



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS  
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



**ALINNE VILLAR DE ARRUDA**

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA CÁLCIO NOS  
EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO  
INDOL-3-CARBINOL EM RATOS**

**João Pessoa - PB**

**2022**

**ALINNE VILLAR DE ARRUDA**

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA CÁLCIO NOS  
EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO  
INDOL-3-CARBINOL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

**Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**

**Coorientadora: Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves**

**João Pessoa - PB**

**2022**

**Catalogação na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação**

A779p Arruda, Alinne Villar de.

Participação dos canais para cálcio nos efeitos cardiovasculares induzidos pelo indol-3-carbinol em ratos / Alinne Villar de Arruda. - João Pessoa, 2022.  
117 f. : il.

Orientação: Isac Almeida de Medeiros.

Coorientação: Islania Giselia Albuquerque Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Hipertensão arterial sistêmica. 2. Artéria mesentérica. 3. Canal Cavl.2. 4. Indol-3-carbinol. 5. Vegetais crucíferos. 6. Alcaloide. I. Medeiros, Isac Almeida de. II. Gonçalves, Islania Giselia Albuquerque. III. Título.

UFPB/BC

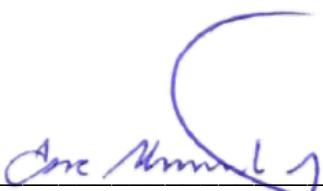
CDU 616.12-008.331.1(043)

**ALINNE VILLAR DE ARRUDA**

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA CÁLCIO NOS  
EFEITOS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELO  
INDOL-3-CARBINOL EM RATOS**

**Aprovado em 30/08/2022**

**BANCA EXAMINADORA**

  
**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Orientador

  
**Profa. Dra. Karina Carla de Paula Medeiros**  
(Universidade Federal do Rio Grande do Norte)  
Examinador externo

  
**Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador interno

# Dedicatória

Aos meus amados pais, **Antonio Tomé de Arruda** e **Erly Medeiros Villar de Arruda**, meus exemplos de perseverança e fé, por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

# *Agradecimentos*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, que sempre esteve à frente de todas as coisas, aumentando a minha fé, me dando força e sabedoria em cada passo dessa longa caminhada, e principalmente por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho.

A toda a minha família, principalmente os meus pais **Antônio Tomé de Arruda** e **Erly Medeiros Villar de Arruda**, e o meu irmão **Ademar Tavares de Arruda Neto**, por serem o alicerce da minha vida, pela torcida, pelo incentivo, pelo apoio, carinho e amor incondicional. Sem vocês a batalha teria sido muito árdua e tudo o que eu fiz, faço e farei, sempre será por vocês e para vocês.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**, pela oportunidade, pela confiança, pela paciência, pelos ensinamentos transmitidos e pela preocupação de pai. És um exemplo de ser humano e profissional. Muito obrigada, professor!

A minha coorientadora, **Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves**, pelo apoio, pelo incentivo e pela contribuição todos os momentos que precisei, sempre me aconselhando com sabedoria. Como sou grata pelo laço de amizade, eu ganhei uma mãe científica e amiga, muito obrigada!

Ao professor **Dr. Marcus Tullius Scotti** e sua aluna **Ma. Natália Ferreira de Sousa** pela colaboração nos experimentos *in silico*. Natália, gratidão pela disponibilidade de tirar todas as minhas dúvidas.

A todos os **docentes** que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), pelos ensinamentos repassados, pela dedicação, pela paciência e pelo carinho ao lecionar, e principalmente por terem contribuído para a minha formação pessoal e profissional.

A todos os amigos e colegas da turma de Mestrado, em especial **Nikole Durand Trigueiro**, **Jaislânia Lucena de Figueiredo Lima (Lane)**, **Natalia Diniz Nunes Pazos** e **Janderson Barbosa Leite de Albuquerque** pelos estudos em grupo e ajuda nas disciplinas. Sem dúvidas, a rotina tornou-se mais leve com vocês.

A minha amiga e colaboradora na realização dos experimentos, **Tays Amanda Felisberto Gonçalves**, por sua disponibilidade em ajudar seja na

bancada, nas dúvidas ou simplesmente por lutar pelo o meu sonho junto comigo. Nada seria possível sem você, o meu muito obrigada!

As minhas amigas, **Rafaelly Lins de Lima Santos e Karla Simone Maia da Silva**, por todo apoio e incentivo, principalmente na reta final do mestrado, por ouvirem os meus aperreios e sempre me acalmar. Amigas, agradeço pelo carinho e preocupação, minha eterna gratidão!

As secretárias do PPgPNSB, **Nilmar Nincia Neves de Medeiros e Caroline Helena Meireles de Medeiros Mangueira**, por toda dedicação e pela disponibilidade em prestar sempre informações.

Ao técnico **José Crispim Duarte** pelo cuidado com os animais utilizados neste trabalho e a **Mônica R. da Silva**, responsável por manter o ambiente de trabalho e estudos sempre limpo, pela alegria contagiante, amor e carinho.

À equipe do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarm) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB): **Arthur, Mathania, Carol, Viviane, Javanyr e Larisse**. Em especial, aos professores envolvidos: **Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras e Profa. Dra. Fabíola Fialho Furtado** pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei, muito obrigada!

Aos alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do IPeFarM/UFPB: **Nayana e Myllena**. Em especial aos que ajudaram com muita dedicação, carinho e amor contribuindo para a realização deste trabalho: **Mariana, Júlio, Evyllen, Maria Eduarda e Adhonias**.

Aos membros da banca examinadora, **Profa. Dra. Karina Carla de Paula Medeiros e Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra**, por aceitarem o convite e pelas contribuições realizadas ao trabalho.

A **UFPB**, instituição responsável pela minha formação profissional e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo suporte financeiro.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, durante a caminhada para a realização deste sonho.

**MUITO OBRIGADA,**  
*Alinne Villar de Arruda.*

*"Mas aqueles que esperam no Senhor renovam suas forças.  
Voam alto como águias; correm e não se fatigam,  
caminham e não se cansam"*

*Isaías 40:31*

# *Resumo*

**ARRUDA, A. V. Participação dos canais para cálcio nos efeitos cardiovasculares induzidos pelo indol-3-carbinol em ratos.** 2022. 119 p. Dissertação de Mestrado (PgPNSB/CCS/UFPB). 2022.

## RESUMO

As doenças cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de morte, hospitalizações e atendimentos ambulatoriais no mundo. O principal fator de risco, modificável, para o desenvolvimento de DCV é a hipertensão arterial sistêmica (HAS), uma condição clínica caracterizada pela elevação persistente da pressão arterial (PA). Os alcaloides têm demonstrado vários benefícios medicinais podendo serem úteis para o tratamento da HAS. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo indol-3-carbinol (I3C), um alcaloide indólico, encontrado em vegetais crucíferos, buscando evidenciar o mecanismo de ação. No protocolo agudo foi realizada a administração intravenosa do I3C (5, 10, 30 e 50 mg/kg) em ratos Wistar e foram mensuradas a PA e a frequência cardíaca (FC). Nos ensaios *in vitro*, o I3C ( $10^{-6}$ - $10^{-2}$  M) foi adicionado em anéis de artéria mesentérica superior com ou sem endotélio funcional pré-contraídos com fenilefrina (FEN) ou solução despolarizante (KCl 60 mM). Também, os efeitos do I3C sobre as contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> foram avaliados na ausência ou presença do composto, bem como em outro protocolo os vasos foram expostos a pré-contração com S(-)-Bay K 8644, um ativador do canal Ca<sub>v</sub>1.2. No estudo *in silico* foram realizados o docking e a dinâmica molecular para avaliar a interação do I3C com o canal Ca<sub>v</sub>1.2. Já para a avaliação do tratamento com o I3C, os animais foram divididos em três grupos: controle normotenso Wistar Kyoto (WKY-CTL), hipertenso (SHR-CTL) e hipertenso tratado com I3C na dose de 50 mg/kg/dia (SHR-I3C 50 mg/kg/dia). Todos os animais foram submetidos a administração diária, via oral, por 28 dias e ao final do tratamento foram mensurados a PA e FC. Os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (nº 056/2016; 066/2017 e 4234221121). A administração aguda do I3C, promoveu hipotensão e bradicardia. Concentrações cumulativas do I3C induziu relaxamento dependente de concentração em anéis mesentéricos com e sem endotélio pré-contraídos com FEN, sendo essa resposta significativamente semelhante quando os anéis foram pré-contraído com KCl 60 mM. Além disso, o I3C inibiu as contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> em meio livre de Ca<sup>+2</sup>, de forma dependente de concentração. Este composto, também induziu vasodilatação nas preparações arteriais pré-contraídas com S(-)-Bay K 8644. Nos resultados *in silico* foi observado fortes interações moleculares do I3C com a subunidade α1C do canal Ca<sub>v</sub>1.2. O tratamento do I3C resultou em diminuição da PAM e da PAS nos animais em modelo de hipertensão espontânea. Em conclusão, este estudo mostra que o I3C promove redução da PAM, tanto de maneira aguda como após o tratamento em SHR. Além disso, induz vasorrelaxamento, envolvendo pelo menos em parte, a participação do bloqueio dos canais Ca<sub>v</sub>1.2 resultando em redução da concentração de Ca<sup>+2</sup> intracelular [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>, modulando o tônus das células musculares lisas vasculares (CMLV). Esses achados contribuem para o entendimento das ações cardiovasculares do I3C.

**Palavras-chave:** hipertensão arterial sistêmica; artéria mesentérica; canal Ca<sub>v</sub>1.2; indol-3-carbinol; vegetais crucíferos; alcaloide.

# *Abstract*

ARRUDA, A. V. **Participation of calcium channels in the cardiovascular effects induced by indole-3-carbinol in rats.** 2022. 119 p. Masters Dissertation (PgPNSB/CCS/UFPB). 2022.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD) represent the leading cause of death, hospitalizations, and outpatient care worldwide. The main modifiable risk factor for the development of CVD is systemic arterial hypertension (SAH), a clinical condition characterized by persistent elevation of blood pressure (BP). Alkaloids have demonstrated several medicinal benefits and may be useful for treating SAH. In this context, the present study aimed to evaluate the cardiovascular effects induced by indole-3-carbinol (I3C), an indole alkaloid found in cruciferous vegetables, seeking evidence of the mechanism of action. In the acute protocol, I3C was administered intravenously (5, 10, 30, and 50 mg/kg) in Wistar rats, and BP and heart rate (HR) were measured. In *in vitro* assays, I3C ( $10^{-6}$ - $10^{-2}$  M) was added to superior mesenteric artery rings with or without functional endothelium pre-contracted with phenylephrine (PHE) or depolarizing solution (60 mM KCl). Also, the effects of I3C on the contractions induced by  $\text{CaCl}_2$  were evaluated in the absence or presence of the compound and in another protocol, and the vessels were exposed to pre-contraction with S(-)-Bay K 8644, a  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$  channel activator. In the *in silico* study, docking and molecular dynamics were performed to evaluate the interaction of I3C with the  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$  channel. For the evaluation of the treatment with I3C, the animals were divided into three groups: normotensive control Wistar Kyoto (WKY-CTL), hypertension (SHR-CTL), and hypertension treated with I3C at a dose of 50 mg/kg/day (SHR-I3C 50 mg/kg/day). The animals were submitted to daily administration orally for 28 days, and at the end of the treatment, BP and HR were measured. The protocols were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Paraíba (UFPB) (nº 056/2016; 066/2017 and 4234221121). Acute administration of I3C promoted hypotension and bradycardia. Cumulative concentrations of I3C induced concentration-dependent relaxation in mesenteric rings with and without endothelium pre-contracted with PHE, this response being significantly similar when the rings were pre-contracted with 60 mM KCl. In addition, I3C inhibited the contractions induced by  $\text{CaCl}_2$  in a  $\text{Ca}^{+2}$ -free medium in a concentration-dependent manner. This compound also induced vasodilation in arterial preparations pre-contracted with S(-)-Bay K 8644. *In silico* results, strong molecular interactions of I3C with the  $\alpha 1\text{C}$  subunit of the  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$  channel were observed. The treatment of I3C decreased MAP and SBP in animals in a model of spontaneous hypertension. In conclusion, this study shows that I3C promotes MAP reduction acutely and after chronic treatment in SHR. In addition, it induces vasorelaxation, involving, at least in part, the participation of  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$  channel blockage, resulting in reduced intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  concentration  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ , modulating vascular smooth muscle cell (VSMC) tone. These findings contribute to the understanding of the cardiovascular actions of I3C.

**Keywords:** systemic arterial hypertension; mesenteric artery; channel  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$ ; indole-3-carbinol; cruciferous vegetables; alkaloid.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da contração do músculo liso vascular ...	35
Figura 2 - Representação esquemática dos canais Ca <sub>v</sub> .....	36
Figura 3 - Formação do I3C .....	45
Figura 4 - Representação esquemática do protocolo experimental de administração aguda do I3C para avaliação dos efeitos sobre a PAM e FC em ratos Wistar não anestesiados.....	54
Figura 5 - Representação esquemática do sistema de banho para órgãos isolados utilizado nos experimentos <i>in vitro</i> com artéria mesentérica superior.....	56
Figura 6 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da viabilidade do órgão e a integridade do endotélio funcional. ....	57
Figura 7 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do I3C, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso, pré-contraídos com FEN.....	58
Figura 8 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do I3C, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 60 mM).....	59
Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do I3C sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de CaCl <sub>2</sub> em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem cálcio. ....	60
Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito induzido pelo I3C em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos, sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644.....	61
Figura 11 - Etapas da simulação de dinâmica molecular .....	66
Figura 12 - Grupos de animais utilizados para a investigação do efeito do tratamento com o I3C .....	67
Figura 13 - Esquema do tratamento com o I3C .....	67
Figura 14 - Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante do I3C em anéis de artéria mesentérica superior isolados de rato normotenso, pré-contraídos com FEN.....	71
Figura 15 - Interações entre os ligantes e o alvo molecular .....	76
Figura 16 - RMSD dos átomos de Ca do Cav1.2 e dos compostos .....	78

Figura 17 - RMSF para os átomos de C $\alpha$ do canal CaV1.2 e dos compostos .....	80
Figura 18 - Simulações de dinâmica molecular durante 1000ps .....	80

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito do I3C sobre a PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.....	70
Gráfico 2 - Efeito vasorrelaxante induzido pelo I3C em artéria mesentérica superior isolados de rato normotenso, pré-contraídos com FEN.....	72
Gráfico 3 - Efeito vasorrelaxante induzido pelo I3C em artéria mesentérica de ratos normotensos, pré-contraídos com KCl 60 mM. ....	73
Gráfico 4 - Efeito inibitório do I3C na resposta contrátil induzida por CaCl <sub>2</sub> em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos normotensos. ....	81
Gráfico 5 - Efeito vasorrelaxante induzido pelo I3C em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644.....	82
Gráfico 6 - Efeito do I3C sobre a PAM, PAS e PAD nos diferentes grupos após o tratamento.....	84
Gráfico 7 - Efeito do I3C sobre a FC nos diferentes grupos após o tratamento ....	85

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Classificação da PA de acordo com a medição casual ou no consultório a partir de 18 anos de idade.....	40
Tabela 2 - Descrição da proteína selecionada no estudo .....	63
Tabela 3 - Valores de energia de ligação do I3C e do nifedipino analisados no alvo molecular domínio regulador C-terminal de Ca <sub>v</sub> 1.2 ligado a calmodulina .....	74
Tabela 4 - Valores de energia de ligação do I3C e do nifedipino analisados no alvo molecular domínio regulador C-terminal de Ca <sub>v</sub> 1.2 ligado a calmodulina, após os cálculos de normalização de docking molecular .....	75

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Composição da solução de Tyrode. ....	49
Quadro 2 - Composição da solução de Tyrode nominalmente sem cálcio. ....	50
Quadro 3 - Composição da solução despolarizante de Tyrode com KCl à 20 mM. .....	50
Quadro 4 - Composição da solução despolarizante com KCl à 60 mM. ....	50
Quadro 5 - Composição da solução despolarizante com KCl 60 mM nominalmente sem cálcio. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentração de cálcio intracelular
<b>2D</b>	Two-dimensional (Bidimensional)
<b>3D</b>	Three-dimensional (Tridimensional)
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ADH</b>	Hormônio antidiurético
<b>AINE</b>	Anti-inflamatório não esteroidal
<b>Ang I</b>	Angiotensina I
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AVE</b>	Acidente vascular encefálico
<b>BB</b>	Betabloqueadores
<b>BCCs</b>	Bloqueadores dos canais para cálcio
<b>bpm</b>	Batimentos por minuto
<b>BRA</b>	Bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon cálcio
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cálcio
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>Ca<sub>v</sub></b>	Canais para Ca <sup>2+</sup> dependentes de voltagem
<b>Ca<sub>v</sub>1.2</b>	Canal para Ca <sup>2+</sup> dependente de voltagem do tipo L
<b>CCl<sub>4</sub></b>	Tetracloreto de carbono
<b>CCS</b>	Centro de Ciências da Saúde
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração de uma substância responsável por 50% do efeito máximo
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CMLV</b>	Células musculares lisas vasculares
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CTL</b>	Controle
<b>DAC</b>	Doença arterial coronária
<b>DC</b>	Débito cardíaco
<b>DCV</b>	Doenças cardiovasculares

