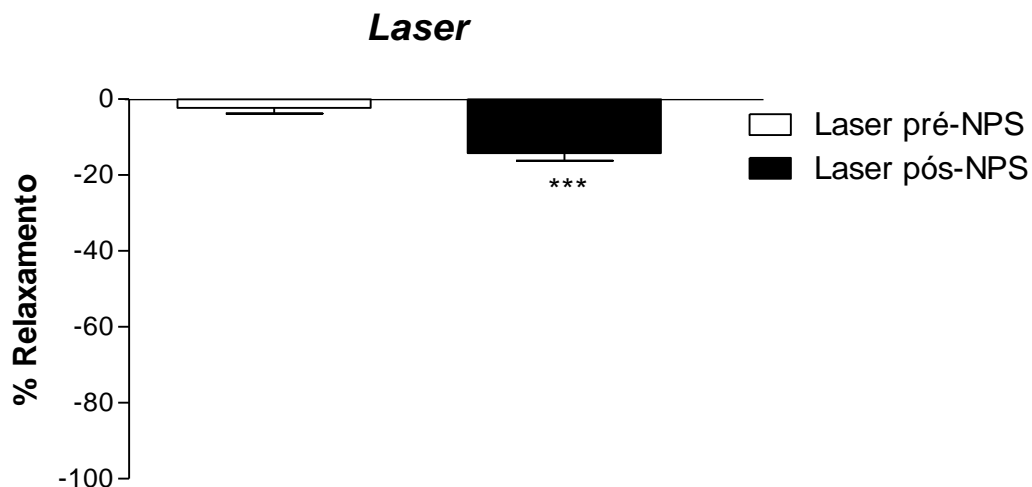


Conseqüentemente, há um desequilíbrio entre os fatores vasodilatadores e vasoconstritores, visto que a inibição dessa enzima proporciona uma menor produção de NO endógeno, que apresenta importante participação no tônus vascular fisiológico, mediada pelo efeito vasodilatador (Alencar et al., 2003). Portanto, com a diminuição da síntese de NO, sabe-se que este modelo pode reduzir o armazenamento de NO no plasma e nos tecidos, pelo deslocamento do NO dos S-nitrosotióis em um processo de

transnitrosilação, assim, ocorre a desestabilização da ligação R-SNO nas proteínas e a consequente liberação de NO desses reservatórios (Tare et al., 1990; Wanstall et al., 2001). Com baixos estoques (induzidos pelo tratamento com L-NAME), o efeito vasodilatador do LASER vermelho diminuiria e haveria baixa liberação de NO no sistema (Hebeda et al., 2011), com consequente diminuição do efeito vasodilatador para o LASER vermelho, como pode ser verificado na figura 9.

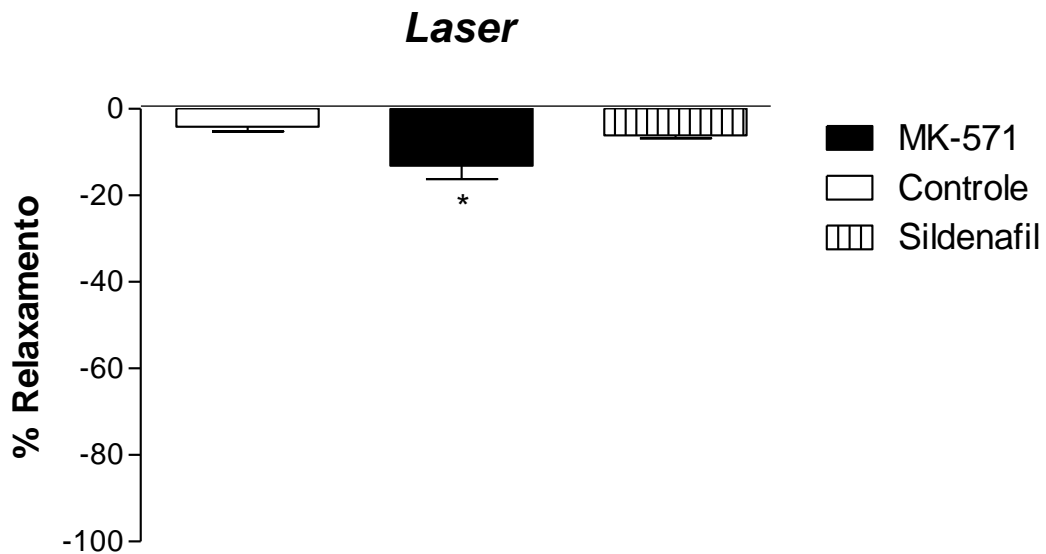
Em anéis aórticos de ratos normotensos, foi utilizado L-cisteína para diminuir o armazenamento de NO no tecido, e foi visto que a vasodilatação induzida pelo LASER foi menor ($2,31 \pm 3,65\%$, $n = 6$), em comparação ao controle ($26,45 \pm 1,62\%$; $n = 6$, $p < 0,05$). Para recuperar o armazenamento de NO no tecido vascular de ratos normotensos após o tratamento com L-cisteína, foi feito o tratamento dos anéis aórticos com um doador de NO (NPS), e como esperado a vasodilatação induzida por LASER foi aumentada ($14,24 \pm 4,86\%$, $n = 6$), como podemos verificar na figura 10. Conforme indicado na literatura, a L-cisteína é capaz de induzir a desestabilização da ligação R-SNO em proteínas com consequente liberação de NO desses reservatórios (Keszler et al., 2019), por isto, há baixa resposta vasodilatadora induzida pelo LASER, uma vez que seu efeito é dependente do armazenamento de NO, como já foi demonstrado (Choi et al., 2011). Concluímos que o uso do NPS, conforme mencionado anteriormente, restaura os estoques de NO no vaso, aumentando a resposta vasodilatadora ao LASER.

Fig. 10: Vasodilatação induzida por LASER vermelho em anéis aórticos de ratos normotensos pré-NPS e pós-NPS. *** representa a diferença entre pré-NPS vs pós-NPS com valor de $p < 0,05$.



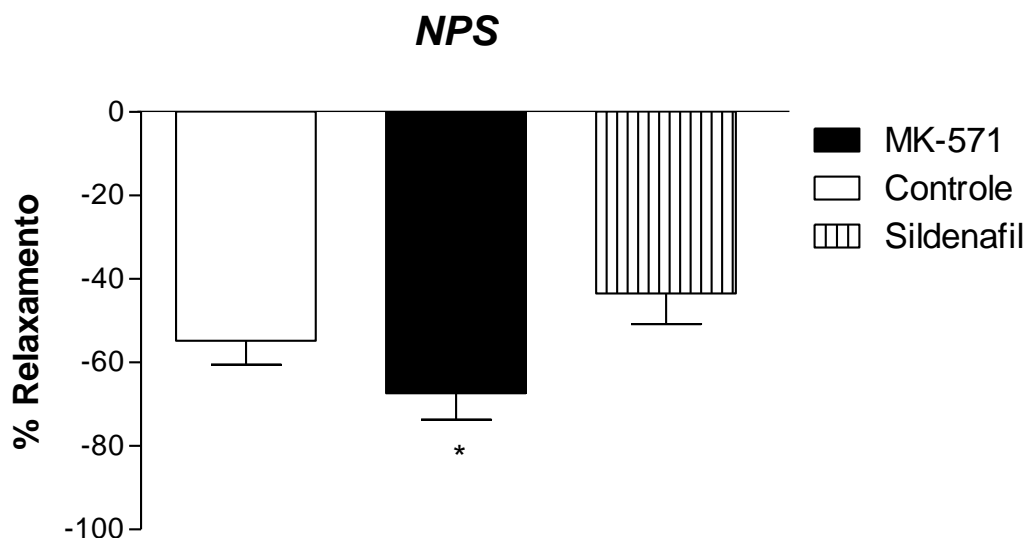
Além disso, realizaram-se experimentos para encontrar ferramentas farmacológicas para aumentar o efeito vasodilatador induzido pelo LASER em situações com baixos estoques de NO, como verificado em ratos hipertensos, modelo L-NAME (Furukawa et al., 1991). Em anéis aórticos de ratos L-NAME, o MK-571 potencializou a vasodilatação induzida pelo LASER vermelho ($10,02 \pm 6,75\%$, $n = 8$), em comparação ao controle ($6,75 \pm 4,90\%$, $n = 7$, $p < 0,05$), sem potencialização encontrada com Sildenafil ($5,09 \pm 2,33\%$, $n = 8$) conforme mostra a figura 11. Assim, apenas o MK-571 é capaz de aumentar o relaxamento nessa condição, com baixos estoques de NO.

Fig. 11: Vasodilatação induzida por LASER vermelho em anéis aórticos de ratos hipertensos (L-NAME). * representa a diferença entre MK-571 vs Controle e Sildenafil com valor de $p < 0,05$.



Semelhante ao efeito vasodilatador do LASER, em anéis aórticos de ratos L-NAME, o MK-571 potencializou a vasodilatação induzida pelo NPS ($67,37284 \pm 17,9728\%$, $n = 8$), em comparação com o controle ($54,78 \pm 15,33\%$, $n = 7$, $p < 0,05$), sem potenciação pelo Sildenafil ($43,43 \pm 20,72\%$, $n = 8$) como mostrado na figura 12. A vasodilatação induzida pelo NPS não é dependente do estoque de NO, já que é um fármaco doador de NO.

Figura 12: Vasodilatação induzida por LASER vermelho em anéis aórticos de ratos hipertensos (L-NAME), após tratamento com NPS. * representa a diferença entre MK-571 vs Controle e Sildenafil, com valor de $p < 0,05$.



Um fato interessante é que a vasodilatação induzida pelo NPS foi maior em anéis aórticos de ratos L-NAME ($54,78 \pm 15,33\%$, $n = 7$), em comparação com anéis aórticos de ratos normotensos ($5,62 \pm 2,21\%$, $n = 6$). A ausência de NO induzida pela remoção do endotélio ou pela inibição da NOS resulta em aumento da sensibilidade dos vasos aórticos ao NO, enquanto a incubação com o próprio óxido nítrico (por exemplo, com doadores de NO) leva à reversão desse estado sensível (Kumar et al., 2010; Moncada et al., 1991; Mullershausen et al., 2001). Existem estudos que mostram um aumento nos níveis de GMPc em até 130 vezes após o estímulo com doador de NO (com a própria utilização do NPS) em ratos L-NAME em comparação com o controle (Brands et al., 2000), o que corrobora com nossos resultados.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os resultados evidenciam que a vasodilatação induzida por LASER vermelho é potencializada por MK-571 e sildenafil em anéis aórticos de ratos normotensos. No entanto, em anéis aórticos de ratos hipertensos L-NAME, a potencialização da vasodilatação foi induzida apenas por MK-571 e não por sildenafil, indicando que o bloqueio da bomba de efluxo é mais efetivo em animais com baixo estoque de óxido nítrico, comparado a inibição da fosfodiesterase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acelajado MC, Pisoni R, Dudenbostel T, Dell'Italia LJ, Cartmill F, Zhang B, Cofield SS, Oparil S, Calhoun DA. Refractory hypertension: definition, prevalence, and patient characteristics. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2012 Jan;14(1):7-12. doi: 10.1111/j.1751-7176.2011.00556.x. Epub 2011 Nov 15. PMID: 22235818; PMCID: PMC3400427.