<b>DHP</b>	Di-hidropiridina
<b>DIM</b>	3,3'-diindolilmetano
<b>DIU</b>	Diuréticos
<b>DS</b>	Débito sistólico
<b>DSC</b>	<i>Docking Score Correction</i>
<b>e.p.m.</b>	Erro padrão da média
<b>ECA</b>	Enzima conversora de angiotensina
<b>EDHF</b>	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
<b>E<sub>max</sub></b>	Efeito máximo
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ET-1</b>	Endotelina-1
<b>FA</b>	Fibrilação atrial
<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FEN</b>	L(-)-fenilefrina
<b>GROMACS</b>	Groningen Machine for Chemical Simulations
<b>HAS</b>	Hipertensão arterial sistêmica
<b>HVA</b>	Canais para Ca <sup>+2</sup> ativados por alta voltagem
<b>i.p.</b>	Intrapерitoneal
<b>i.v.</b>	Intravenoso
<b>I3C</b>	Indol-3-carbinol
<b>IC</b>	Insuficiência cardíaca
<b>IECA</b>	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
<b>IP<sub>3</sub></b>	1,4,5 trisfosfato de inositol
<b>IPeFarM</b>	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
<b>LVA</b>	Canais para Ca <sup>+2</sup> ativados por baixa voltagem
<b>MLCK</b>	<i>Miosinoquinase da cadeia leve</i>
<b> mM</b>	Milimolar
<b>MM</b>	Massa Molecular
<b>mmHg</b>	Milímetro de mercúrio
<b>MVD</b>	Molegro Virtual Docker
<b>n</b>	Número de experimentos realizados
<b>NO</b>	Óxido nítrico

<b>NPS</b>	Nitroprussiato de sódio
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PA</b>	Pressão arterial
<b>PAD</b>	Pressão arterial diastólica
<b>PAM</b>	Pressão arterial média
<b>PAN</b>	Peptídeo atrial natriurético
<b>PAP</b>	Pressão arterial pulsátil
<b>PAS</b>	Pressão arterial sistólica
<b>PDB</b>	Protein Data Bank (Banco de Dados de Proteínas)
<b>PE-10</b>	Cateter de polietileno 10
<b>PE-50</b>	Cateter de polietileno 50
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>pH</b>	Potencial hidrogenionico
<b>PPgPNSB</b>	Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
<b>RMSD</b>	Root Mean Square Deviation (Raiz do Desvio Quadrático Médio)
<b>RMSF</b>	Root Mean Square Fluctuation (Raiz da Flutuação Quadrática Média)
<b>ROCC</b>	Canais para Ca <sup>+2</sup> operados por receptor
<b>RS</b>	Retículo sarcoplasmático
<b>RVPT</b>	Resistência vascular periférica total
<b>SHR</b>	Spontaneously hypertensive rats (Rato espontaneamente hipertenso)
<b>SNA</b>	Sistema nervoso autônomo
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNS</b>	Sistema nervoso simpático
<b>SPC</b>	Single Point Charge (Carga pontual simples)
<b>SRAA</b>	Sistema renina angiotensina aldosterona
<b>TxA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>UFPB</b>	Universidade Federal da Paraíba
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>UPA</b>	Unidade de produção animal

<b>v.o.</b>	Via oral
<b>VOCC</b>	Canais para Ca <sup>+2</sup> operados por voltagem
<b>vs.</b>	versus
<b>WKY</b>	Rato Wistar Kyoto

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução.....</b>	<b>27</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>30</b>
2.1 Objetivo Geral .....	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
<b>3 Fundamentação teórica.....</b>	<b>32</b>
3.1 Mecanismos de regulação da pressão arterial .....	32
3.2 Controle do tônus vascular e o papel dos canais para cálcio .....	34
3.3 Hipertensão arterial sistêmica .....	38
3.4 Ratos espontaneamente hipertensos.....	40
3.5 Terapia da hipertensão arterial .....	41
3.6 Produtos naturais.....	43
3.7 Indol-3-carbinol .....	44
<b>4 Material.....</b>	<b>48</b>
4.1 Animais .....	48
4.2 Substâncias e reagentes.....	48
4.3 Obtenção e preparação do I3C .....	49
4.4 Soluções nutritivas .....	49
4.5 Equipamentos .....	51
<b>5 Métodos.....</b>	<b>53</b>
5.1 Ensaios farmacológicos para estudos <i>in vivo</i> .....	53
5.1.1 Medida direta da PA e da FC de ratos não anestesiados.....	53
5.1.2 Estudo dos efeitos hemodinâmicos em ratos normotensos.....	54
5.2 Ensaios farmacológicos para estudos <i>in vitro</i> .....	55
5.2.1 Preparação dos anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos ..	55
5.2.2 Protocolos experimentais utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos .....	56
5.2.2.1 Avaliação do efeito do I3C em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com FEN .....	57
5.2.2.2 Avaliação do efeito do I3C em anéis mesentéricos de ratos normotensos pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 60 mM) .....	59

5.2.2.3 Avaliação do efeito do I3C sobre as contrações induzidas por CaCl <sub>2</sub> em anéis mesentéricos de ratos normotensos.....	60
5.2.2.4 Avaliação do efeito do I3C sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644 em anéis de artéria mesentérica isolada de rato normotenso.....	61
5.3 Ensaios para estudos <i>in silico</i> .....	62
5.3.1 Simulações de <i>docking</i> molecular .....	62
5.3.1.1 Avaliação da interação entre os ligantes e o alvo molecular .....	62
5.3.1.2 Interações do acoplamento molecular e obtenção das figuras .....	64
5.3.2 Simulações de dinâmica molecular .....	64
5.4 Ensaios farmacológicos para estudos <i>in vivo</i> após o tratamento com o I3C em ratos hipertensos .....	67
5.4.1 Estudo dos efeitos hemodinâmicos em ratos hipertensos.....	68
5.5 Análise Estatística.....	68
<b>6 Resultados.....</b>	<b>70</b>
6.1 Efeito induzido pelo I3C sobre a PAM e a FC em ratos normotensos não anestesiados .....	70
6.2 Efeito relaxante do I3C em artéria mesentérica de ratos, pré-contraídos com FEN .....	71
6.3 Efeito relaxante do I3C em artéria mesentérica de ratos, pré-contraídos com KCl 60 mM.....	72
6.4 Simulações de <i>docking</i> molecular .....	73
6.5 Simulações de dinâmica molecular .....	77
6.6 Efeito do I3C sobre as contrações induzidas por CaCl <sub>2</sub> em artéria mesentérica de ratos.....	81
6.7 Efeito do I3C sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644 em artéria mesentérica de ratos .....	82
6.8 Efeitos induzidos pelo I3C na PA de ratos hipertensos após o tratamento..	83
6.9 Efeitos induzidos pelo I3C na FC de ratos hipertensos após o tratamento..	85
<b>7 Discussão.....</b>	<b>87</b>
<b>8 Conclusões.....</b>	<b>95</b>
<b>Referências.....</b>	<b>97</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>116</b>
Anexo 1 – Certidão de aprovação da CEUA-UFPB 056/2016.....	116

Anexo 2 – Certidão de aprovação da CEUA-UFPB 4234221121 .....	117
Anexo 3 – Declaração de aprovação da CEUA-UFPB 066/2017 .....	118

# *Introdução*

## 1 Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) compreendem todas as patologias do coração e dos vasos sanguíneos e são a principal causa de morte, hospitalizações e atendimentos ambulatoriais no mundo (WHO, 2021; NAGHAVI et al., 2017). No ano de 2019, estima-se que as DCV foram responsáveis por 17,9 milhões de mortes, número esse que representa aproximadamente 32 % de todas as mortes globais (WHO, 2021).

Entretanto, em dezembro de 2019 surgiu a pandemia provocada pela doença ocasionada pelo novo coronavírus 2019 (COVID-19) gerando um alto percentual de óbitos na população. No Brasil, o primeiro caso foi divulgado em 25 de fevereiro de 2020, e, em 17 de junho, foram acumulados 923.189 casos, com 45.241 óbitos (MARTINS et al., 2020). Além disso, estudos mostram uma correlação da infecção por COVID-19 com as DCV, em que pacientes que possuem fatores de risco cardíacos como, por exemplo, pacientes hipertensos, idosos e diabéticos, parecem apresentar uma probabilidade maior de adquirir a COVID-19, podendo demonstrar uma maior gravidade e possíveis sequelas dessa doença (MOTA et al., 2022).

O principal fator de risco, modificável, para o desenvolvimento das DCV é a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (BARROSO et al., 2021). A HAS é uma condição clínica, multifatorial, caracterizada pela elevação sustentada da pressão arterial (PA). Esta condição representa um impacto significativo tanto nos custos médicos como nos socioeconômicos, devido a complicações de maior gravidade, as quais podem ser fatais, incluindo doença arterial coronária (DAC), insuficiência cardíaca (IC), fibrilação atrial (FA), morte súbita, acidente vascular encefálico (AVE), entre outros (BARROSO et al., 2021). A sua prevalência está aumentando globalmente, em virtude do envelhecimento da população e ao aumento a exposição aos fatores de risco, como as dietas não saudáveis (MILLS; STEFANESCU; HE, 2020).

Nos últimos anos, a HAS resistente a medicamentos tem sido uma preocupação para a população, pois tem se tornado cada vez mais prevalente (MILLS; STEFANESCU; HE, 2020; PIJACKA et al., 2016; PIKE et al., 2017). Além disso, as abordagens farmacológicas ou a sua combinação podem não ser eficazes para o tratamento da doença e muitos pacientes podem apresentar uma evolução silenciosa dos sintomas, tornando-se vulneráveis ao risco de outras DCV e dessa forma culminar no óbito (PIJACKA et al., 2016; PIKE et al., 2017).

Em virtude disso, os pesquisadores têm intensificado a investigação para o desenvolvimento de novas alternativas de classe de anti-hipertensivos que possam auxiliar na manutenção dos níveis normais da PA, principalmente drogas, que atuam nas células musculares lisas vasculares (CMLV) com a capacidade de controlar a doença. Os vasodilatadores atuam relaxando as paredes das CMLV reduzindo a PA (VERAS et al., 2018).

Os bloqueadores dos canais para cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) (BCCs) são uma alternativa para diminuir o tônus vascular (ABERNETHY; SCHWARTZ, 1999). Eles atuam se ligando à subunidade  $\alpha$ -1C dos canais para  $\text{Ca}^{+2}$  dependentes de voltagem ( $\text{Ca}_v$ ) do tipo L ( $\text{Ca}_v1.2$ ) inibindo o influxo transmembranar desses íons nas CMLV dos vasos sanguíneos. A menor concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{+2}]_i$ ) induz vasodilatação, redução da resistência vascular periférica total (RVPT) e, consequentemente, promove uma redução nos níveis pressóricos (HOCKERMAN et al., 1997; GODFRAIND, 2014).

Os produtos naturais apresentam propriedades biológicas e efeitos farmacológicos no corpo humano, dessa forma a procura por plantas medicinais nas últimas décadas tem aumentado (THOMFORD et al., 2018; LI et al., 2020). Os alcaloides indólicos derivados de plantas têm demonstrado numerosos benefícios medicinais, e o seu uso são frequentemente relatados no controle de DCV (ROMERO et al., 2019), podendo serem úteis para o tratamento da HAS (WU et al., 2020).

O Indol-3-carbinol (I3C), objeto do presente estudo, é um alcaloide indólico facilmente encontrado na dieta em vegetais crucíferos, incluindo o brócolis, couve-flor e repolho (SHERER et al., 2017), que possui propriedades anticancerígenas (KATZ; NISANI; CHAMOVITZ, 2018), anti-inflamatória (HASAN et al., 2018) e antioxidante (CHOI; ABDELMEGEED; SONG, 2018). Além disso, o I3C já se encontra disponível em preparações comerciais como suplemento alimentar, sendo consumido por uma grande parcela da população mundial devido os seus diversos benefícios para a saúde humana (KRISTAL; LAMPE, 2002; SINGH et al., 2021a; LICZNERSKA; BAER-DUBOWSKA, 2016).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo I3C utilizando animais normotensos e hipertensos, utilizando abordagens *in vivo*, *in vitro* e *in silico*, buscando evidenciar o possível mecanismo de ação referente a esses efeitos.

# *Objetivos*

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos cardiovasculares induzidos pelo I3C em animais normotensos e hipertensos, através de uma abordagem *in vivo*, *in vitro* e *in silico*, procurando elucidar o possível mecanismo de ação implicado nesses efeitos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Estudar os efeitos induzidos pela administração aguda do I3C sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos;
- ✓ Avaliar o efeito do I3C em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos normotensos;
- ✓ Realizar a ancoragem (*docking*) molecular, observando a interação do I3C com canal Ca<sub>v</sub>1.2;
- ✓ Investigar a flexibilidade de interações entre o complexo proteína-ligante através de análises de simulações de dinâmica molecular;
- ✓ Investigar o efeito do tratamento por via oral com o I3C, em animais normotensos Wistar Kyoto (WKY) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR), sobre a PA e a FC.

# *Fundamentação Teórica*

### **3 Fundamentação teórica**

#### **3.1 Mecanismos de regulação da pressão arterial**

O sistema cardiovascular é constituído pelo coração, vasos sanguíneos e sangue, desempenhando como função primordial em atender às necessidades das células corporais através do transporte de nutrientes para os diversos tecidos do corpo humano, transporte de resíduos de produtos, transporte de hormônios, e em geral, manter um ambiente adequado em todos os líquidos teciduais para garantir a sobrevivência e o funcionamento adequado das células (SILVERTHORN, 2017; GUYTON; HALL, 2021). Esse sistema é o principal responsável pela regulação e manutenção da PA (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001).

A PA, medida em milímetros de mercúrio (mmHg), pode ser definida como a força exercida pelo sangue contra qualquer unidade de área da parede do vaso sanguíneo. Ela é determinada por fatores como o débito cardíaco (DC) e a RVPT. A interação entre esses dois fatores físicos pode ser expressado matematicamente pela equação:  $PAM = DC \times RVPT$  (GUYTON; HALL, 2021; DE BRITO et al., 2021).

O DC, é definido como a quantidade de sangue ejetada pelo coração a cada minuto, e pode ser modificado pela variação da FC ou pelo volume de sangue ejetado pelos ventrículos, em cada batimento cardíaco, volume esse conhecido como débito sistólico (DS). Logo, o DC é expresso pela seguinte equação matemática:  $DC = FC \times DS$  (KOEPPEN; STANTON, 2009). Já a RVPT corresponde ao impedimento ao fluxo sanguíneo em um vaso e é determinada sobretudo pelo tônus vascular de pequenos vasos, especialmente arteríolas, que tem a capacidade de se contrair (GUYTON; HALL, 2021; MAYET; HUGHES, 2003; SAUGEL et al., 2021).

Os níveis de PA são regulados por meio de alterações no DC e na RVPT (MAGDER, 2018), através das ações integradas de vários sistemas como o próprio sistema cardiovascular, neural, renal e endócrino (DE BRITO et al., 2021). Os mecanismos regulatórios atuam ajustando a PA por meio de sistemas de retroalimentação que respondem em curto e em longo prazo (DAMPNEY et al., 2002).

O controle rápido da PA ocorre em períodos de segundos a minutos através do sistema nervoso central (SNC), principalmente por intermédio do sistema nervoso

autônomo (SNA), através de mecanismos neurais tais como: reflexo barorreceptor, reflexo quimiorreceptor e o reflexo cardiopulmonar (GUYTON; HALL, 2021).

Dentre estes, destaca-se o reflexo barorreceptor que é um mecanismo nervoso amplamente conhecido no controle da PA. Os barorreceptores são mecanorreceptores sensíveis ao estiramento, localizados na parede do vaso sanguíneo, mais precisamente no seio carotídeo e na parede do arco aórtico. As pulsações de PA que ocorrem a cada batimento cardíaco esticam a parede elástica do vaso, e essa distensão arterial, por sua vez, ativa os barorreceptores, fazendo com que transmitam sinais para o SNC. Esses sinais, através de mecanismos de *feedback*, são enviados de volta por meio do SNA para a circulação, para reduzir a PA até os níveis de normalidade (KIRCHHEIM, 1976; KUMADA; TERUI; KUWAKI, 1990; MIN et al., 2019; GUYTON; HALL, 2021).

Em longo prazo a PA é regulada, principalmente, através de uma interação entre dois sistemas, renal e endócrino, que promovem o equilíbrio de fluidos corporais e o balanço eletrolítico dos compartimentos intra e extracelulares. O mecanismo fundamental para esse controle é o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), que regula o volume dos líquidos corpóreos (volemia). Trata-se de um sistema composto pela enzima proteica renina, que é sintetizada e armazenada nas células justaglomerulares (células JG) dos rins. Quando ocorre uma queda na PA, a renina é liberada e converte o angiotensinogênio em angiotensina I (ANG I), em seguida é clivada no octapeptídio angiotensina II (Ang II), pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (WU et al., 2018; DE MELLO, 2017). Especificamente, na patogênese de DCV como a hipertensão, a Ang II se liga ao seu receptor acoplado à proteína G, conhecido como AT1R, nas CMLV, o que aumenta a contratilidade dos vasos levando à elevação da PA (KARNIK et al., 2015; VAN THIEL et al., 2015; ZHAO et al., 2018).

Mecanismos hormonais também estão relacionados com o controle da PA, de modo que o hormônio antidiurético (ADH ou vasopressina) e a ação das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) podem ocasionar o aumento dos níveis pressóricos. Por outro lado, a liberação do peptídeo atrial natriurético (PAN) e a ativação do sistema calicreína-cininas podem reduzir a PA (KOEPFEN; STANTON, 2009).

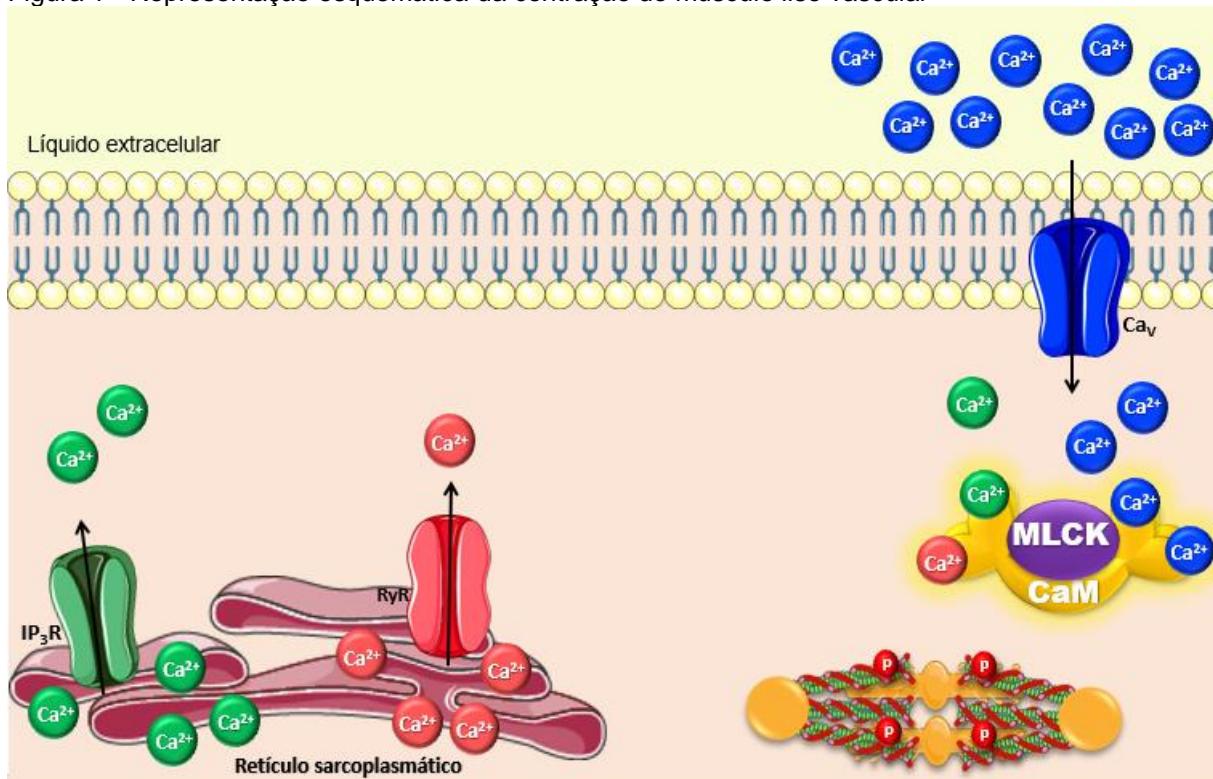
### 3.2 Controle do tônus vascular e o papel dos canais para cálcio

O íon  $\text{Ca}^{+2}$  é um segundo mensageiro muito importante na regulação do tônus vascular e na sinalização das células, uma vez que atua regulando as principais funções fisiológicas, tais como: a secreção de neurotransmissores, a contração muscular, o crescimento e a migração celular e a atividade de diversas proteínas, incluindo enzimas, canais iônicos e transportadores (LOH et al., 2018; SHAH et al., 2022).

Em condições fisiológicas normais, a concentração dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  fora da célula é cerca de 3-4 mM, o que corresponde a mil vezes maior do que dentro da célula, que normalmente é mantida em ou abaixo de 100 nM (MCFADZEAN; GIBSON, 2002). Geralmente, existem dois tipos distintos de canais para  $\text{Ca}^{+2}$ : canais para  $\text{Ca}^{+2}$  operados por voltagem (VOCCs), também chamados de  $\text{Ca}_v$ ; e canais para  $\text{Ca}^{+2}$  operados por receptor (ROCCs) (LOH et al., 2018).

A  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  é aumentada através (1) do influxo de íons  $\text{Ca}^{+2}$  do exterior ou da (2) liberação intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  do estoque do retículo sarcoplasmático (RS). Os íons  $\text{Ca}^{+2}$  se ligam reversivelmente a calmodulina (CaM) e o complexo  $\text{Ca}^{+2}\text{-CaM}$  se une a miosina e ativa uma enzima fosforilante, a *miosinoquinase da cadeia leve (MLCK)*. Desta forma, a MLCK ativa fosforila o filamento de actina causando a contração do músculo liso vascular (Figura 1) (GUYTON; HALL, 2021).

Figura 1 - Representação esquemática da contração do músculo liso vascular

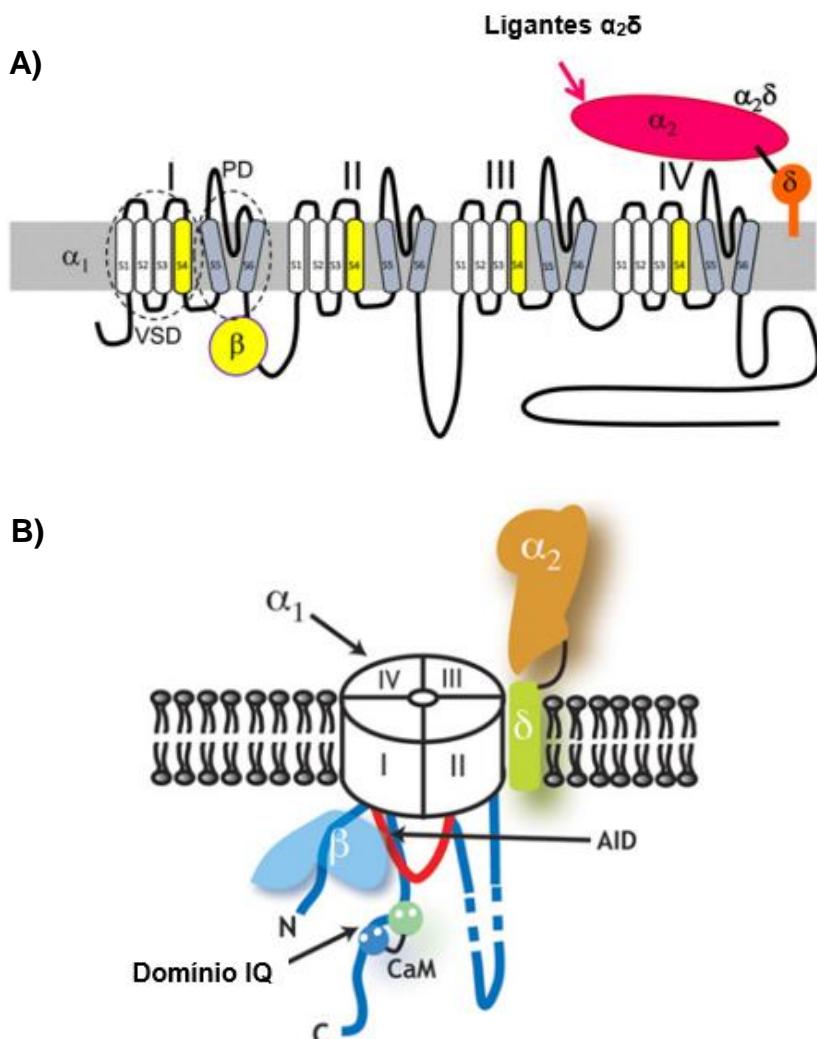


A concentração dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta quando o  $\text{Ca}^{2+}$  entra na célula através dos canais  $\text{Ca}_v$  presente na membrana da célula ou quando é liberado do RS. O  $\text{Ca}^{2+}$  se liga a CaM para formar o complexo  $\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}$ , que então ativa a MLCK. A MLCK ativa fosforila a cadeia leve da miosina, levando à ligação da cabeça da miosina com o filamento de actina levando à contração do músculo liso vascular.

Fonte: Autor, 2022.

Os canais  $\text{Ca}_v$ , tiveram a sua nomenclatura proposta por Ertel e os seus colaboradores (2000) e posteriormente aprovada pelo Subcomitê NC – IUPHAR (CATTERALL et al., 2005). Estruturalmente, os canais  $\text{Ca}_v$  formam complexos hetero-oligoméricos, compostos por uma subunidade  $\alpha_1$  central, associada a subunidades auxiliares ( $\alpha_2\delta$ ,  $\beta$  e em alguns tecidos  $\gamma$ ) (Figura 2), na qual a subunidade  $\alpha_1$  é a principal, pois é a formadora de poros e fornece o sítio de ligação para praticamente todos os agonistas e antagonistas. A subunidade  $\alpha_1$  é codificada por 10 genes que podem ser subdivididas em três tipos de famílias diferentes: (1) os canais sensíveis à di-hidropiridina (DHP) ativados por alta voltagem (tipo L, Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3, Cav1.4); (2) os canais insensíveis à DHP (Cav2.1, Cav2.2, Cav2.3) ativados por alta a moderada voltagem e (3) os canais ativados por baixa voltagem (tipo T, Cav3.1, Cav3.2, Cav3.3). Os canais ativados por alta voltagem, é provável que possuam as subunidades  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2\delta$  e  $\beta$ , já a subunidade  $\gamma$  está associada apenas ao canal Cav1.1 expresso no músculo esquelético (CATTERALL et al., 2021).

Figura 2 - Representação esquemática dos canais  $\text{Ca}_v$



Canais  $\text{Ca}_v$ . A) Disposição topológica do canal  $\text{Ca}_v$ ; B) Organização estrutural dos canais  $\text{Ca}_v$  na membrana. PD: domínio do poro; VSD: domínio sensível a voltagem; AID: domínio de interação α.

Fonte: ZAMPONI et al., 2015; VAN PETEGEM; MINOR JR, 2006.

Cada subunidade  $\alpha_1$  apresenta quatro domínios de repetição (I-IV), cada um possuindo seis seções transmembranares (S1-S6), sendo as hélices S1-S4 os domínios sensíveis a voltagem e as hélices S5-S6 a região formadora de poros. A alça intracelular entre as repetições I e II engloba o sítio de ligação para a subunidade  $\beta$ , enquanto que o terminal C inclui a região IQ, local onde a CaM se liga e contém os domínios efetores para a modulação  $\text{Ca}^{+2}$ -CaM (Figura 2) (SINGH, 2021b; CATTERALL et al., 2021; SAVALLI et al., 2016; XU et al., 2021). As subunidades acessórias, que são citosólicas, existem em quatro isoformas (1-4), que interagem com a subunidade  $\alpha_1$  para modular as propriedades do canal, como direcionamento à membrana plasmática, inativação do canal e ativação dependente da voltagem (JOSEPH et al., 2013).

Os canais  $\text{Ca}_v$  foram classificados levando-se em consideração a sua voltagem de ativação e a sua condutância, em canais para  $\text{Ca}^{+2}$  ativados por alta voltagem (HVA) e os canais para  $\text{Ca}^{+2}$  ativados por baixa voltagem (LVA) (DOLPHIN, 2006; FENG; KALYAANAMOORTHY; BARAKAT, 2018). Esses canais possuem propriedades de gating e perfis farmacológicos diferentes (DOLPHIN, 2006; CATTERALL, 2011). Os canais HVA são sensíveis a DHP, compreendendo tanto fármacos antagonistas (nifedipino) como fármacos agonistas as DHP (Bay K 8644) (HESS; LANSMAN; TSIEN, 1984) e apresentam um comprimento de ativação de longa duração sendo, portanto, conhecidos como canal DHP ou  $\text{Ca}_v1.2$  (TANG et al., 2014; TANG et al., 2016). Por outro lado, os canais LVA são caracterizados por sua ativação de forma rápida, pequena condutância unitária, rápida cinética de decaimento e são chamados de canal para  $\text{Ca}^{+2}$  tipo T (LACINOVÁ, 2005; DOLPHIN, 2006).

Além desses, existem outros canais para  $\text{Ca}^{+2}$ , como: os canais sensíveis a  $\omega$ -conotoxina, sendo portanto conhecidos como canais para  $\text{Ca}^{+2}$  tipo N (neuronais) e apresentam importantes papéis no sistema nervoso; canais sensíveis a  $\omega$ -agatoxina, nomeados de canais para  $\text{Ca}^{+2}$  tipo P/Q, encontrados nas células de Purkinje do cerebelo; e também os canais insensíveis a qualquer toxina, classificados como canais para  $\text{Ca}^{+2}$  do tipo R (resistentes) (FENG; KALYAANAMOORTHY; BARAKAT, 2018).

O canal para  $\text{Ca}^{+2}$  mais predominante que está presente no sistema cardiovascular de mamíferos adultos, em particular os miócitos cardíacos, é o  $\text{Ca}_v1.2$  ( $\alpha_1\text{C}$ ), um tipo de canal HVA (CRIBBS, 2010; SHAH et al., 2022). Esse canal desempenha um fundamental papel fisiológico na contração do músculo liso vascular e reatividade vascular, pois ele serve como o canal primário para regular a entrada dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  para o acoplamento excitação-contração, portanto, sendo essencial no controle do fluxo sanguíneo e da PA (SYED et al., 2019; SENGUPTA et al., 2021; SHAH et al., 2022).

Além dos canais para  $\text{Ca}^{+2}$ , o endotélio vascular também desempenha papel importante no controle do tônus vascular. O tônus adequado é obtido através do equilíbrio dinâmico preciso entre os fatores vasoconstritores e vasorrelaxantes (LEDOUX et al., 2006). Os fatores vasoconstritores liberados pelo endotélio vascular incluem o tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>); a endotelina-1 (ET-1); as espécies reativas de oxigênio (EROs) e a angiotensina II (Ang II) (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009;

FÉLÉTOU; KOHLER; VANHOUTTE, 2010). E os fatores relaxantes derivados do endotélio vascular são o óxido nítrico (NO); fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989; JIN et al., 2011).

### **3.3 Hipertensão arterial sistêmica**

A HAS é uma condição clínica crônica não transmissível e de etiologia multifatorial que depende da interação entre fatores genéticos/epigenéticos, ambientais e sociais, caracterizada por níveis elevados e sustentados da PA, medida utilizando-se técnica correta e equipamentos validados e calibrados, em pelo menos dois dias diferentes, e na ausência de medicação anti-hipertensiva (BARROSO et al., 2021). Associa-se, comumente, a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo, tais como coração, cérebro, rins e vasos, bem como a fatores de risco metabólicos, com aumento do risco de complicações cardiovasculares fatais e não fatais (CAREY et al., 2018).

Além disso, é a condição mais frequentemente encontrada na atenção primária, e representa um importante problema de saúde pública global, causando 9,4 milhões de mortes por ano (JAMES et al., 2014; MOURA et al., 2015). Estima-se que aproximadamente 1,5 bilhão de adultos no mundo desenvolverão hipertensão na próxima década e, dessa forma, a redução dos níveis predominantes de PA tornou-se uma prioridade global (CHOPRA; RAM, 2019).

A prevalência da HAS vem aumentando devido ser uma condição frequentemente assintomática nas suas fases iniciais, além da baixa adesão, aliada a falta de conscientização por parte da população, que contribuem para as baixas taxas de tratamento e controle, acometendo não apenas os idosos, mas também, consideravelmente, indivíduos mais jovens (MOURA et al., 2015; BARROSO et al., 2021; IBRAHIM; DAMASCENO, 2012). No Brasil, a HAS atinge 32,5% de indivíduos adultos e mais de 60% de idosos, colaborando direta ou indiretamente em 50% das mortes por doença cardiovascular (SCALA; MAGALHÃES; MACHADO, 2015). De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (2019), no Brasil mais de 38 milhões de pessoas, com 18 anos ou mais, são diagnosticados com a doença (JULIÃO; SOUZA; GUIMARÃES, 2021).

Além disso, a alta prevalência da doença se deve, também, ao envelhecimento da população e ao aumento da exposição a fatores de risco do estilo de vida, incluindo dietas pouco saudáveis, sedentarismo, tabagismo, bem como algumas condições clínicas como diabetes, dislipidemia e obesidade (MILLS; STEFANESCU; HE, 2020; WHO, 2013). Embora haja uma tendência ascendente na incidência da HAS, as disparidades globais da doença são grandes e crescentes, de modo que, desde 2000, relatórios nacionais indicam que a prevalência está aumentando em países de baixa e média renda, ao passo que é estável ou decrescente em países de alta renda (MILLS; STEFANESCU; HE, 2020).

Dependendo do mecanismo envolvido na patogênese, pode ser caracterizada como hipertensão primária (essencial) ou secundária. A hipertensão primária representa a maioria dos casos e, geralmente, surge na vida adulta ou com o envelhecimento em decorrência da interação entre o estilo de vida e fatores genéticos e ambientais não específicos. Em contrapartida, a hipertensão secundária tem menor prevalência, se desenvolve em uma idade mais precoce, e apresenta um fator desencadeante identificável, como um distúrbio renal ou endócrino, ou uma iatrogenia desencadeante, como o uso de contraceptivos orais (POULTER; PRABHAKARAN; CAULFIELD, 2015; KHOR; CAI, 2017).

A avaliação inicial de um paciente inclui a confirmação do diagnóstico de hipertensão, a suspeita e a identificação de alguma causa secundária, a avaliação do risco cardiovascular, bem como a investigação de lesões em órgãos-alvo e doenças associadas. Compõem essa avaliação a medida da PA no consultório e/ou fora dele, a obtenção de história médica, a realização de exame físico e a investigação clínica e laboratorial (MALACHIAS et al., 2016). Segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (HA), é considerado hipertensão valores de pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) igual ou acima de 140 por 90 mmHg, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação da PA de acordo com a medição casual ou no consultório a partir de 18 anos de idade.

Classificação	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
<b>PA ótima</b>	< 120	< 80
<b>PA normal</b>	120-129	80-84
<b>Pré-hipertensão</b>	130-139	85-89
<b>Hipertensão estágio 1</b>	140-159	90-99
<b>Hipertensão estágio 2</b>	160-179	100-109
<b>Hipertensão estágio 3</b>	≥ 180	≥ 110

Fonte: BARROSO et al., 2021.

Em comparação à diretriz brasileira anterior, a PA normal passa a ser denominada de PA ótima, e a pré-hipertensão passa a ser dividida em PA normal e pré-hipertensão. Os indivíduos que apresentam PAS entre 130 e 139 mmHg e PAD entre 85 e 89 mmHg passam a ser caracterizados como pré-hipertensos, uma vez que apresentam maior risco de doença cardiovascular, doença arterial coronariana e acidente vascular encefálico, além de possuírem maior risco de ser portadores de HA mascarada, em relação a indivíduos com níveis entre 120 e 129 ou 80 e 84 mmHg (BARROSO et al., 2021; WEBER et al., 2014; EGAN; STEVENS-FABRY, 2015).

É importante salientar que a medida inadequada da PA pode resultar em uma classificação imprecisa, superestimação ou subestimação da verdadeira PA, levando o paciente a ser submetido ao tratamento desnecessário, ou a ausência de tratamento em hipertensos mal avaliados (BARROSO et al., 2021).