Alencar JL, Lobysheva I, Geffard M, Sarr M, Schott C, Schini-Kerth VB, Nepveu F, Stoclet JC, Muller B. Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone. *Mol Pharmacol*. 2003 May;63(5):1148-58. doi: 10.1124/mol.63.5.1148. PMID: 12695543.

Alzawahra WF, Talukder MA, Liu X, Samouilov A, Zweier JL. Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Aug;295(2):H499-508. doi: 10.1152/ajpheart.00374.2008. Epub 2008 Jun 6. PMID: 18539756; PMCID: PMC2519190.

Andrade ÉCBD, Teodoro AJ, Takase I. (2004). Determinação dos teores de cobre em diferentes extratos de hortaliças do tipo A e B. *Food Science and Technology*, 24, 277-281.

August M, Wingerter O, Oelze M, Wenzel P, Kleschyov AL, Daiber A, Mülsch A, Münzel T, Tsilimingas N. Mechanisms underlying dysfunction of carotid arteries in genetically hyperlipidemic rabbits. *Nitric Oxide*. 2006 Nov;15(3):241-51. doi: 10.1016/j.niox.2006.02.003. Epub 2006 Apr 4. PMID: 16597505.

Bauer UE, Briss PA, Goodman RA, Bowman BA. Prevention of chronic disease in the 21st century: elimination of the leading preventable causes of premature death and disability in the USA. *Lancet*. 2014 Jul 5;384(9937):45-52. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60648-6. Epub 2014 Jul 1. PMID: 24996589.

Belleville-Rolland T, Sassi Y, Decouture B, Dreano E, Hulot JS, Gaussem P, Bachelot-Loza C. MRP4 (ABCC4) as a potential pharmacologic target for cardiovascular disease. *Pharmacol Res.* 2016 May;107:381-389. doi: 10.1016/j.phrs.2016.04.002. Epub 2016 Apr 5. PMID: 27063943.

Biswas SK, de Faria JB. Which comes first: renal inflammation or oxidative stress in spontaneously hypertensive rats? *Free Radic Res.* 2007 Feb;41(2):216-24. doi: 10.1080/10715760601059672. PMID: 17364948.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994 Apr 28;368(6474):850-3. doi: 10.1038/368850a0. PMID: 7512692.

Brandes RP, Kim D, Schmitz-Winnenthal FH, Amidi M, Gödecke A, Mülsch A, Busse R. Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension.* 2000 Jan;35(1 Pt 2):231-6. doi: 10.1161/01.hyp.35.1.231. PMID: 10642303.

Busconi L, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem.* 1993 Apr 25;268(12):8410-3. PMID: 7682550.

Buzinari TC, Oishi JC, De Moraes TF, Vatanabe IP, Selistre-de-Araújo HS, Pestana CR, Rodrigues GJ. Treatment with sodium nitroprusside improves the endothelial function in aortic rings with endothelial dysfunction. *Eur J Pharm Sci.* 2017 Jul 15;105:144-149. doi: 10.1016/j.ejps.2017.04.022. Epub 2017 Apr 27. PMID: 28456572.

Byun JW, Babitha S, Kim EK, Shin J. A successful helium-neon laser and topical tacrolimus combination therapy in one child with vitiligo. *Dermatol Ther.* 2015 Nov-Dec;28(6):333-5. doi: 10.1111/dth.12249. Epub 2015 Aug 17. PMID: 26278617.

Cai A, Calhoun DA. Resistant Hypertension: An Update of Experimental and Clinical Findings. *Hypertension*. 2017 Jul;70(1):5-9. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.08929. Epub 2017 May 15. PMID: 28507173; PMCID: PMC5515281.

Cesarino CB, Cipullo JP, Martin JFV, Ciorlia LA, Godoy MRPD, Cordeiro JA, Rodrigues IC (2008). Prevalência e fatores sociodemográficos em hipertensos de São José do Rio Preto-SP. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 91, 31-35.

Champe PC & Harvey RA - Basic concepts in metabolism. In: Champe PC, Harvey RA, eds – *Biochemistry*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1994: 75.

Chen Y, Sharma-Shivappa RR, Keshwani D, Chen C. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Appl Biochem Biotechnol*. 2007 Sep;142(3):276-90. doi: 10.1007/s12010-007-0026-3. PMID: 18025588.

Choi H, Tostes RC, Webb RC. S-nitrosylation Inhibits protein kinase C-mediated contraction in mouse aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 Jan;57(1):65-71. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181fef9cb. PMID: 20966762; PMCID: PMC3022953.

Cohen RA, Weisbrod RM, Gericke M, Yaghoubi M, Bierl C, Bolotina VM. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and inhibition of store-operated Ca²⁺ influx. *Circ Res*. 1999 Feb 5;84(2):210-9. doi: 10.1161/01.res.84.2.210. PMID: 9933253.

Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 1991 Dec;40(6):923-31. PMID: 1836834.

Danielewski O, Schultess J, Smolenski A. The NO/cGMP pathway inhibits Rap 1 activation in human platelets via cGMP-dependent protein kinase I. *Thromb Haemost.* 2005 Feb;93(2):319-25. doi: 10.1160/TH04-09-0582. PMID: 15711749.

de Lima FM, Albertini R, Dantas Y, Maia-Filho AL, Santana Cde L, Castro-Faria-Neto HC, França C, Villaverde AB, Aimbire F. Low-level laser therapy restores the oxidative stress balance in acute lung injury induced by gut ischemia and reperfusion. *Photochem Photobiol.* 2013 Jan-Feb;89(1):179-88. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01214.x. Epub 2012 Nov 19. PMID: 22882462.