### 3.4 Ratos espontaneamente hipertensos

A utilização de modelos para experimentação animal apresenta múltiplas vantagens no estudo da HAS, como a triagem farmacológica de potenciais fármacos anti-hipertensivos, além de possibilitar uma compreensão minuciosa dos aspectos relativos a etiologia, desenvolvimento e progressão da doença. Além disso, o curto tempo de vida, tamanho pequeno e custo relativamente baixo dos animais possibilitam o estudo da história natural, fatores genéticos e alterações fisiopatológicas na hipertensão (LEONG; NG; JAARIN, 2015).

Nos anos 60, pesquisadores da faculdade de medicina de Kyoto no Japão se mobilizaram para gerar um modelo genético de hipertensão por cruzamento seletivo. Para isso, um animal macho, que possuía PA média entre 150-170 mmHg, e um animal fêmea, com PA média entre 130-140 mmHg, foram selecionados entre 68 ratos da linhagem Wistar em condições normais e acasalados. Em seguida, aferiram a PA da prole e acasalaram os animais que apresentaram hipertensão persistente por mais de um mês, e repetiram o mesmo procedimento para as gerações posteriores, de modo que o traço de hipertensão se desenvolveu e fixou totalmente por acasalamento seletivo dos ratos irmão-irmã na geração F3. Esses animais foram chamados de SHR (DORIS, 2017; OKAMOTO; AOKI, 1963).

A linhagem SHR, modelo animal escolhido no presente trabalho, vem sendo amplamente utilizada como modelo experimental de DCV, uma vez que as alterações fisiopatológicas observadas nesses animais se assemelham às observadas na hipertensão humana primária (CARVALHO et al., 2020). Essas semelhanças incluem a predisposição genética para HAS sem etiologia específica, aumento da RVPT sem expansão de volume, e resposta igual a tratamento com drogas (FAZAN et al., 2006).

Além disso, uma outra vantagem desse modelo bastante relevante é a possibilidade de se estudar a progressão da hipertensão, igualmente em humanos, uma vez que também são observadas três fases: pré-hipertensão, desenvolvimento, e sustentação dos níveis pressóricos (CARVALHO et al., 2020). Os animais SHR desenvolvem a HAS com 5 semanas de vida, apresentando níveis pressóricos considerados como hipertensão espontânea entre a 7<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> semanas, atingindo um platô entre a 20<sup>a</sup> e a 28<sup>a</sup> semanas. No entanto, alguns fatores como a ingestão aumentada de sódio, estresse, alterações sociais e no ciclo claro/escuro, acabam afetando o desenvolvimento da doença (FAZAN JR; SILVA; SALGADO, 2001).

### **3.5 Terapia da hipertensão arterial**

A abordagem terapêutica da HAS é baseada na tentativa de controle dos valores pressóricos, incluindo medidas não farmacológicas, bem como medidas farmacológicas. O objetivo principal dessa abordagem é, através da redução da PA, proteger o indivíduo de danos em órgãos-alvo e prevenir complicações cardiovasculares e mortalidade associados à doença. A decisão terapêutica deve ser

definida individualmente, sempre considerando a presença de lesões em órgãos-alvo e as comorbidades do paciente (CORRÊA et al., 2016).

O tratamento não farmacológico tem como principal finalidade diminuir a morbimortalidade cardiovascular através de mudanças do estilo de vida que favoreçam a redução da PA (DE PAFFER FILHO et al., 2018). Essas mudanças podem ser utilizadas como coadjuvantes às medidas farmacológicas, e envolve cessação do tabagismo, mudança dos hábitos alimentares, diminuição da ingestão habitual de sódio, controle do estresse, prática de exercícios físicos, moderação no consumo de bebidas alcoólicas, e controle do peso corporal (BARROSO et al., 2021).

As principais classes de anti-hipertensivos que são mais recomendadas atualmente são: diuréticos (DIU), bloqueadores dos canais de Ca<sup>2+</sup> (BCCs), inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II (BRA), betabloqueadores (BB), simpatolíticos de ação central, alfabloqueadores, vasodilatadores diretos e inibidores diretos da renina (BARROSO et al., 2021).

O tratamento medicamentoso pode ser iniciado com monoterapia ou com combinação de fármacos, sendo esta última a estratégia terapêutica preferencial para a maioria dos indivíduos hipertensos, independentemente do estágio da HAS e do risco cardiovascular associado (BARROSO et al., 2021; WHELTON et al., 2017; WILLIAMS et al., 2018; TASK FORCE OF THE LATIN AMERICAN SOCIETY OF HYPERTENSION, 2017; MANCIA et al., 2019; PÓVOA et al., 2014; YUGAR-TOLEDO et al., 2020; GRADMAN et al., 2010; WALD et al., 2009; LAW et al., 2003).

Apesar da disponibilidade de diversas classes de fármacos para o tratamento da HAS, existem casos de indivíduos que apresentam a PA descontrolada ou de difícil controle (YAXLEY; THAMBAR, 2015). Nos Estados Unidos, aproximadamente 53% dos adultos hipertensos que fazem uso de medicação anti-hipertensiva apresentam PA não controlada (CASEY et al., 2019), enquanto que no Brasil, um estudo demonstrou que apenas 50,7% dos adultos que relataram o uso de anti-hipertensivos apresentaram PA controlada (FIRMO et al., 2019). O fato de que parte dos indivíduos hipertensos não respondem ao tratamento medicamentoso anti-hipertensivo, evidencia a necessidade de novas abordagens farmacológicas para o controle da PA.

Além disso, estudos demonstram que a taxa de abandono é crescente após o início do tratamento (MASCARENHAS, 2006). Estima-se que aproximadamente 40% dos hipertensos abandonam a medicação durante o primeiro ano de uso (OLIVEIRA

et al., 2017), o que demonstra que a não adesão é um fator de impedimento para o alcance dos objetivos terapêuticos, pelo uso irracional de medicamentos, bem como por agravos no processo patológico (CARVALHO et al., 2012). Os indivíduos citam como principais motivos para a interrupção do tratamento: ausência de sintomas da doença (37%), falta de medicamentos (25,4%), dificuldade de acesso ao sistema de saúde (15,3%), efeitos adversos da medicação (8,1%), orientações médicas incompletas ou ausentes (6,5%), entre outros (7,7%) (MASCARENHAS, 2006).

### **3.6 Produtos naturais**

Os produtos naturais são utilizados para o tratamento de doenças humanas desde a antiguidade. Existem cerca de 500.000 espécies de plantas em todo o mundo (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018), sendo o Brasil o país que detém a maior diversidade, correspondendo a um percentual de 18% da biodiversidade vegetal (BIAZOTTO et al., 2019). A fauna e a flora brasileira apresentam uma grande variedade de plantas, contendo compostos naturais que apresentam estruturas complexas e específicas de bastante interesse para a química medicinal, no desenvolvimento de novos fármacos (DUTRA et al., 2016; VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1985, 80% da população mundial confiava nos medicamentos tradicionais baseados em plantas para os cuidados primários de saúde (FARNSWORTH et al., 1985). Além disso, um levantamento realizado sobre os novos medicamentos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA), no período entre 1981 e 2019, demonstrou que a maioria são baseados em produtos naturais, correspondendo a um percentual de 3,8% de produtos naturais, 0,8% de produtos naturais botânicos, 18,9% de derivados de produtos naturais, 11% de fármacos sintéticos com grupo farmacóforo de um produto natural e 11,5% são totalmente sintéticos baseados em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020).

A principal justificativa para a utilização de compostos naturais se baseia na grande diversidade de organismos produtores de metabólitos secundários, apresentando as mais diversas estruturas exercendo grande importância no processo de descoberta e desenvolvimento de novas drogas (GUO, 2017).

Nesse contexto, tem os alcaloides que são metabólitos secundários de plantas (THAWABTEH et al., 2019; MONDAL et al., 2019), sendo definidos de acordo com Dewick (2009) como compostos de baixo peso molecular contendo nitrogênio em sua estrutura, e dentre eles, os alcaloides indólicos podem ser isolados de diversas fontes naturais (SINGH; SINGH, 2018; SANG et al., 2017).

Exemplos de indois comercializados atualmente e conhecidos por suas atividades incluem: a indometacina, um anti-inflamatório não esteroide (AINE) que inibe a produção de prostaglandinas (FERREIRA; MONCADA; VANE, 1971); a pravadolina, um agonista canabinoide com efeito analgésico (HAUBRICH et al., 1990); a ioimbina, usada para o tratamento da disfunção erétil (ANDERSSON, 2001), a ergotamina, importante fármaco utilizado no manejo e tratamento de enxaqueca (ONG; DE FELICE, 2018). Várias substâncias derivadas dos alcaloides, como a vincristina e vimblastina, compostos de origem natural, possuem efeito antineoplásico (DUFLOS; KRUCZYNSKI; BARRET, 2002).

### **3.7 Indol-3-carbinol**

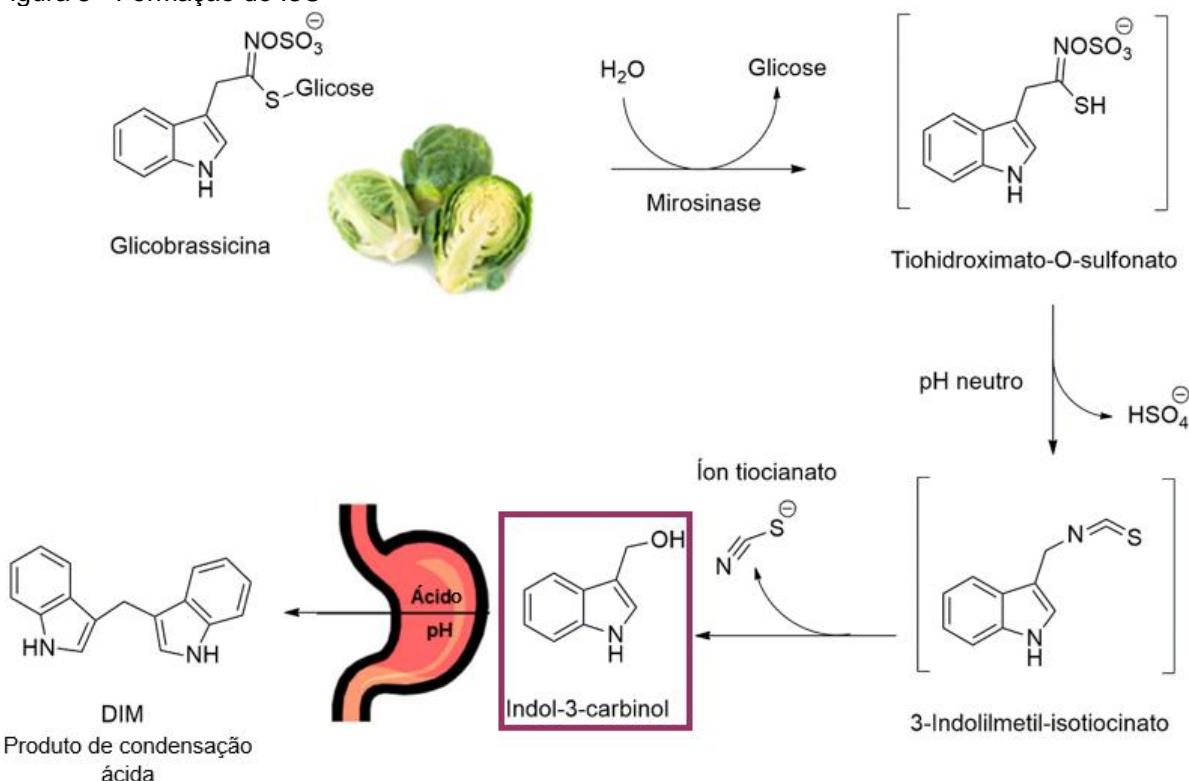
O I3C (1H-indol-3-ilmetanol), é um composto derivado de plantas, pertencente à classe dos alcaloides indólicos (YANG et al., 2014) que possui fórmula molecular C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO e peso de 147,17 g/mol. Apresenta-se em forma sólida de coloração esbranquiçada, sendo estável em 2 °C – 80 °C. Seu ponto de fusão é de 96 °C – 99 °C e apresenta solubilidade em água de 3,75 mg/mL (LICZNERSKA; BAER-DUBOWSKA, 2016).

Este composto é obtido através da hidrólise enzimática (quebra) da glicobrassicina, um glicosinolato encontrado em vegetais crucíferos da família Brassicaceae particularmente do gênero *Brassica*, tais como: couve, repolho, couve-flor, brócolis, couve-de-bruxelas, entre outros (AGGARWAL; ICHIKAWA, 2005; SINGH et al., 2021a).

A mirosinase, uma enzima que catalisa a hidrólise de glicosinolatos, é separada de glicosinolatos em células vegetais intactas (HOLST; WILLIAMSON, 2004). Quando os vegetais crucíferos crus são picados ou mastigados, as células vegetais são danificadas de tal forma que a glicobrassicina é exposta à mirosinase. A hidrólise da glicobrassicina produz inicialmente uma molécula de glicose e uma aglicona instável, tiohidroximato-O-sulfonato. A liberação espontânea de um íon sulfato resulta na

formação de outra molécula intermediária instável, 3-indolilmetyl-isotiocianato. Este composto se divide facilmente em íon tiocianato e I3C (Figura 3) (BARBA et al., 2016).

Figura 3 - Formação do I3C



A imagem mostra a clivagem da glicobrassicina em vegetais crucíferos pela ação da enzima mirosinase.

Fonte: Adaptado de WILLIAMS, 2021.

O I3C é quimicamente instável em ambientes aquosos e ácidos gástricos, como aqueles encontrados em condições de cultura de células e no ambiente ácido do estômago (WANG; JIANG, 2012). Desta forma, na exposição ao ácido gástrico, o I3C é suscetível à oligomerização não enzimática, e forma uma mistura de compostos aromáticos (SHERTZER; SENFT, 2000; HONG et al., 2002), incluindo o 3,3'-diindolilmetano (DIM), principal produto biologicamente ativo da condensação ácida do I3C *in vivo* (Figura 2) (BANERJEE et al., 2011).

Numerosos estudos em cultura de células, animais e humanos demonstraram a segurança e tolerabilidade do I3C (SAFA et al., 2015; REED et al., 2005; BRADLOW et al., 1994). Em humanos, em uma dosagem diária de 800 mg por via oral, o I3C foi considerado seguro (REED et al., 2005). Além disso, no Brasil, este fitoquímico é comercializado magistralmente sob a forma de cápsulas, em dosagens de 100 a 400 mg, para administração de 1 a 2 vezes ao dia (GEHRCKE, 2016).

Atualmente, o I3C tem sido um dos compostos mais atrativos no desenvolvimento de medicamentos entre as indústrias farmacêuticas devido às suas múltiplas atividades farmacológicas já relatadas na literatura (AKKIRAJU et al., 2021). Em relação à sua atividade antitumoral, este composto vem sendo estudado isoladamente ou em combinação com outros quimioterápicos para o tratamento de diversos tipos de câncer, como mama (TIN et al., 2014; WANG et al., 2021), cólon (LEE et al., 2021), ovário (TAYLOR-HARDING et al., 2012), próstata (BRADLOW, 2008; WU et al., 2019), pulmão (LIM; PARK; NAM, 2021), pancreático (PAIK et al., 2013), leucemia (MOHAMMADI et al., 2017) e melanoma (KUNDU et al., 2017). Além disso, o I3C também apresenta propriedade anti-fibrótica (LI et al., 2017), anti-inflamatória (HASAN et al., 2018), antioxidante (CHOI; ABDELMEGEED; SONG, 2018), antibacteriano (JULLIARD et al., 2017) e neuroprotetor (SAINI et al., 2020).

Diante do exposto, considerando as relevantes atividades já apresentadas pelo alcaloide, I3C, e aliado ao fato de que pouco se sabe sobre as suas ações farmacológicas sobre o sistema cardiovascular, torna-se imprescindível a realização de estudos com o composto para investigar os seus efeitos benéficos sobre a HAS, visto que, os resultados podem contribuir para o desenvolvimento de uma possível nova alternativa terapêutica para o tratamento desta enfermidade.

*Material*

## 4 Material

### 4.1 Animais

Para a realização do estudo foram utilizados ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e da linhagem Wistar Kyoto (WKY), como controle normotenso do SHR, ambos com 12 semanas de idade, provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM/UFPB e do biotério José Paulino, pertencente ao departamento de nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e ventilação, em um ciclo claro-escuro de 12 horas (6:00-18:00 horas) com livre acesso à água e ração balanceada (Nuvilab CR-1, Quimtia®, Colombo, PR, Brasil). Todos os experimentos, desenvolvidos neste estudo, foram submetidos à análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB e aprovados com certidão nº 056/2016 (Anexo 1), nº 4234221121 (Anexo 2) e nº 066/2017 (Anexo 3).

### 4.2 Substâncias e reagentes

Para o preparo das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl) (Química Moderna, Brasil), cloreto de cálcio di-hidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro - RJ, Brasil), fosfato de sódio monobásico mono-hidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, São Paulo - SP, Brasil), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (Anidrol, Brasil), cloreto de magnésio hexa-hidratado (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) e glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (Neon Comercial Ltda, São Paulo - SP, Brasil).

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes substâncias: cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10%, obtidos da Syntec do Brasil Ltda (Santana de Parnaíba - SP, Brasil). Heparina sódica suína (Hepamax-s®) obtida da Blau Farmacêutica S.A. (Cotia - SP, Brasil). Nitroprussiato de sódio (NPS), I3C, cremofor®, cloridrato de L (-) fenilefrina (FEN), cloridrato de acetilcolina (ACh), ácido 3-piridinocarboxílico 1,4-dihidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]- metil ester (S(-)-Bay K 8644), todos obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São

Paulo - SP, Brasil). A mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) foi adquirida da White Martins Gases Industriais do Nordeste S/A, Pernambuco, Brasil.

Todas as substâncias foram solubilizadas e diluídas em água destilada, exceto o S(-)-Bay K 8644 que foi dissolvido em etanol absoluto para obtenção da solução estoque.

#### **4.3 Obtenção e preparação do I3C**

O I3C foi adquirido da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo – SP, Brasil) (número de catálogo Cat # I7256). Para a preparação da solução mãe, antes de cada experimento, o I3C, foi solubilizado em cremofor® e diluído em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) (experimentos *in vivo*) ou água destilada (experimentos *in vitro*). Em seguida, a solução mãe foi diluída em água destilada para a obtenção das demais concentrações e doses utilizadas em cada protocolo experimental. As concentrações de cremofor® em solução nunca excederam 0,03%, e este solubilizante foi testado e comprovada a ausência de efeito biológico.

#### **4.4 Soluções nutritivas**

As soluções fisiológicas utilizadas para a realização dos experimentos tiveram o pH ajustado para 7,4 e foram mantidas a 37 °C. Nos quadros a seguir estão discriminadas as suas composições.

Quadro 1 - Composição da solução de Tyrode.

<b>Substância</b>	<b>Concentração (mM)</b>
NaCl	158,3
KCl	4,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5,6

Fonte: TANAKA et al., 1999.

Quadro 2 - Composição da solução de Tyrode nominalmente sem cálcio.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	158,3
KCl	4,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

Nas soluções de Tyrode com 20 mM e 60 mM de KCl, foi realizado uma substituição equimolar do Na<sup>+</sup> pelo K<sup>+</sup>, ajustando isosmoticamente as soluções de acordo com os quadros abaixo (Quadro 3 e 4, respectivamente):

Quadro 3 - Composição da solução despolarizante de Tyrode com KCl à 20 mM.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	142,3
KCl	20,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

Quadro 4 - Composição da solução despolarizante com KCl à 60 mM.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

Quadro 5 - Composição da solução despolarizante com KCl 60 mM nominalmente sem cálcio.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	102,3
KCl	60,0
MgCl <sub>2</sub>	1,05
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5,6

Fonte: Adaptado de TANAKA et al., 1999.

## 4.5 Equipamentos

A pesagem dos sais e das substâncias foram realizadas em balança de precisão analítica (Discovery DV214C, OHAUS®) e os animais em balança digital de alta precisão eletrônica (SF-400, Eletronic Kitchen scale). Todos os valores de pH foram verificados através de um pHmetro digital de bancada (pH 21, Hanna Instruments).

Nos protocolos *in vivo*, para a avaliação da PA e da FC, foi utilizado um transdutor de pressão pré-calibrado (MLT0380/D, ADInstruments, Austrália), o qual foi acoplado a um amplificador (FE221, ADInstruments, Austrália) que foi conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab 4/35 PL3504, ADInstruments, Austrália) por um computador onde foi instalado o software LabChart® (versão 8.1; ADInstruments, Colorado Springs, CO) para análise dos parâmetros cardiovasculares.

Nos protocolos *in vitro*, para os registros de tensão isométrica, foi utilizado o sistema de banho para órgãos isolados (ML0146/10, Panlab, ADInstruments, Austrália). Os órgãos foram suspensos através de linhas de algodão fixadas a transdutores de força isométrica (MLT0201, Panlab, ADInstruments, Austrália), acoplados a um amplificador de sinal (ML224, ADInstruments, Austrália). Este, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab 8/30 ML870, ADInstruments, Austrália) por meio de um computador contendo o software LabChart® (versão 8.1; ADInstruments, Colorado Springs, CO) para análise destes. A temperatura das cubas foi controlada em 37 °C através de um termostato acoplado ao próprio sistema (LE 13206, Panlab, ADInstruments, Austrália).

Nos ensaios *in silico*, os experimentos de *docking* molecular e cálculos semi-empíricos (minimização das energias das moléculas) foram realizados em um computador com processador Intel® Core™ i3-6100 CPU 3,70GHz (4 CPUs), memória RAM de 4096 MB, sob o sistema operacional Windows 10 Pro for Workstations 64 bits. Os demais experimentos, das simulações de dinâmica molecular, foram realizados em um computador com processador Intel® Core™ i5-8400 CPU 2,80GHz (6 CPUs), memória RAM de 8192 MB e sistema operacional Windows 10 Pro 64 bits.

*Métodos*

## 5 Métodos

### 5.1 Ensaios farmacológicos para estudos *in vivo*

#### 5.1.1 Medida direta da PA e da FC de ratos não anestesiados

A PA e a FC foram registradas utilizando a técnica descrita anteriormente por Assis e colaboradores (2018). Resumidamente, os ratos foram anestesiados através da associação de um anestésico dissociativo (cetamina) e um agonista de adrenorreceptores alfa-2 (xilazina) (75 e 10 mg/kg, respectivamente) por via intraperitoneal (i.p.). Em seguida, foram colocados em decúbito dorsal para a realização de um procedimento cirúrgico, para isso, inicialmente, foram confeccionados cateteres de polietileno (PE), sendo um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 – 0,61 mm, respectivamente) de 4 cm para o cateter arterial; e 3,5 cm para o cateter venoso, soldados a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 – 0,96 mm, respectivamente) de 22 cm. Um cateter foi implantado na aorta abdominal inferior por meio da veia femoral esquerda com o intuito de registrar a PA e o outro cateter foi implantado na veia cava inferior através da veia femoral esquerda para a administração das substâncias. Depois da implantação, os cateteres foram preenchidos com solução salina heparinizada (NaCl 0,9%; heparina sódica suína 500 UI), tunelizados subcutaneamente e exteriorizados por meio de uma incisão na região dorsal do animal. Para os animais tratados com I3C, o cateter foi implantado apenas na artéria femoral. Os animais foram mantidos por 24 horas em gaiolas individuais recebendo água e ração para a recuperação do procedimento cirúrgico.

Após 24 horas, os animais foram aclimatados por um período de, no mínimo, 30 minutos, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Em seguida, realizou-se os registros da pressão arterial pulsátil (PAP), PAM, PAS, PAD e FC nos animais acordados e com livre movimentação, uma vez que os anestésicos podem induzir alterações nos níveis da PA, bem como no envolvimento dos principais sistemas vasoativos na manutenção da PA, como: SRAA, sistema nervoso simpático (SNS) e síntese de NO (BENCZE; BEHULIAK; ZICHA, 2013).

Estes parâmetros foram aferidos pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão pré-calibrado, sensível ao sinal pulsátil da artéria, acoplado a um sistema de aquisição dos dados.

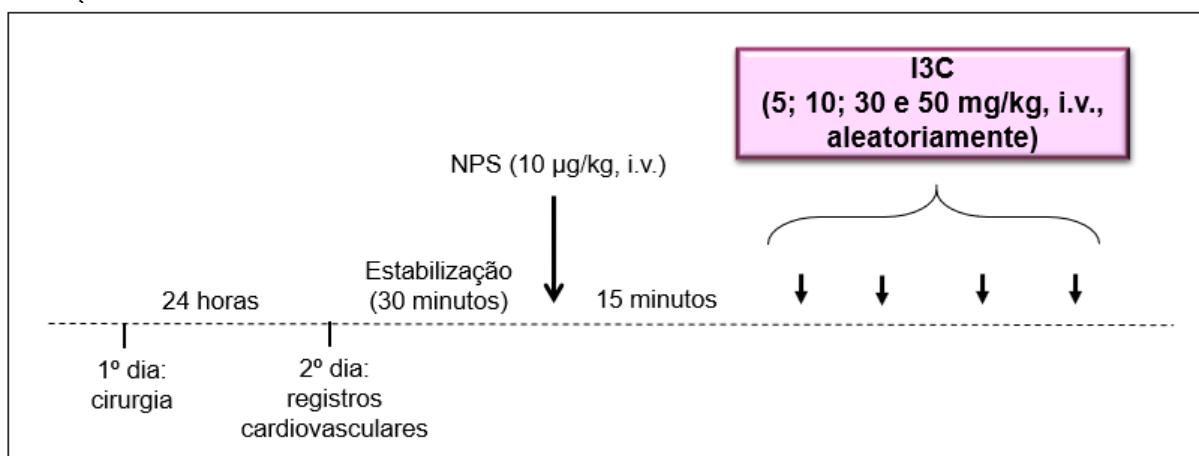
### 5.1.2 Estudo dos efeitos hemodinâmicos em ratos normotensos

Após o período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares de 30 minutos, administrou-se nitroprussiato de sódio (NPS) (10 µg/kg), um clássico doador de NO, por via intravenosa (i.v.), para verificar a eficácia da implantação do cateter venoso. Após o retorno dos parâmetros hemodinâmicos, diferentes doses de I3C (5, 10, 30 e 50 mg/kg, i.v.) foram administradas de forma randomizada (Figura 4). As injeções foram separadas por um intervalo de tempo suficiente, usualmente de 15 a 20 minutos, para a recuperação dos parâmetros cardiovasculares. Os valores da PAM e da FC foram expressos em porcentagem, computados antes (valores da linha de base) e após a administração do I3C, calculadas através das fórmulas abaixo (equação 1 e 2):

$$\text{Valores de PAM (\%)} = \frac{(\text{PAM após} - \text{PAM antes}) \times 100}{\text{PAM antes}} \quad (1)$$

$$\text{Valores de FC (\%)} = \frac{(\text{FC após} - \text{FC antes}) \times 100}{\text{FC antes}} \quad (2)$$

Figura 4 - Representação esquemática do protocolo experimental de administração aguda do I3C para avaliação dos efeitos sobre a PAM e FC em ratos Wistar não anestesiados.



Fonte: Autor, 2022.

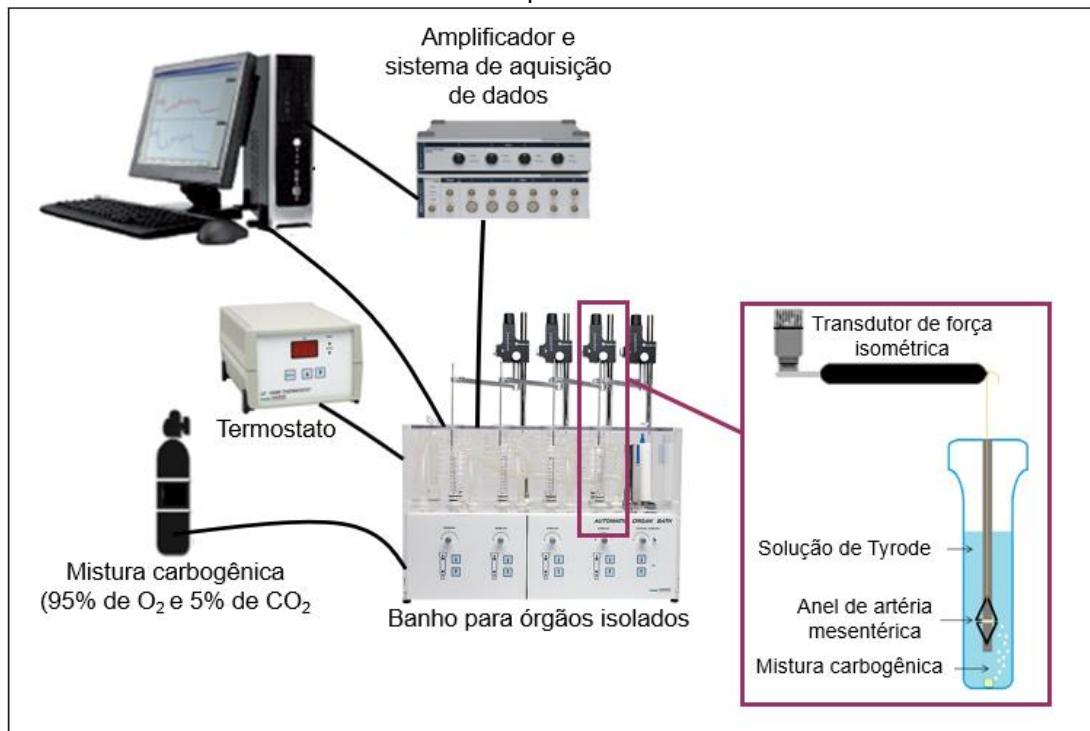
## 5.2 Ensaios farmacológicos para estudos *in vitro*

### 5.2.1 Preparação dos anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Para a realização dos experimentos, os animais foram previamente eutanasiados com sobredosagem de anestesia da associação de cetamina com xilazina, por via i.p. Após este procedimento, o animal foi colocado em decúbito dorsal e realizado uma incisão na região abdominal para expor os órgãos abdominais. A artéria mesentérica superior foi identificada, cuidadosamente removida, colocada em uma solução fisiológica de Tyrode (Quadro 1), dissecada de tecido conjuntivo e adiposo e seccionada em anéis (1 - 2 mm).

Os segmentos arteriais foram suspensos verticalmente por linhas de algodão em cubas de vidro de um sistema de banho para órgãos isolados (Figura 5) contendo 10 mL de solução de Tyrode (Quadro 1) (TANAKA et al., 1999), a 37 °C e gaseificados com uma mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) para manter o pH constante entre 7,2 – 7,4 (TEIXEIRA; PRIVIERO; WEBB, 2006). Os anéis de artéria mesentérica foram submetidos a uma tensão de repouso ideal de 0,75 g por um período de estabilização de 60 minutos, no qual a solução do banho foi trocada a cada 15 minutos com a finalidade de prevenir a interferência de metabólitos indesejáveis e a linha de base foi ajustada sempre quando necessário (ALTURA; ALTURA, 1970; MACHADO et al., 2014).

Figura 5 - Representação esquemática do sistema de banho para órgãos isolados utilizado nos experimentos *in vitro* com artéria mesentérica superior



Fonte: Adaptado de MACHADO-CALZERRA, 2017.

### 5.2.2 Protocolos experimentais utilizando anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos

Após o período de estabilização, os anéis de artéria mesentérica superior foram utilizados em protocolos para os estudos de reatividade vascular. Para isso, em todos os procedimentos experimentais, os segmentos arteriais foram pré-contraídos com fenilefrina (FEN, 10 µM), um agonista dos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, para verificar a viabilidade funcional do tecido (BÜSCHER et al., 1999). No componente tônico desta contração, foi adicionado acetilcolina (ACh, 10 µM), um agonista não seletivo dos receptores muscarínicos ( $M_3$ ), para avaliar a integridade do endotélio vascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). O cálculo de relaxamento foi realizado através da fórmula abaixo (equação 3):

$$\text{Relaxamento (\%)} = \frac{\text{ACh} - \text{Est}}{\text{FEN} - \text{Est}} \times 100 - 100 \quad (3)$$

Onde:

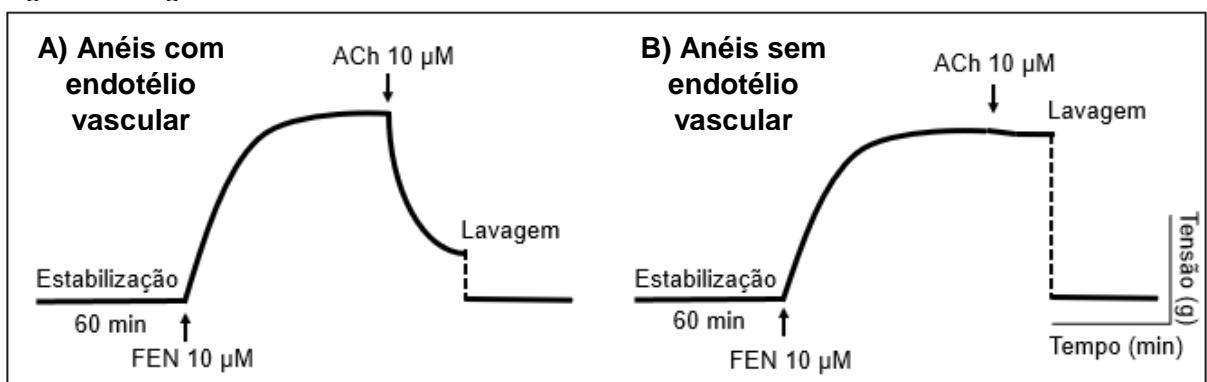
ACh: valor da tensão posterior a adição da ACh 10  $\mu\text{M}$

FEN: valor da tensão posterior a adição da FEN 10  $\mu\text{M}$

Est: valor da tensão da estabilização inicial

Os anéis com 90% ou mais de relaxamento, em resposta a ACh, foram considerados com endotélio funcional (Figura 6A), já nos tecidos com relaxamento inferior a 10% foram considerados sem endotélio funcional (Figura 6B) (ASSIS et al., 2018). Quando necessário, o endotélio foi removido esfregando suavemente a superfície íntima dos vasos com o auxílio de uma haste de aço (COX et al., 1989). Após isso, o meio nutritivo (Tyrode) foi trocado sucessivas vezes até o retorno do valor de tensão basal inicial (0,75 g), para retirar todas as drogas utilizadas e metabólitos, e em seguida foram realizados os experimentos.

Figura 6 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da viabilidade do órgão e a integridade do endotélio funcional.



A) Presença do endotélio e B) Ausência do endotélio vascular.