De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Nov;20(11):E83-8. doi: 10.1161/01.atv.20.11.e83. PMID: 11073859.

Decouture B, Dreano E, Belleville-Rolland T, Kuci O, Dizier B, Bazaa A, Coqueran B, Lompre AM, Denis CV, Hulot JS, Bachelot-Loza C, Gaussem P. Impaired platelet activation and cAMP homeostasis in MRP4-deficient mice. *Blood.* 2015 Oct 8;126(15):1823-30. doi: 10.1182/blood-2015-02-631044. Epub 2015 Aug 27. PMID: 26316625; PMCID: PMC4626663.

Dharmashankar K, Widlansky ME. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. *Curr Hypertens Rep.* 2010 Dec;12(6):448-55. doi: 10.1007/s11906-010-0150-2. PMID: 20857237; PMCID: PMC2982873.

Dodhia H, Phillips K, Zannou MI, Airoidi M, Bevan G. Modelling the impact on avoidable cardiovascular disease burden and costs of interventions to lower SBP in the England population. *J Hypertens.* 2012 Jan;30(1):217-26. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834d86ee. PMID: 22080224.

Dudenbostel T, Acelajado MC, Pisoni R, Li P, Oparil S, Calhoun DA. Refractory Hypertension: Evidence of Heightened Sympathetic Activity as a Cause of Antihypertensive Treatment Failure. *Hypertension.* 2015 Jul;66(1):126-33. doi:

10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05449. Epub 2015 May 18. PMID: 25987662; PMCID: PMC4465856.

Erceg A, de Jong EM, van de Kerkhof PC, Seyger MM. The efficacy of pulsed dye laser treatment for inflammatory skin diseases: a systematic review. *J Am Acad Dermatol*. 2013 Oct;69(4):609-615.e8. doi: 10.1016/j.jaad.2013.03.029. Epub 2013 May 24. PMID: 23711766.

Feelisch M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998 Jul;358(1):113-22. doi: 10.1007/pl00005231. PMID: 9721012.

Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ. The surprising life of Nitric Oxide. *Chem. Engen. News*, v. 20, n.51, p. 26-38, 1993.

Fernando V, Zheng X, Walia Y, Sharma V, Letson J, Furuta S. S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling. *Antioxidants (Basel)*. 2019 Sep 17;8(9):404. doi: 10.3390/antiox8090404. PMID: 31533268; PMCID: PMC6769533.

Figueiredo AL, Lins L, Cattony AC, Falcão AF. Laser therapy in the control of oral mucositis: a meta-analysis. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2013 Sep-Oct;59(5):467-74. English, Portuguese. doi: 10.1016/j.ramb.2013.08.003. Epub 2013 Oct 10. PMID: 24119379.

Fisher SK, Novak JE, Agranoff BW. Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J Neurochem*. 2002 Aug;82(4):736-54. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01041.x. PMID: 12358779.

Frey RS, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, Malik AB. PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res*. 2002 May 17;90(9):1012-9. doi: 10.1161/01.res.0000017631.28815.8e. PMID: 12016268.

Furchgott RF, Ehrreich SJ, Greenblatt E. The photoactivated relaxation of smooth muscle of rabbit aorta. *J Gen Physiol.* 1961 Jan;44(3):499-519. doi: 10.1085/jgp.44.3.499. PMID: 13702637; PMCID: PMC2195116.

Furchgott, RF. "Relaxation of arterial strips by light and the influence of drugs on this photodynamic effect." *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 113 (1955): 22-23.

Furukawa K, Ohshima N, Tawada-Iwata Y, Shigekawa M. Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem.* 1991 Jul 5;266(19):12337-41. PMID: 1648093.

Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res.* 2002 Aug 1;55(2):250-60. doi: 10.1016/s0008-6363(02)00327-9. PMID: 12123764.

Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y, Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczyński MJ, Zhang L. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Mar;9(3):215-36. doi: 10.1038/nrd3028. PMID: 20190787; PMCID: PMC3326076.

Godber BL, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem.* 2000 Mar 17;275(11):7757-63. doi: 10.1074/jbc.275.11.7757. PMID: 10713088.

Gorren AC, Schrammel Astrid, Schmidt K, Mayer B. Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione. *Arch Biochem Biophys.* 1996 Jun 15;330(2):219-28. doi: 10.1006/abbi.1996.0247. PMID: 8660650.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994 Jun;74(6):1141-8. doi: 10.1161/01.res.74.6.1141. PMID: 8187280.

Gu D, Reynolds K, Duan X, Xin X, Chen J, Wu X, Mo J, Whelton PK, He J; InterASIA Collaborative Group. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in the Chinese adult population: International Collaborative Study of Cardiovascular Disease in Asia (InterASIA). *Diabetologia*. 2003 Sep;46(9):1190-8. doi: 10.1007/s00125-003-1167-8. Epub 2003 Jul 15. Erratum in: *Diabetologia*. 2012 Oct;55(10):2861-2. PMID: 12879248.

Gus I, Harzheim E, Zaslavsky C, Medina C, Gus M (2004). Prevalência, reconhecimento e controle da hipertensão arterial sistêmica no estado do Rio Grande do Sul. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 83, 424-428.

Hall G, Hasday JD, Rogers TB. Regulating the regulator: NF-kappaB signaling in heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Oct;41(4):580-91. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.07.006. Epub 2006 Sep 1. PMID: 16949095.

Hara Y, Sassi Y, Guibert C, Gambaryan N, Dorfmueller P, Eddahibi S, Lompre AM, Humbert M, Hulot JS. Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2888-97. doi: 10.1172/JCI45023. Epub 2011 Jun 13. PMID: 21670499; PMCID: PMC3223830.