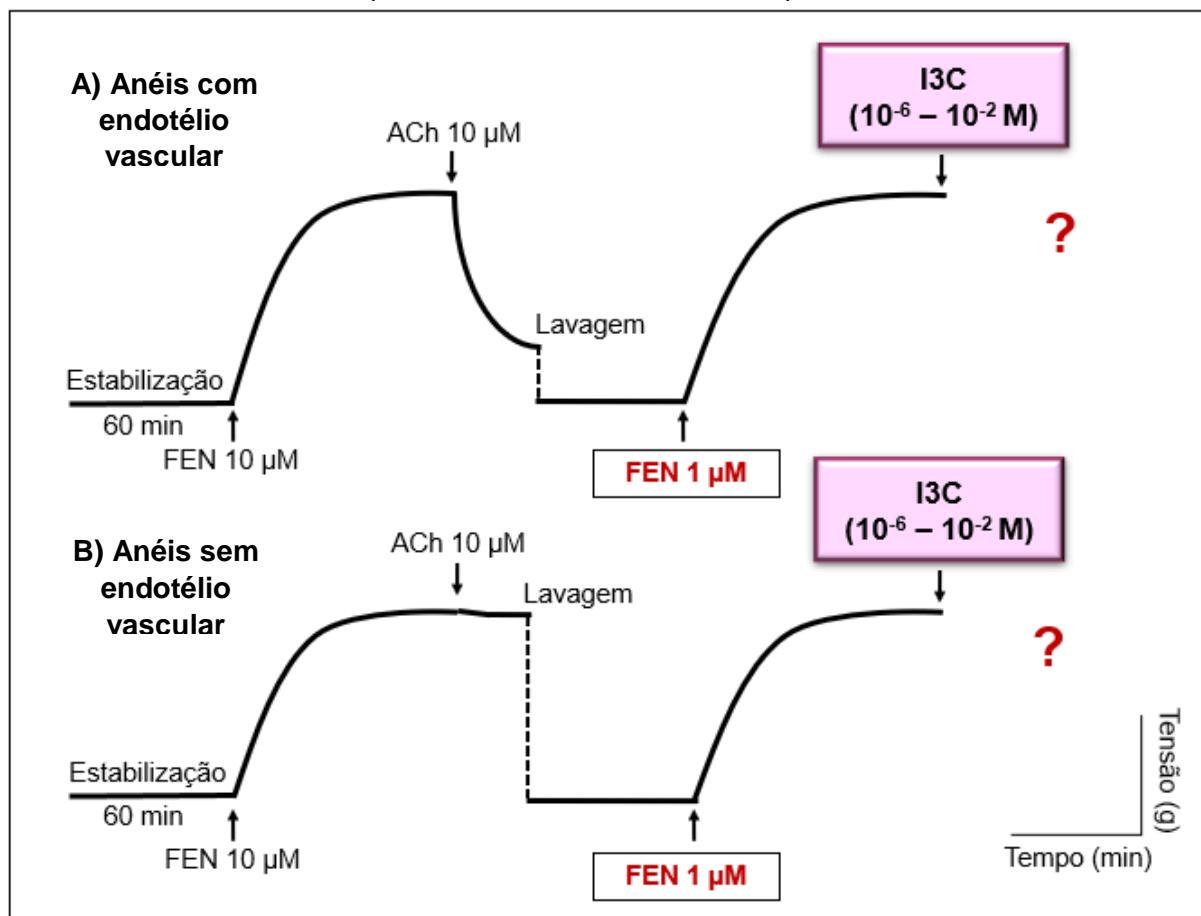
Fonte: Autor, 2022.

### 5.2.2.1 Avaliação do efeito do I3C em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos pré-contraídos com FEN

Com a finalidade de avaliar o efeito relaxante do I3C, inicialmente verificou-se a viabilidade do órgão e a presença ou ausência do endotélio vascular, como descrito anteriormente (item 5.2.2). Posteriormente, as preparações foram lavadas com solução nutritiva de Tyrode (Quadro 1) até atingirem o tônus basal por um período de estabilização de aproximadamente 30 minutos.

Em seguida, os anéis arteriais foram pré-contraídos com FEN (1  $\mu\text{M}$ ) e, no componente tônico desta contração, curvas de concentração-resposta para o I3C ( $10^{-6}$  M –  $10^{-2}$  M) foram obtidas pela adição de concentrações crescentes e cumulativas deste composto. O efeito relaxante do I3C foi avaliado em anéis com o endotélio funcional intacto (Figura 7A) e com endotélio removido (Figura 7B). A resposta foi expressa como porcentagem de relaxamento em relação à contração induzida pela FEN. A potência e eficácia do vasorrelaxamento foram avaliadas por meio dos valores de  $\text{CE}_{50}$  (concentração de uma substância responsável por 50% do efeito máximo) e o  $E_{\text{máx}}$  (efeito máximo), respectivamente.

Figura 7 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do I3C, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotensão, pré-contraídos com FEN.



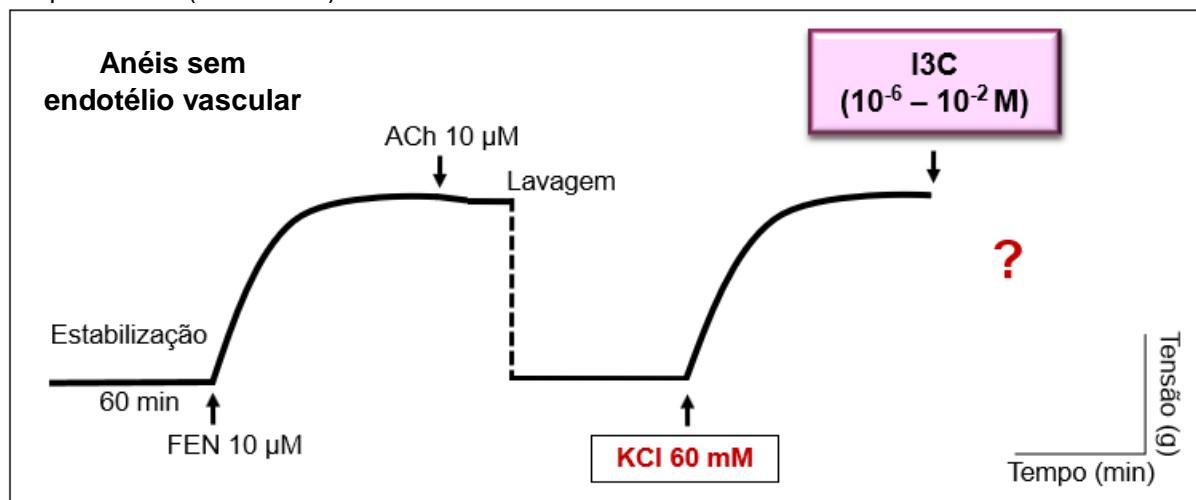
A) Anéis com endotélio vascular intacto e B) Anéis sem endotélio.  
Fonte: Autor, 2022.

### 5.2.2.2 Avaliação do efeito do I3C em anéis mesentéricos de ratos normotensos pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 60 mM)

Para investigar a resposta do I3C sobre a contração induzida por um agente despolarizante, cujo mecanismo de ação difere do induzido por FEN, utilizou-se uma solução com 60 mM de KCl (Quadro 4). Neste protocolo, foi utilizado o meio nutritivo de Tyrode modificado com uma elevada concentração de potássio (KCl 60 mM) que promove uma despolarização da membrana plasmática, levando à ativação dos canais  $\text{Ca}_v$ , resultando no influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da célula e, consequentemente, na contração do músculo liso vascular (CHEN; REMBOLD, 1995; OLIVEIRA et al., 2006).

Após a estabilização e verificação da ausência do endotélio (item 5.2.2), a solução de Tyrode foi substituída por uma solução de Tyrode com KCl 60 mM. Uma vez que o platô desta contração foi atingido e estabilizado, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do I3C ( $10^{-6}$  M –  $10^{-2}$  M), para obtenção de uma curva concentração-resposta (Figura 8). A resposta vasorrelaxante foi comparada com a obtida na presença de FEN e a potência e a eficácia do vasorrelaxamento foram avaliadas por meio dos valores de  $\text{CE}_{50}$  e  $E_{\text{máx}}$ , respectivamente.

Figura 8 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do I3C, em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato normotenso, pré-contraídos com solução despolarizante (KCl 60 mM).



Fonte: Autor, 2022.

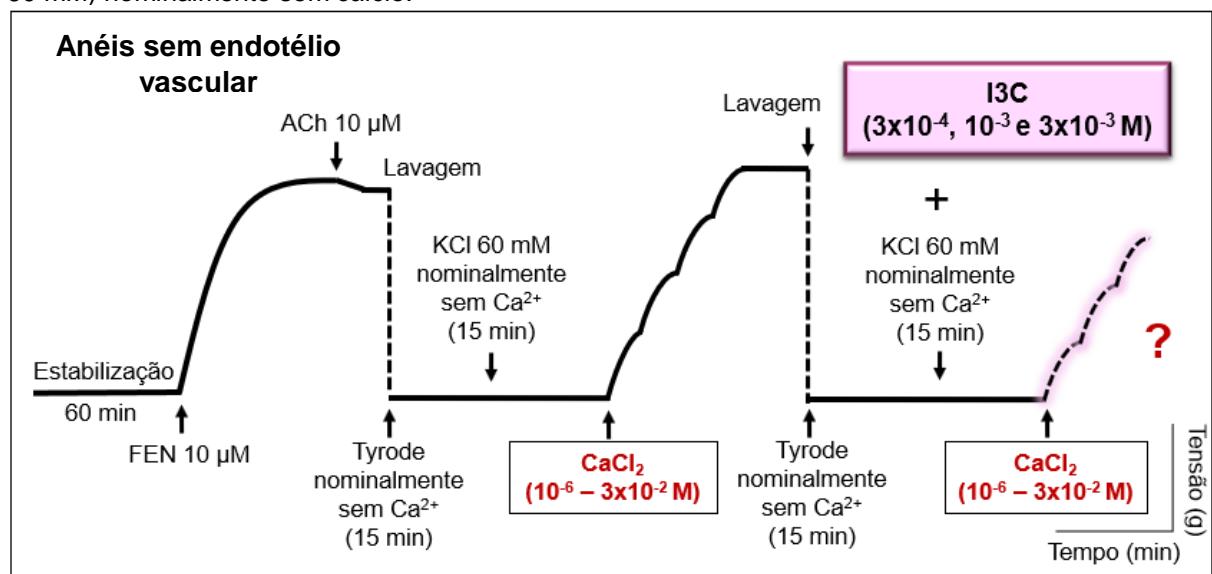
### 5.2.2.3 Avaliação do efeito do I3C sobre as contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> em anéis mesentéricos de ratos normotensos

Para investigar a participação do influxo de Ca<sup>2+</sup> através dos canais Ca<sub>V</sub> no relaxamento induzido por I3C, curvas de concentração-resposta de CaCl<sub>2</sub> foram geradas em anéis sem endotélio vascular de acordo com o método descrito por Moraes et al. (2020), com modificações.

Após a confirmação da ausência do endotélio vascular (item 5.2.2), as preparações foram lavadas com solução de Tyrode nominalmente sem Ca<sup>2+</sup> (Quadro 2) e mantidas neste meio por 15 minutos. Após esse período, os anéis foram expostos a uma solução de KCl 60 mM nominalmente sem Ca<sup>2+</sup> (Quadro 5) por 15 minutos e, em seguida, obteve-se uma curva concentração-resposta pela adição cumulativa de CaCl<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  M –  $3 \times 10^{-2}$  M) (curva controle).

O processo foi novamente repetido, após a incubação de concentrações isoladas do I3C (300 µM, 1 mM e 3 mM), juntamente com a solução de KCl 60 mM nominalmente sem Ca<sup>2+</sup> (15 minutos) e uma nova curva concentração-resposta ao CaCl<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  M –  $3 \times 10^{-2}$  M) foi obtida (Figura 9). Os efeitos do I3C sobre as contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> foram avaliados comparando-se as curvas de CaCl<sub>2</sub> na ausência (controle) e na presença do composto.

Figura 9 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do I3C sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de CaCl<sub>2</sub> em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem cálcio.



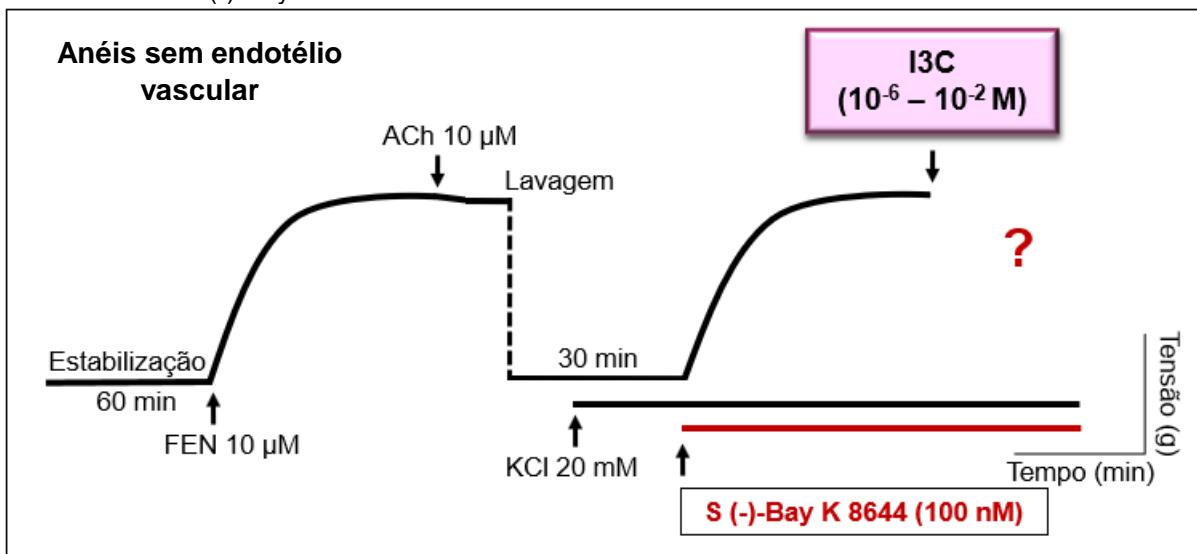
Fonte: Autor, 2022.

#### 5.2.2.4 Avaliação do efeito do I3C sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644 em anéis de artéria mesentérica isolada de rato normoteno

Com o intuito de avaliar o efeito do I3C sobre o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$  em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos sem o endotélio funcional, foi utilizado um ativador do canal  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$ , o S(-)-Bay K 8644 (MAROM et al., 2010). Devido uma despolarização parcial ser necessária para obtenção da resposta ao S(-)-Bay K 8644, a resposta contrátil a esse agonista foi obtida em meio com solução despolarizante de KCl 20 mM (Quadro 3) (SCHRAMM et al., 1983; DAVIE; KUBO; STANDEN, 1998).

Após a confirmação da ausência do endotélio (item 5.2.2), os vasos foram pré-expostos a uma solução despolarizante de Tyrode com KCl 20 mM, durante um período de 30 minutos, e posteriormente contraídos com S(-)-Bay K 8644 (100 nM). Após a contração atingir uma estabilização, adicionou-se à cuba, de maneira cumulativa, concentrações crescentes do I3C ( $10^{-6}$  M –  $10^{-2}$  M) para obter uma curva de concentração-resposta (Figura 10).

Figura 10 - Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito induzido pelo I3C em anéis de artéria mesentérica de ratos normotensos, sem o endotélio funcional, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644.



Fonte: Autor, 2022.

### 5.3 Ensaios para estudos *in silico*

#### 5.3.1 Simulações de *docking* molecular

Os estudos de *docking* molecular foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti, coordenador do laboratório de quimioinformática do PPgPNSB/CCS/UFPB.

O *docking* molecular é um dos métodos computacionais mais aplicados na triagem virtual, cujo principal objetivo é prever a afinidade de ligação entre um receptor e um ligante, obtendo a conformação mais estável (WANG; ZHU, 2016). Desta forma, as simulações de *docking* molecular realizada neste estudo teve como objetivo investigar o mecanismo de ação do efeito hipotensor e vasodilatador do I3C através da sua afinidade de ligação ao alvo molecular domínio regulador C-terminal do canal Ca<sub>v</sub>1.2. As etapas foram efetuadas a partir da preparação da estrutura tridimensional (3D) da proteína-alvo, na preparação dos ligantes, na estimativa da energia de ligação do complexo proteína-ligante e na análise dos resultados (TRIPATHI; MISRA, 2017).

##### 5.3.1.1 Avaliação da interação entre os ligantes e o alvo molecular

A estrutura tridimensional da proteína alvo (canal Ca<sub>v</sub>1.2), determinada por difração de raios-X, foi obtida através do banco de dados de proteínas online (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) (BERMAN et al., 2000), registrada sob o código PDB ID 3G43. A estrutura tem uma profundidade de resolução de 2,10 Å, contém 148 aminoácidos e como ligante o íon Ca<sup>+2</sup>.

O nifedipino, um BCC, com potentes propriedades vasodilatadoras e anti-hipertensivas (SETO et al., 2022), foi utilizado no estudo como controle positivo na simulação realizada para comparar os resultados de encaixe molecular com o I3C e a avaliação da afinidade. A descrição da proteína utilizada no estudo encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição da proteína selecionada no estudo

Proteína	PDB ID	Resolução	Controle positivo	Referência
Canal Ca <sub>v</sub> 1.2	3G43	2.10 Å	 Nifedipino	FALLON et al., 2009

Fonte: Autor, 2022.

Na etapa de preparação, os ligantes, tanto o controle positivo (nifedipino) como o composto teste (I3C) foram desenhados no programa *MarvinSketch* versão 19.9 (ChemAxon, Hungary) (<https://chemaxon.com/products/marvin>), sendo obtida a estrutura 2D que foi salva no formato .sdf. Em seguida, as estruturas foram minimizadas, pelo método da mecânica molecular, utilizando o programa *Spartan' 14 V1.1.4 for Windows* (Wavefunction, Inc., Irvine, CA, USA) ([https://store.wavefun.com/Spartan\\_Software\\_s/12.htm](https://store.wavefun.com/Spartan_Software_s/12.htm)) (HEHRE; OHLINGER, 2014; YOUNG, 2001). Após a inserção neste programa, as moléculas foram imediatamente convertidas em 3D e foi obtida a conformação mais estável. Os arquivos foram salvos no formato *Spartan document*. Após a preparação dos compostos, foi realizado o *docking* molecular, com a inserção dos ligantes e do alvo molecular no programa *Molegro Virtual Docker* (MVD) versão 6.0.1 (BITENCOURT-FERREIRA; AZEVEDO, 2019).

O programa MVD foi utilizado com os parâmetros predefinidos no mesmo software. Os compostos foram importados, para analisar a estabilidade do sistema através das interações identificadas com o sítio ativo da enzima, tomando como referência o valor energético do MolDock Score (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). O algoritmo MolDock SE (Simplex Evolution) foi usado com os seguintes parâmetros: Um total de 10 execuções com um máximo de 1.500 interações usando uma população de 50 indivíduos, 2.000 etapas de minimização para cada resíduo flexível e 2.000 etapas de minimização global por simulação. As funções de pontuação MolDock Score (GRID) e PLANTS Score (GRID) foram usadas para calcular os

valores de energia de encaixe. Um GRID foi fixado em 0,3 Å e a esfera de busca foi fixada em 15 Å de raio.

As análises de *docking* molecular foram realizadas de acordo com as seguintes etapas:

- A proteína foi inserida como dado de entrada no programa MVD, onde todas as moléculas de água foram eliminadas da estrutura da enzima, deixando-se apenas a proteína e o cofator Ca<sup>2+</sup>;

- A estrutura da proteína foi preparada reparando resíduos de aminoácidos com erros estruturais. No caso da proteína em estudo, esta não apresentou erros, então a função reparar foi utilizada apenas para consulta;

- Em seguida, foi demarcado o sítio ativo da macromolécula com a função detectar cavidades, sendo selecionada a cavidade 1 para a realização da simulação.

- O I3C e nifedipino, com suas estruturas minimizadas pelo método da mecânica molecular, foram inseridos como dados de entrada no programa MVD;

- Posteriormente a inserção dos compostos, estes foram submetidos a simulação de *docking* molecular através da função *docking wizard*;

- Após o término da análise foram observados os valores de energia para cada pose dos algoritmos MolDock Score e PLANTS Score. Além disso, avaliou-se os tipos de interações existentes (ligações de hidrogênio internas, interações eletrostáticas internas e torções sp<sup>2</sup>-sp<sup>2</sup>) entre o receptor e os compostos.

### **5.3.1.2 Interações do acoplamento molecular e obtenção das figuras**

Para a visualização das interações e obtenção das figuras de acoplamento molecular foram utilizados os programas discovery studio visualizer v20.1.0.19295 (BIOVIA, 2020) (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>) e UCSF Chimera X 1.4 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>) (PETTERSEN et al., 2004; PETTERSEN et al., 2021).

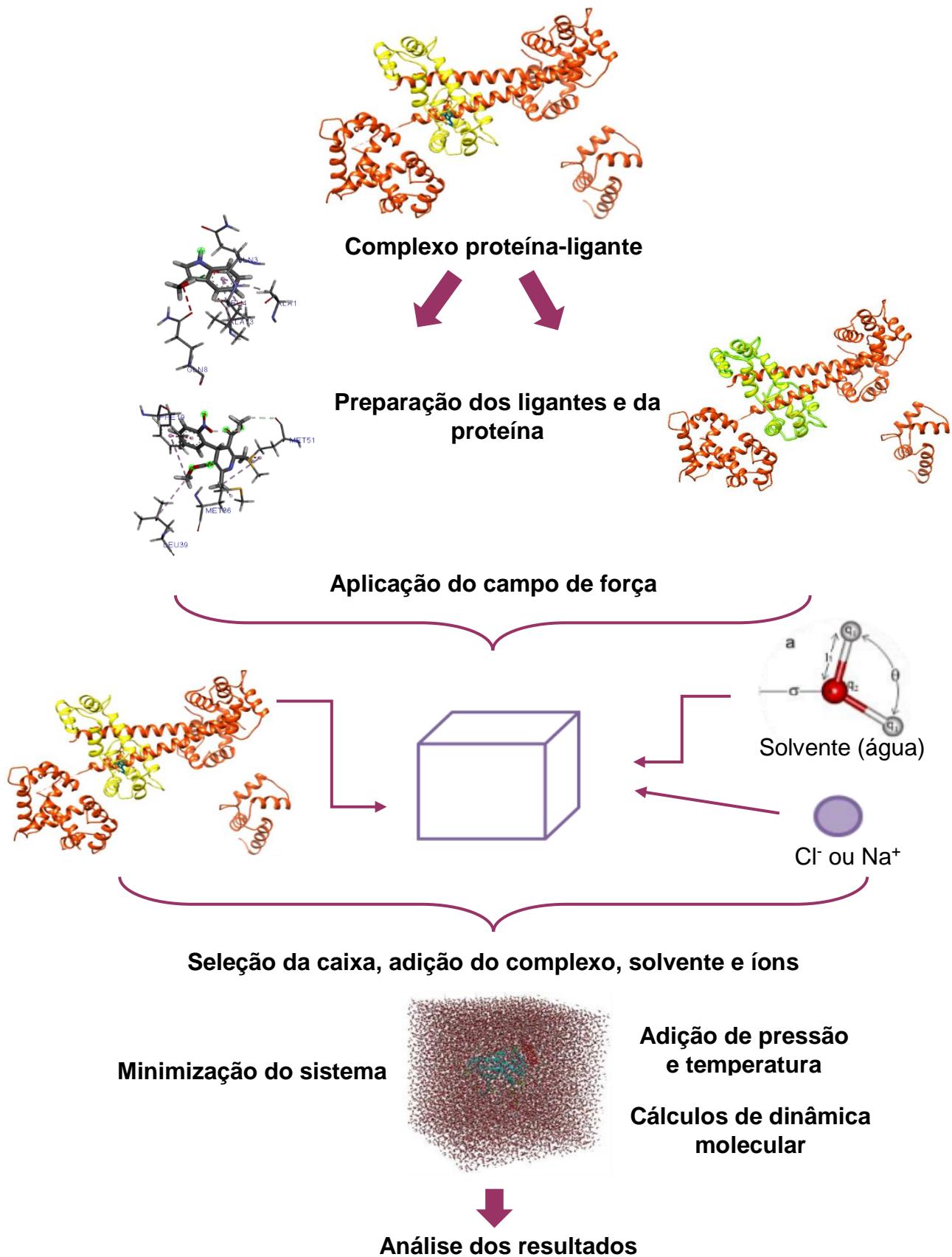
### **5.3.2 Simulações de dinâmica molecular**

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas, para estimar a flexibilidade das interações entre a proteína e os ligantes, usando o software

GROMACS 5.0 (Programa Horizon 2020 da União Europeia, Suécia) (BERENDSEN; VAN DER SPOEL; VAN DRUNEN, 1995; ABRAHAM et al., 2015).

As topologias da proteína e dos ligantes foram preparadas usando o campo de força GROMOS96 54a7. A simulação de dinâmica molecular foi realizada utilizando o modelo de água de carga pontual simples (SPC), estendido em uma caixa cúbica (BONDI, 1964). O sistema foi neutralizado pela adição de íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e sódio ( $\text{Na}^+$ ) e minimizado, para remover maus contatos entre moléculas complexas e o solvente. O sistema também foi balanceado a 300K, usando o algoritmo V-rescale de 100 ps, representado por NVT (número constante de partículas, volume e temperatura), seguido de equilíbrio a 1 atm de pressão, usando o algoritmo de Parrinello-Rahman como o NPT (partículas de pressão e temperatura constantes), até 100 ps (Figura 11). As simulações de DM foram realizadas em 5.000.000 passos, a 10 ns. Para determinar a flexibilidade da estrutura e se o complexo é estável próximo à estrutura experimental, os valores da raiz do desvio quadrático médio (RMSD) de todos os átomos de Ca foram calculados em relação às estruturas iniciais. Os valores da raiz da flutuação quadrática média (RMSF) também foram analisados, para entender os papéis desempenhados pelos resíduos próximos ao sítio de ligação do receptor. Os gráficos RMSD e RMSF foram gerados no software Grace (Grace Development Team, <http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>) e a proteína e os ligantes foram visualizados no UCSF Chimera X 1.4 (PETTERSEN et al., 2004; PETTERSEN et al., 2021).

Figura 11 - Etapas da simulação de dinâmica molecular

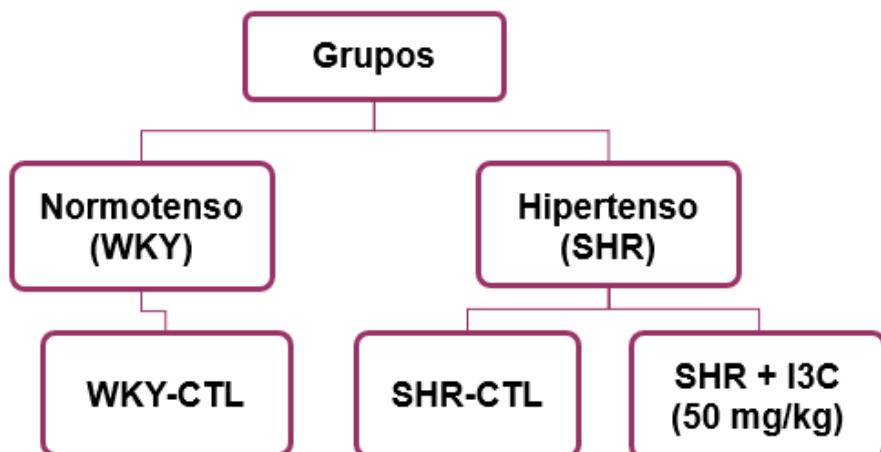


Fonte: Autor, 2022.

## 5.4 Ensaios farmacológicos para estudos *in vivo* após o tratamento com o I3C em ratos hipertensos

Para o desenvolvimento do estudo, os animais foram distribuídos em três grupos experimentais: (1) normotenso controle (WKY-CTL) tratado com veículo (solução salina (NaCl 0,9%) e cremofor) ( $n = 6$ ); (2) hipertenso controle (SHR-CTL) tratado com veículo ( $n = 5$ ) e (3) hipertenso tratado com I3C na dose de 50 mg/kg/dia (SHR-I3C 50 mg/kg) ( $n = 6$ ) como mostrado na Figura 12.

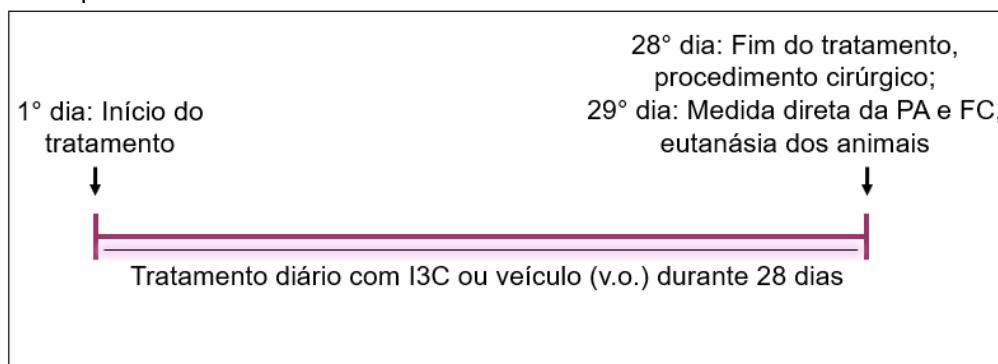
Figura 12 - Grupos de animais utilizados para a investigação do efeito do tratamento com o I3C



Fonte: Autor, 2022.

O I3C e o veículo foram administrados por via oral (v.o.), diariamente, durante um período de 28 dias, com o auxílio de agulhas de aço inoxidável para gavagem e seringas descartáveis, utilizando um volume padronizado de 5 mL/kg de peso corporal do animal (MACHHOLZ et al., 2012) (Figura 13). O I3C utilizado durante o tratamento foi preparado momento antes da administração nos animais.

Figura 13 - Esquema do tratamento com o I3C



Fonte: Autor, 2022.

#### **5.4.1 Estudo dos efeitos hemodinâmicos em ratos hipertensos**

Ao final do período de tratamento, os animais passaram por um procedimento cirúrgico para implantação do cateter arterial, conforme descrito no item 5.1.1, em que após 24 horas foram realizados os registros hemodinâmicos (PAM, PAS, PAD e FC) dos animais SHR.

#### **5.5 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). Para as comparações estatísticas entre duas variáveis utilizou-se o teste t de *Student* não pareado, já para as análises de mais de duas variáveis foi utilizado a análise de variância (ANOVA) “one way”, seguida do pós-teste de Tukey ou Dunnett. Valores de “p” menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos.

Nas curvas de concentração-resposta, três parâmetros farmacológicos foram analisados: o  $E_{máx}$  (efeito máximo em porcentagem de relaxamento e de contração), a  $CE_{50}$  (concentração de uma substância responsável por 50% do  $E_{máx}$ ) e o  $pD_2$  (logaritmo negativo da  $CE_{50}$ ), os quais foram calculados a partir da regressão não linear das respostas obtidas.

Todas as análises estatísticas e as plotagens dos gráficos foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism®, versão 8.1 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

# *Resultados*

## 6 Resultados

### 6.1 Efeito induzido pelo I3C sobre a PAM e a FC em ratos normotensos não anestesiados

Os efeitos do I3C sobre os parâmetros cardiovasculares foram estudados em ratos Wistar não anestesiados. O Gráfico 1A e 1B mostra o efeito da administração *in bolus* do I3C sobre a PAM e a FC, respectivamente. A administração sistêmica do I3C (5, 10, 30 e 50 mg/kg, i.v., aleatoriamente) induziu hipotensão ( $-6,6 \pm 1,57$ ;  $-10,71 \pm 2,82$ ;  $-18,24 \pm 1,76$ ;  $-25,03 \pm 2,66$  mmHg;  $n = 5$ , respectivamente) de maneira dependente de dose, associada à bradicardia ( $-5,08 \pm 1,49$ ;  $-5,28 \pm 1,97$ ;  $-8,3 \pm 4,35$ ;  $-60,14 \pm 6,52$  bpm;  $n = 5$ , respectivamente).

Gráfico 1 - Efeito do I3C sobre a PAM e FC em ratos normotensos não anestesiados.

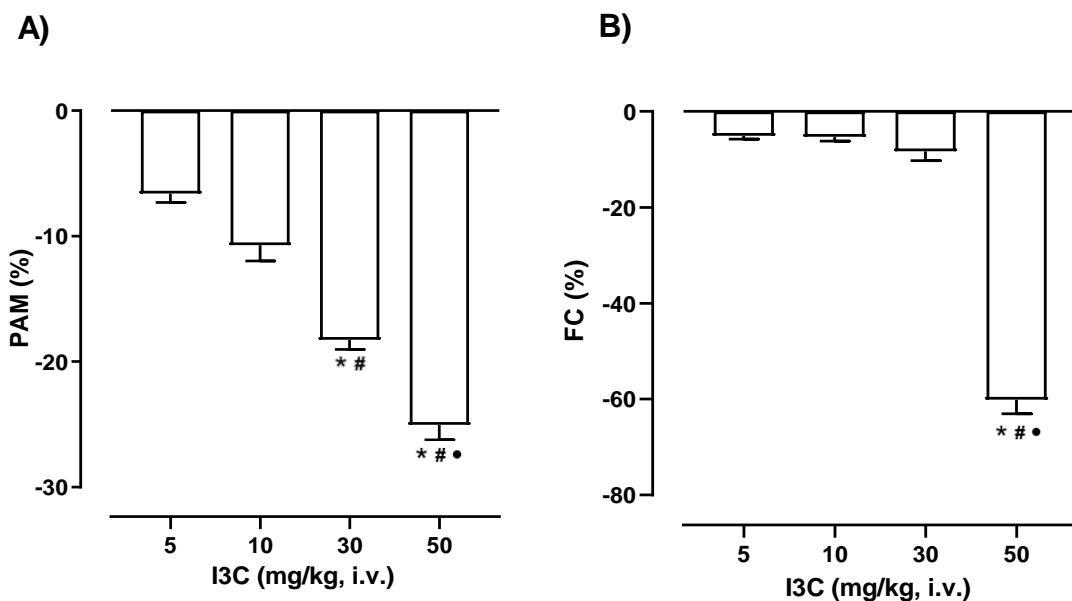


Gráfico de barras mostrando as alterações na PAM (A) e FC (B) induzidas pela administração aguda do I3C (5, 10, 30 e 50 mg/kg, i.v., aleatoriamente) em ratos Wistar não anestesiados. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m ( $n = 5$ ). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one-way seguido do pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$  (vs. 5 mg/kg), # $p < 0,05$  (vs. 10 mg/kg), • $p < 0,05$  (vs. 30 mg/kg).

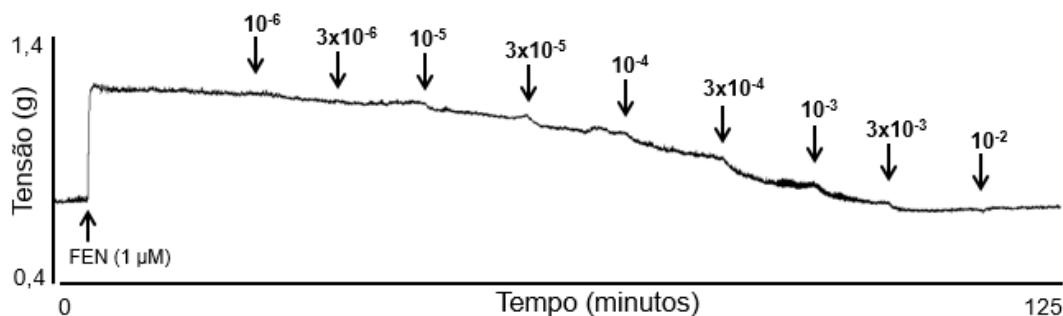
Fonte: Autor, 2022.