Harrison DG, Guzik TJ, Goronzy J, Weyand C. Is hypertension an immunologic disease? *Curr Cardiol Rep*. 2008 Nov;10(6):464-9. doi: 10.1007/s11886-008-0073-6. PMID: 18950555.

Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, Madhur MS, Marvar PJ, Thabet SR, Vinh A, Weyand CM. Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension*. 2011 Feb;57(2):132-40. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163576. Epub 2010 Dec 13. PMID: 21149826; PMCID: PMC3028593.

Haynes RB, McDonald HP, Garg AX. Helping patients follow prescribed treatment: clinical applications. *JAMA*. 2002 Dec 11;288(22):2880-3. doi: 10.1001/jama.288.22.2880. PMID: 12472330.

Hebeda CB, Teixeira SA, Tamura EK, Muscará MN, de Mello SB, Markus RP, Farsky SH. Nitric oxide modulates lipopolysaccharide-induced endothelial platelet endothelial cell adhesion molecule expression via interleukin-10. *Clin Exp Immunol*. 2011 Aug;165(2):172-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04396.x. Epub 2011 May 12. PMID: 21564091; PMCID: PMC3142642.

Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Feb;6(2):150-66. doi: 10.1038/nrm1569. PMID: 15688001.

Hicks LS, Fairchild DG, Cook EF, Ayanian JZ. Association of region of residence and immigrant status with hypertension, renal failure, cardiovascular disease, and stroke, among African-American participants in the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Ethn Dis*. 2003 Summer;13(3):316-23. PMID: 12894955.

Hinshaw DB, Burger JM, Delius RE, Hyslop PA, Omann GM. Inhibition of organic anion transport in endothelial cells by hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys*. 1992 Nov 1;298(2):464-70. doi: 10.1016/0003-9861(92)90436-z. PMID: 1416977.

Huang SF, Tsai YA, Wu SB, Wei YH, Tsai PY, Chuang TY. Effects of intravascular laser irradiation of blood in mitochondria dysfunction and oxidative stress in adults with chronic spinal cord injury. *Photomed Laser Surg*. 2012 Oct;30(10):579-86. doi: 10.1089/pho.2012.3228. Epub 2012 Aug 14. PMID: 22891782.

Hunter RA, Schoenfisch MH. S-Nitrosothiol analysis via photolysis and amperometric nitric oxide detection in a microfluidic device. *Anal Chem*. 2015

Mar 17;87(6):3171-6. doi: 10.1021/ac503220z. Epub 2015 Feb 25. PMID: 25714120; PMCID: PMC4682557.

Ignarro L. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, Academic Press, 1 ed., 2000.

Ischiropoulos H, al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. FEBS Lett. 1995 May 15;364(3):279-82. doi: 10.1016/0014-5793(95)00307-u. PMID: 7758583.

Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. J Biol Chem. 2000 Sep 29;275(39):30069-74. doi: 10.1074/jbc.M005463200. PMID: 10893247.

Jedlitschky G, Greinacher A, Kroemer HK. Transporters in human platelets: physiologic function and impact for pharmacotherapy. Blood. 2012 Apr 12;119(15):3394-402. doi: 10.1182/blood-2011-09-336933. Epub 2012 Feb 14. PMID: 22337717.

Jedlitschky G, Tirschmann K, Lubenow LE, Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Greinacher A, Kroemer HK. The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. Blood. 2004 Dec 1;104(12):3603-10. doi: 10.1182/blood-2003-12-4330. Epub 2004 Aug 5. PMID: 15297306.

Jiang JL, Jiang DJ, Tang YH, Li NS, Deng HW, Li YJ. Effect of simvastatin on endothelium-dependent vaso-relaxation and endogenous nitric oxide synthase inhibitor. Acta Pharmacol Sin. 2004 Jul;25(7):893-901. PMID: 15210062.

Jin R, Huang X, Li H, Yuan Y, Li B, Cheng C, Li Q. Laser therapy for prevention and treatment of pathologic excessive scars. Plast Reconstr Surg. 2013 Dec;132(6):1747-1758. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182a97e43. PMID: 24281600.

Johnson RJ, Rodriguez-Iturbe B, Kang DH, Feig DI, Herrera-Acosta J. A unifying pathway for essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2005 Mar;18(3):431-40. doi: 10.1016/j.amjhyper.2004.08.035. PMID: 15797666.

Jung O, Gechter JL, Wunder C, Paulke A, Bartel C, Geiger H, Toennes SW. Resistant hypertension? Assessment of adherence by toxicological urine analysis. *J Hypertens*. 2013 Apr;31(4):766-74. doi: 10.1097/HJH.0b013e32835e2286. PMID: 23337469.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999 Mar;49(1):1-17. doi: 10.1016/S1011-1344(98)00219-X. PMID: 10365442.

Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jun;24(6):998-1005. doi: 10.1161/01.ATV.0000125114.88079.96. Epub 2004 Mar 4. PMID: 15001455.

Keh D, Gerlach M, Kürer I, Seiler S, Kerner T, Falke KJ, Gerlach H. The effects of nitric oxide (NO) on platelet membrane receptor expression during activation with human alpha-thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996 Sep;7(6):615-24. doi: 10.1097/00001721-199609000-00007. PMID: 8899151.

Keszler A, Lindemer B, Hogg N, Lohr NL. Ascorbate attenuates red light mediated vasodilation: Potential role of S-nitrosothiols. *Redox Biol*. 2019 Jan;20:13-18. doi: 10.1016/j.redox.2018.09.008. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30261342; PMCID: PMC6156744.

Keszler A, Lindemer B, Hogg N, Weihrauch D, Lohr NL. Wavelength-dependence of vasodilation and NO release from S-nitrosothiols and dinitrosyl iron complexes by far red/near infrared light. *Arch Biochem Biophys*. 2018 Jul 1;649:47-52. doi: 10.1016/j.abb.2018.05.006. Epub 2018 May 9. PMID: 29752896.

Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Gladwin MT. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Apr;26(4):697-705. doi: 10.1161/01.ATV.0000204350.44226.9a. Epub 2006 Jan 19. PMID: 16424350.

Koeners MP, Braam B, Joles JA. Perinatal inhibition of NF-kappaB has long-term antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2011 Jun;29(6):1160-6. doi: 10.1097/HJH.0b013e3283468344. PMID: 21505356.

Krousel-Wood MA. Hypertension and Health Behaviors in Females Across the Lifespan. *Am J Med Sci.* 2015 Jul;350(1):36-41. doi: 10.1097/MAJ.0000000000000515. PMID: 26110753; PMCID: PMC4615562.

Krousel-Wood MA, Muntner P, Islam T, Morisky DE, Webber LS. Barriers to and determinants of medication adherence in hypertension management: perspective of the cohort study of medication adherence among older adults. *Med Clin North Am.* 2009 May;93(3):753-69. doi: 10.1016/j.mcna.2009.02.007. PMID: 19427503; PMCID: PMC2702217.

Kumar S, Saravanakumar M, Raja B. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent of pepper on nitric oxide, antioxidants and lipid peroxidation markers in L-NAME induced hypertensive rats *Int. J. Res. Pharm. Sci.*, 1 (2010), pp. 300-307

Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL. Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *J Biol Chem.* 2004 Apr 23;279(17):16939-46. doi: 10.1074/jbc.M314336200. Epub 2004 Feb 6. PMID: 14766900.

Lim W, Kim J, Kim S, Karna S, Won J, Jeon SM, Kim SY, Choi Y, Choi H, Kim O. Modulation of lipopolysaccharide-induced NF- κ B signaling pathway by 635 nm irradiation via heat shock protein 27 in human gingival fibroblast cells.

Photochem Photobiol. 2013 Jan-Feb;89(1):199-207. doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01225.x. Epub 2012 Sep 18. PMID: 22892019.

Lincoln TM, Komalavilas P, Cornwell TL. Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. Hypertension. 1994 Jun;23(6 Pt 2):1141-7. doi: 10.1161/01.hyp.23.6.1141. PMID: 8206604.

Lugnier C, Keravis T, Eckly-Michel A. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. J Physiol Pharmacol. 1999 Dec;50(4):639-52. PMID: 10639014.

Manoj Veleeparampil M, Usha Aravind K, Aravindakumar CT. Decomposition of S-Nitrosothiols Induced by UV and Sunlight. Advances in Physical Chemistry, vol. 2009, Article ID 890346, 5 pages, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/890346>

Maron BA, Tang SS, Loscalzo J. S-nitrosothiols and the S-nitrosoproteome of the cardiovascular system. Antioxid Redox Signal. 2013 Jan 20;18(3):270-87. doi: 10.1089/ars.2012.4744. Epub 2012 Sep 5. PMID: 22770551; PMCID: PMC3518544.

Martinelli AM, Rodrigues CNDS, Moraes TF, Rodrigues GJ. In Endothelial Cells, the Activation or Stimulation of Soluble Guanylyl Cyclase Induces the Nitric Oxide Production by a Mechanism Dependent of Nitric Oxide Synthase Activation. J Pharm Pharm Sci. 2018;21(1):38-45. doi: 10.18433/jpps29578. PMID: 29448976.

Matsunaga K, Furchgott RF. Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta. J Pharmacol Exp Ther. 1989 Feb;248(2):687-95. PMID: 2537410.

Mattiello T, Guerriero R, Lotti LV, Trifirò E, Felli MP, Barbarulo A, Pucci B, Gazzaniga P, Gaudio C, Frati L, Pulcinelli FM. Aspirin extrusion from human platelets through multidrug resistance protein-4-mediated transport: evidence of

a reduced drug action in patients after coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Aug 9;58(7):752-61. doi: 10.1016/j.jacc.2011.03.049. Erratum in: *J Am Coll Cardiol.* 2011 Oct 18;58(17):1832. PMID: 21816313.

Mayer B, Pfeiffer S, Schrammel A, Koesling D, Schmidt K, Brunner F. A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione. *J Biol Chem.* 1998 Feb 6;273(6):3264-70. doi: 10.1074/jbc.273.6.3264. PMID: 9452441.

McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension.* 1999 Oct;34(4 Pt 1):539-45. doi: 10.1161/01.hyp.34.4.539. PMID: 10523323.

Mendes AF, Carvalho AP, Caramona MM, Lopes MC. Role of nitric oxide in the activation of NF-kappaB, AP-1 and NOS II expression in articular chondrocytes. *Inflamm Res.* 2002 Jul;51(7):369-75. doi: 10.1007/pl00000317. PMID: 12146729.

Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM. Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Mar 15;88(6):2166-70. doi:10.1073/pnas.88.6.2166. PMID: 1848694; PMCID: PMC51190.

Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Aug;26(8):1702-11. doi: 10.1161/01.ATV.0000229218.97976.43. Epub 2006 May 25. PMID: 16728653.

Mullershausen F, Russwurm M, Thompson WJ, Liu L, Koesling D, Friebe A. Rapid nitric oxide-induced desensitization of the cGMP response is caused by increased activity of phosphodiesterase type 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme. *J Cell Biol.* 2001 Oct 15;155(2):271-8. doi: 10.1083/jcb.200107001. Epub 2001 Oct 15. PMID: 11604422; PMCID: PMC2198829.

Muntner P, Davis BR, Cushman WC, Bangalore S, Calhoun DA, Pressel SL, Black HR, Kostis JB, Probstfield JL, Whelton PK, Rahman M; ALLHAT Collaborative Research Group. Treatment-resistant hypertension and the incidence of cardiovascular disease and end-stage renal disease: results from the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Hypertension*. 2014 Nov;64(5):1012-21. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03850. Epub 2014 Aug 4. PMID: 25259745.

Nagababu E, Ramasamy S, Abernethy DR, Rifkind JM. Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. *J Biol Chem*. 2003 Nov 21;278(47):46349-56. doi: 10.1074/jbc.M307572200. Epub 2003 Sep 2. PMID: 12952953.

Nagaosa K, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. Concomitant induction of apoptosis and expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured rat luteal cells by nuclear factor-kappaB and oxidative stress. *Dev Growth Differ*. 2003 Aug;45(4):351-9. doi: 10.1046/j.1440-169x.2003.00704.x. PMID: 12950276.

Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest*. 1992 Nov;90(5):2092-6. doi: 10.1172/JCI116092. PMID: 1385480; PMCID: PMC443276.

Oishi JC, De Moraes TF, Buzinari TC, Cárnio EC, Parizotto NA, Rodrigues GJ. Hypotensive acute effect of photobiomodulation therapy on hypertensive rats. *Life Sci*. 2017 Jun 1;178:56-60. doi: 10.1016/j.lfs.2017.04.011. Epub 2017 Apr 14. PMID: 28414077.

Paulis L, Pechanova O, Zicha J, Barta A, Gardlik R, Celec P, Kunes J, Simko F. Melatonin interactions with blood pressure and vascular function during L-NAME-

induced hypertension. *J Pineal Res.* 2010 Mar;48(2):102-8. doi: 10.1111/j.1600-079X.2009.00732.x. Epub 2009 Dec 23. PMID: 20041987.

Pernollet MG, Lantoine F, Devynck MA. Nitric oxide inhibits ATP-dependent Ca²⁺ uptake into platelet membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 May 24;222(3):780-5. doi: 10.1006/bbrc.1996.0821. PMID: 8651922.

Persell SD. Prevalence of resistant hypertension in the United States, 2003-2008. *Hypertension.* 2011 Jun;57(6):1076-80. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.170308. Epub 2011 Apr 18. PMID: 21502568.

Plass CA, Loew HG, Podesser BK, Prusa AM. Light-induced vasodilation of coronary arteries and its possible clinical implication. *Ann Thorac Surg.* 2012 Apr;93(4):1181-6. doi: 10.1016/j.athoracsur.2011.12.062. Epub 2012 Mar 3. PMID: 22381453.

Prencipe M, Casini AR, Santini M, Ferretti C, Scaldaferrri N, Culasso F. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in the elderly: results from a population survey. *J Hum Hypertens.* 2000 Dec;14(12):825-30. doi: 10.1038/sj.jhh.1001117. PMID: 11114700.

Priora R, Margaritis A, Frosali S, Coppo L, Summa D, Di Giuseppe D, Aldinucci C, Pessina G, Di Stefano A, Di Simplicio P. In vitro inhibition of human and rat platelets by NO donors, nitrosoglutathione, sodium nitroprusside and SIN-1, through activation of cGMP-independent pathways. *Pharmacol Res.* 2011 Sep;64(3):289-97. doi: 10.1016/j.phrs.2011.03.014. Epub 2011 Apr 23. PMID: 21539916.

Ptasinska A, Wang S, Zhang J, Wesley RA, Danner RL. Nitric oxide activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma through a p38 MAPK signaling pathway. *FASEB J.* 2007 Mar;21(3):950-61. doi: 10.1096/fj.06-6822com. Epub 2006 Dec 28. PMID: 17197391.

Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*. 1983 Nov 10-16;306(5939):174-6. doi: 10.1038/306174a0. PMID: 6316142.

Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*. 1983 Mar;52(3):352-7. doi: 10.1161/01.res.52.3.352. PMID: 6297832.

Rodrigues GJ, Lunardi CN, Lima RG, Santos CX, Laurindo FR, da Silva RS, Bendhack LM. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. *Nitric Oxide*. 2008 May;18(3):176-83. doi: 10.1016/j.niox.2007.12.002. Epub 2007 Dec 25. PMID: 18194676.

Sassi Y, Lipskaia L, Vandecasteele G, Nikolaev VO, Hatem SN, Cohen Aubart F, Russel FG, Mougnot N, Vrignaud C, Lechat P, Lompré AM, Hulot JS. Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *J Clin Invest*. 2008 Aug;118(8):2747-57. doi: 10.1172/JCI35067. PMID: 18636120; PMCID: PMC2467383.

Schwartz BG, Jackson G, Stecher VJ, Campoli-Richards DM, Kloner RA. Phosphodiesterase type 5 inhibitors improve endothelial function and may benefit cardiovascular conditions. *Am J Med* 126: 192–199, 2013. doi:10.1016/j.amjmed.2012.08.015.

Sim JJ, Bhandari SK, Shi J, Liu IL, Calhoun DA, McGlynn EA, Kalantar-Zadeh K, Jacobsen SJ. Characteristics of resistant hypertension in a large, ethnically diverse hypertension population of an integrated health system. *Mayo Clin Proc*. 2013 Oct;88(10):1099-107. doi: 10.1016/j.mayocp.2013.06.017. PMID: 24079679; PMCID: PMC3909733.

Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. 1994 Sep 23;78(6):931-6. doi: 10.1016/0092-8674(94)90269-0. PMID: 7923362.

Stergiou GS, Thomopoulou GC, Skeva II, Mountokalakis TD. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in Greece: the Didima study. *Am J Hypertens*. 1999 Oct;12(10 Pt 1):959-65. doi: 10.1016/s0895-7061(99)00136-3. PMID: 10560781.

Tare M, Parkington HC, Coleman HA, Neild TO, Dusting GJ. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature*. 1990 Jul 5;346(6279):69-71. doi: 10.1038/346069a0. PMID: 2366864.

Tomimura S, Silva BP, Sanches IC, Canal M, Consolim-Colombo F, Conti FF, De Angelis K, Chavantes MC. Hemodynamic effect of laser therapy in spontaneously hypertensive rats. *Arq Bras Cardiol*. 2014 Aug;103(2):161-4. doi: 10.5935/abc.20140117. PMID: 25211315; PMCID: PMC4150668.

Trepakova ES, Cohen RA, Bolotina VM. Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase-dependent refilling of Ca²⁺ stores. *Circ Res*. 1999 Feb 5;84(2):201-9. doi: 10.1161/01.res.84.2.201. PMID: 9933252.

Tugay Aytakin N, Pala K, Irgil E, Akis N, Aytakin H. Distribution of blood pressures in Gemlik District, north-west Turkey. *Health Soc Care Community*. 2002 Sep;10(5):394-401. doi: 10.1046/j.1365-2524.2002.00379.x. PMID: 12390225.

Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017 Jan;219(1):22-96. doi: 10.1111/apha.12646. Epub 2016 Jan 25. PMID: 26706498.

Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)* 196: 193–222, 2009. doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01964.x.

Vanin AF, Bevers LM, Slama-Schwok A, van Faassen EE. Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Jan;64(1):96-103. doi: 10.1007/s00018-006-6374-2. PMID: 17160351.

Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol*. 1999 Mar 4;83(5A):3C-12C. doi: 10.1016/s0002-9149(99)00042-9. PMID: 10078537.

Wanstall JC, Jeffery TK, Gambino A, Lovren F, Triggle CR. Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. *Br J Pharmacol*. 2001 Oct;134(3):463-72. doi: 10.1038/sj.bjp.0704269. PMID: 11588100; PMCID: PMC1572971.

Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, Laval F, Dewhirst MW, Mitchell JB. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis*. 1998 May;19(5):711-21. doi: 10.1093/carcin/19.5.711. PMID: 9635855.

Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol*. 2006 Nov;45(5):268-76. doi: 10.1016/j.vph.2006.08.002. Epub 2006 Aug 17. PMID: 17052961.

Zhang C, Biggs TD, Devarie-Baez NO, Shuang S, Dong C, Xian M. S-Nitrosothiols: chemistry and reactions. *Chem Commun (Camb)*. 2017 Oct 12;53(82):11266-11277. doi: 10.1039/c7cc06574d. PMID: 28944382.

Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med.* 1995 Aug;1(8):804-9. doi: 10.1038/nm0895-804. PMID: 7585184.

ANEXOS

9 ANEXOS

Os anexos a seguir são referentes ao documento de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSCar, além aos trabalhos realizados e publicados nestes dois anos de Pós-graduação.

Anexo I. Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais

Anexo II. Artigo publicado na Lasers in Medical Science

Anexo III. Artigo publicado na Lasers in Medical Science

Anexo I

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização do efeito hipotensivo da fotobiomodulação em diferentes modelos animais de hipertensão arterial, em humanos e estratégias farmacológicas para potencialização deste efeito.", protocolada sob o CEUA nº 7936070618 (10 000968), 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 21/08/2018.

We certify that the proposal "Characterization of the hypotensive effect of photobiomodulation in different animals models of arterial hypertension in humans and pharmacological strategies to enhance this effect.", utilizing 330 Heterogenics rats (330 males), protocol number CEUA 7936070618 (10 000968), 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 08/21/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2018** a **07/2020**

Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem: **Biotério Central da UFSCar**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 20 semanas** N: **330**

Linhagem: **Wistar / SHR**

Peso: **200 a 300 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da UFSCar

São Carlos, 25 de julho de 2021

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

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Original Article | Published: 18 March 2021

Violet LED induces vasodilation in rat aortic rings by soluble guanylate cyclase–dependent mechanism and increases SOD activity

[Luis Henrique Oliveira de Moraes](#) , [Marília Wellichan Mancini](#), [Luciana Almeida-Lopes](#) & [Gerson Jhonatan Rodrigues](#)

[Lasers in Medical Science](#) (2021) | [Cite this article](#)

119 Accesses | 1 Citations | [Metrics](#)

Abstract

We found several studies that have used the aortic rings as an experimental model, mainly for the testing of new drugs or new therapies that try to reverse or prevent endothelial dysfunction or characterize its mechanism of action in a biological system, creating the knowledge necessary to obtain the treatment of those several diseases, where many of these treatments involve photobiomodulation therapies. We also found numerous wavelengths represented by

Original Article | Published: 27 July 2021

Multidrug-resistant protein inhibitor and phosphodiesterase inhibitor potentiate the vasodilator effect induced by photobiomodulation in isolated aortic rings

[Luis Henrique Oliveira de Moraes](#) , [Barbara Terroni](#), [Nayara Formenton da Silva Mayer](#) & [Gerson Jhonatan Rodrigues](#)

Lasers in Medical Science (2021) | [Cite this article](#)

50 Accesses | [Metrics](#)

Abstract

A previous work indicates that the red LASER (660 nm) induces vascular relaxation by nitric oxide (NO)–dependent mechanism. NO activates soluble guanylate cyclase (sGC) which produces cGMP, the main effector in the vasodilation pathway. An interesting