## 6.2 Efeito relaxante do I3C em artéria mesentérica de ratos, pré-contraídos com FEN

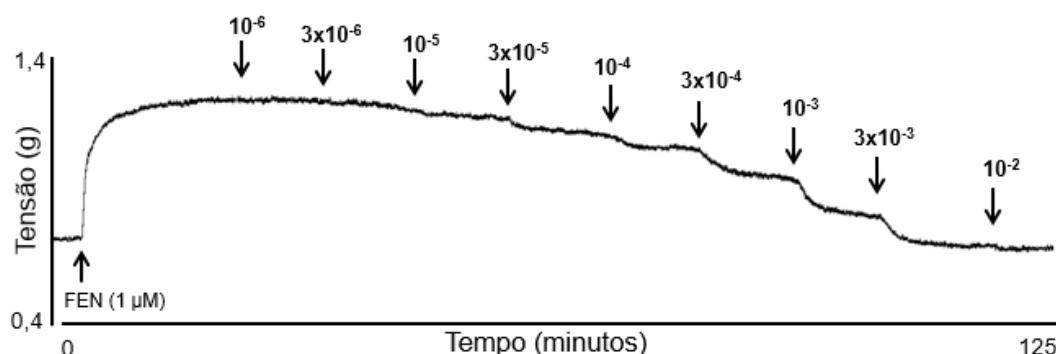
Em anéis mesentéricos pré-contraídos com FEN ( $1 \mu\text{M}$ ) com endotélio intacto, a adição cumulativa do I3C ( $10^{-6} - 10^{-2} \text{ M}$ ) promoveu um vasorrelaxamento ( $E_{\text{máx}} = 103,9 \pm 4,2 \%$ ;  $pD_2 = 3,21 \pm 0,05$ ,  $n = 5$ ), de maneira dependente de concentração. A remoção mecânica do endotélio não alterou a resposta relaxante induzida pelo I3C ( $E_{\text{máx}} = 105,8 \pm 2,6 \%$ ;  $pD_2 = 3,09 \pm 0,03$ ,  $n = 5$ ) (Figura 14 e gráfico 2). Dessa forma, considerando a possível ausência dos fatores vasoativos derivados do endotélio no relaxamento induzido pelo I3C, todos os protocolos experimentais subsequentes foram realizados em vasos sem o endotélio vascular.

Figura 14 - Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante do I3C em anéis de artéria mesentérica superior isolados de rato normotensão, pré-contraídos com FEN.

### A) Anéis com endotélio vascular



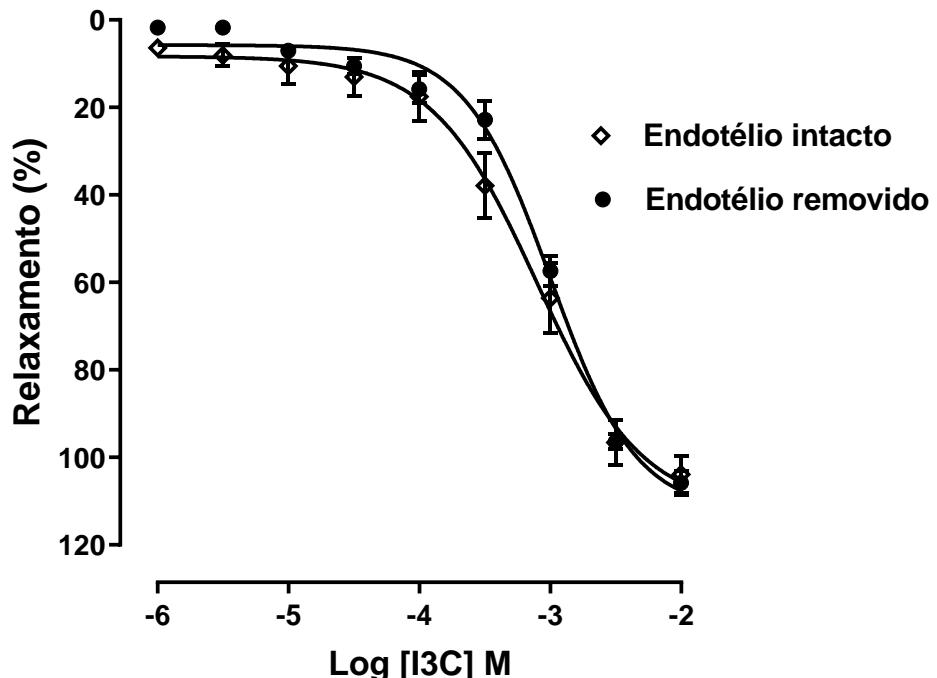
### B) Anéis sem endotélio vascular



Figuras mostrando os traçados representativos da resposta relaxante do I3C ( $10^{-6} - 10^{-2} \text{ M}$ ) em anéis pré-contraídos com FEN ( $1 \mu\text{M}$ ) na presença (A) ou na ausência (B) do endotélio vascular. As setas representam o momento de adição das substâncias.

Fonte: Autor, 2022.

Gráfico 2 - Efeito vasorrelaxante induzido pelo I3C em artéria mesentérica superior isolados de rato normotensão, pré-contraídos com FEN.



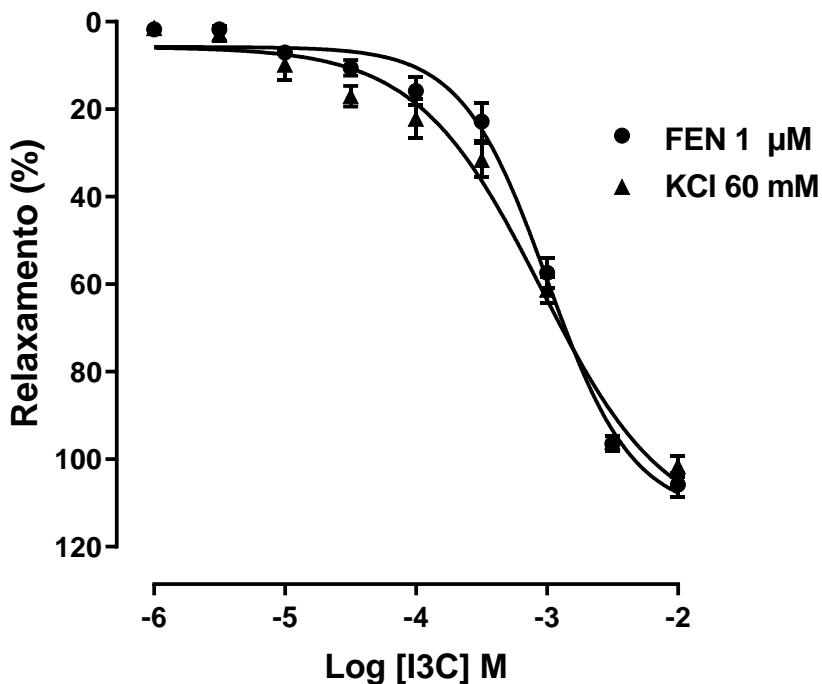
Curvas de concentração-resposta do I3C ( $10^{-6}$  –  $10^{-2}$  M) em artérias mesentéricas isoladas de ratos Wistar, pré-contraídos com FEN (1  $\mu$ M) na presença (◊) e na ausência (●) do endotélio vascular. Os dados estão expressos como média  $\pm$  e.p.m (n = 5).

Fonte: Autor, 2022.

### 6.3 Efeito relaxante do I3C em artéria mesentérica de ratos, pré-contraídos com KCl 60 mM

Em anéis mesentéricos, na ausência do endotélio vascular, pré-contraídos com solução despolarizante de 60 mM de KCl, a adição cumulativa do I3C ( $10^{-6}$  -  $10^{-2}$  M) induziu uma resposta vasorrelaxante, de forma dependente de concentração ( $E_{máx} = 101,6 \pm 2,3\%$ ;  $pD_2 = 3,26 \pm 0,04$ ; n = 5). Além disso, observou-se que essa resposta foi estatisticamente semelhante àquela induzida pelo composto em preparações sem endotélio pré-contraídos por FEN (1  $\mu$ M) ( $E_{máx} = 105,8 \pm 2,6\%$ ;  $pD_2 = 3,09 \pm 0,03$ ; n = 5) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Efeito vaso relaxante induzido pelo I3C em artéria mesentérica de ratos normotensos, pré-contraídos com KCl 60 mM.



Curvas de concentração-resposta do I3C ( $10^{-6}$  –  $10^{-2}$  M) em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1  $\mu$ M) (●) ou com solução despolarizante, KCl 60 mM (▲). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m ( $n = 5$ ).

Fonte: Autor, 2022.

#### 6.4 Simulações de *docking* molecular

Os canais  $\text{Ca}_v1.2$  apresentam cinco subunidades, correspondendo respectivamente: a principal ou subunidade formadora de poros,  $\alpha_1$  (170 kDa) e diferentes subunidades auxiliares,  $\alpha_2$  (150 kDa),  $\beta$  (50-78 kDa),  $\delta$  (17-25 kDa) e  $\gamma$  (32 kDa) (FENG; KALYAANAMOORTHY; BARAKAT, 2018). Neste estudo, foi realizada a seleção de uma estrutura cristalina única de um fragmento de 77 resíduos do terminal carboxil da subunidade  $\alpha_1$  do canal  $\text{Ca}_v1.2$ , que inclui um conjunto de domínios pré-IQ e IQ, em complexo com  $\text{Ca}^{2+}$  ligado a CaM ( $\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}$ ) para ancoragem. Dessa maneira, a simulação de *docking* molecular foi utilizada para investigar o mecanismo de ação no canal  $\text{Ca}_v1.2$  e explorar as interações entre este canal iônico e o composto I3C.

O I3C foi submetido ao rastreio de *docking* molecular com o alvo molecular domínio regulador C-terminal de  $\text{Ca}_v1.2$  ligado a CaM (PDB ID: 3G43), sendo os resultados da simulação gerados por meio de duas funções de pontuação, o MolDock

Score (GRID) e o PLANTS Score (GRID) (Tabela 3). Os valores mais negativos indicaram melhores previsões para as duas funções de pontuação em estudo.

Tabela 3 - Valores de energia de ligação do I3C e do nifedipino analisados no alvo molecular domínio regulador C-terminal de Ca<sub>v</sub>1.2 ligado a calmodulina

Proteína	I3C		Nifedipino	
	MolDock Score	PLANTS Score	MolDock Score	PLANTS Score
Canal Ca <sub>v</sub> 1.2	-61,6949	<b>-51,4502</b>	<b>-71,2729</b>	-49,4537

Em negrito encontram-se destacados os melhores resultados, ou seja, os compostos de menor energia para o algoritmo em estudo.

Fonte: Autor, 2022.

De acordo com os resultados obtidos, o I3C apresentou energias negativas nos dois algoritmos em estudo, demonstrando, dessa forma que ocorreu interação com o alvo molecular domínio regulador C-terminal de Ca<sub>v</sub>1.2 ligado a CaM.

Os resultados mostram que para o algoritmo PLANTS Score o I3C obteve score menor que o nifedipino. O I3C obteve score de -51,4502 kcal/mol, enquanto que o nifedipino obteve score de -49,4537 kcal/mol. Estes resultados indicam que o I3C tem maior afinidade de ligação com a subunidade  $\alpha_1$  do canal Ca<sub>v</sub>1.2 para este algoritmo.

Com relação aos resultados referentes ao algoritmo MolDock Score o I3C apresentou score de -61,6949 kcal/mol, enquanto o nifedipino apresentou score de -71,2729 kcal/mol, desta forma, o I3C não demonstrou uma maior afinidade quando comparado ao controle positivo nifedipino. Em seguida, foi realizado o cálculo de normalização do score de docking molecular (*Docking Score Correction – DSC*) (GUPTA et al., 2015; SOUSA, 2020), levando em consideração a influência da massa molecular, segundo a fórmula abaixo (equação 4):

$$\text{DSC} = \frac{\text{Score}}{\text{Massa molecular}} \quad (4)$$

Dessa forma, para o algoritmo MolDock Score, os resultados de afinidade podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de energia de ligação do I3C e do nifedipino analisados no alvo molecular domínio regulador C-terminal de Ca<sub>v</sub>1.2 ligado a calmodulina, após os cálculos de normalização de docking molecular

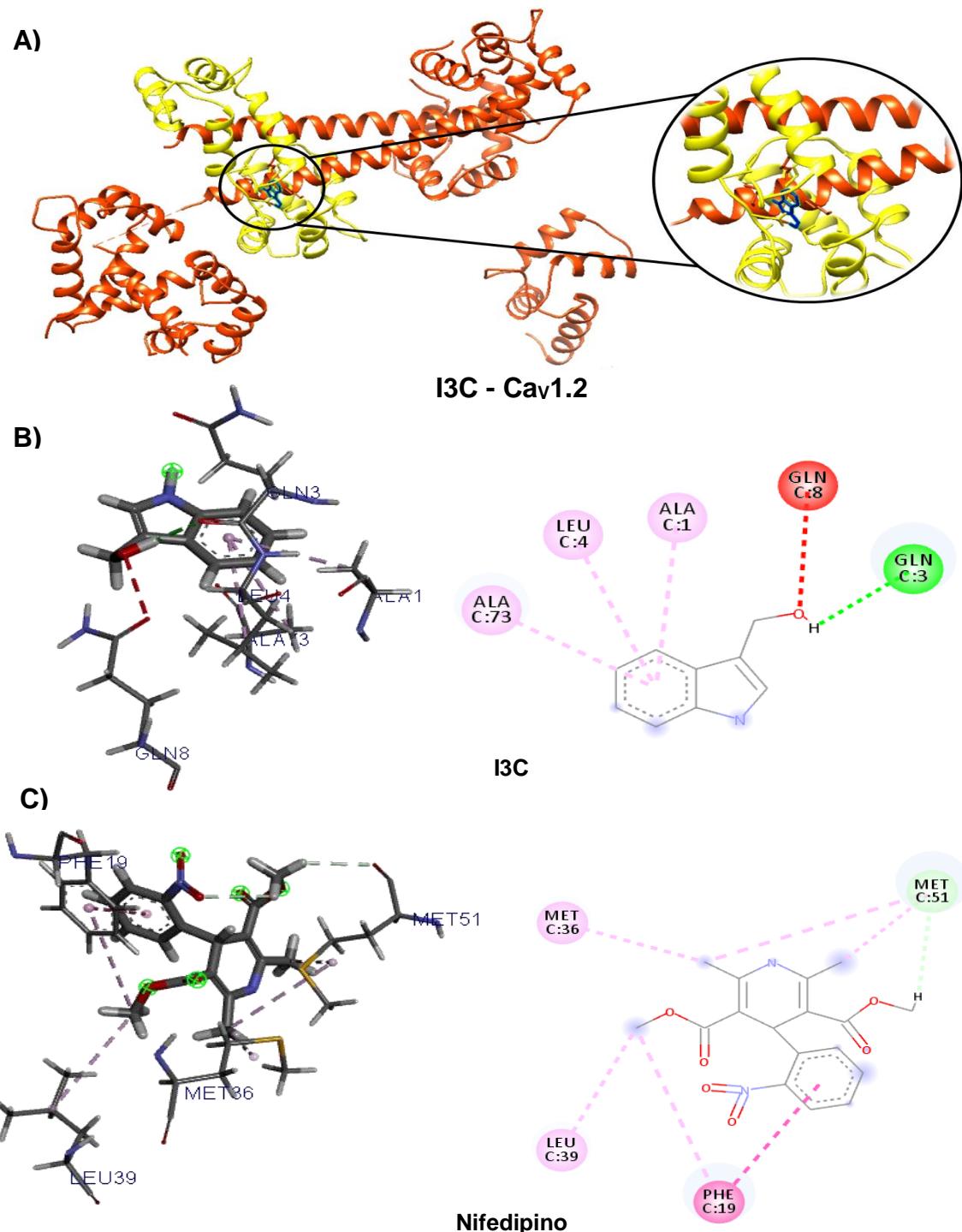
<b>Proteína</b>	<b>I3C</b>		<b>Nifedipino</b>	
	<b>MolDock Score</b>	<b>DSC</b>	<b>MolDock Score</b>	<b>DSC</b>
Canal Ca <sub>v</sub> 1.2	-61,6949	<b>-0,4191</b>	<b>-71,2729</b>	-0,1427

Em negrito encontram-se destacados os compostos de menor energia para o algoritmo em estudo.  
Fonte: Autor, 2022.

Segundo a Tabela 4, após a realização dos cálculos de normalização de *docking*, o I3C apresentou score menor do que o nifedipino o que pode indicar uma influência da diferença de massa molecular.

O acoplamento dos ligantes (I3C e nifedipino) com o alvo molecular (domínio regulador C-terminal de Ca<sub>v</sub>1.2 ligado a CaM) é demonstrado na Figura 15.

Figura 15 - Interações entre os ligantes e o alvo molecular



A) Estrutura 3D do acoplamento molecular do I3C (azul) com a subunidade  $\alpha_1$  (amarelo) do canal Ca<sub>v</sub>1.2 ligado a calmodulina (laranja); B) Interações 3D e 2D do canal Ca<sub>v</sub>1.2 com I3C; C) Interações 3D e 2D do canal Ca<sub>v</sub>1.2 com nifedipino.

Interações: hidrofóbicas estão destacadas em rosa, as interações de hidrogênio estão destacadas em verde e as interações estéricas estão destacadas em vermelho. Resíduos: Leu (Leucina), Phe (Fenilalanina), Met (Metionina), Ala (Alanina) e Gln (Glutamina).

Fonte: Autor, 2022.

Ao analisar as interações com os resíduos, na Figura 15, é possível observar que o I3C e o canal Cav1.2 formaram interações do tipo estéricas, ligação de hidrogênio e interações hidrofóbicas. As interações estéricas (linhas tracejadas em vermelho), foi estabelecida por apenas um resíduo que correspondeu a Gln 8 ligado ao átomo de Oxigênio (O) do grupamento hidroxila (OH). O grupo hidroxila estabeleceu uma interação adicional que correspondeu a uma ligação de hidrogênio (linha tracejada em verde) por meio do resíduo Gln 3. As interações estabelecidas em maior número compreenderam as interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) que foram situadas no anel benzeno, correspondendo aos resíduos Ala 73, Leu 4 e Ala 1. De maneira diferente ao observado no acoplamento molecular do I3C, o nifedipino estabeleceu apenas interações do tipo hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. A interação de hidrogênio (linha tracejada em verde), foi estabelecida pelo resíduo Met 51 com o átomo de Hidrogênio (H) do grupo éster ( $\text{COOCH}_3$ ), já as interações hidrofóbicas (linhas tracejadas em rosa) foram estabelecidas com os átomos de Carbono (C) dos grupamentos metila ( $\text{CH}_3$ ) através dos resíduos Phe 19, Leu 39, Met 36 e Met 51 (2 interações) e com os átomos de Carbono (C) do anel benzeno por meio do aminoácido Phe 19. Desta forma, a partir desses resultados obtidos, observou-se que não ocorreram interações semelhantes entre o composto I3C e o controle positivo nifedipino.

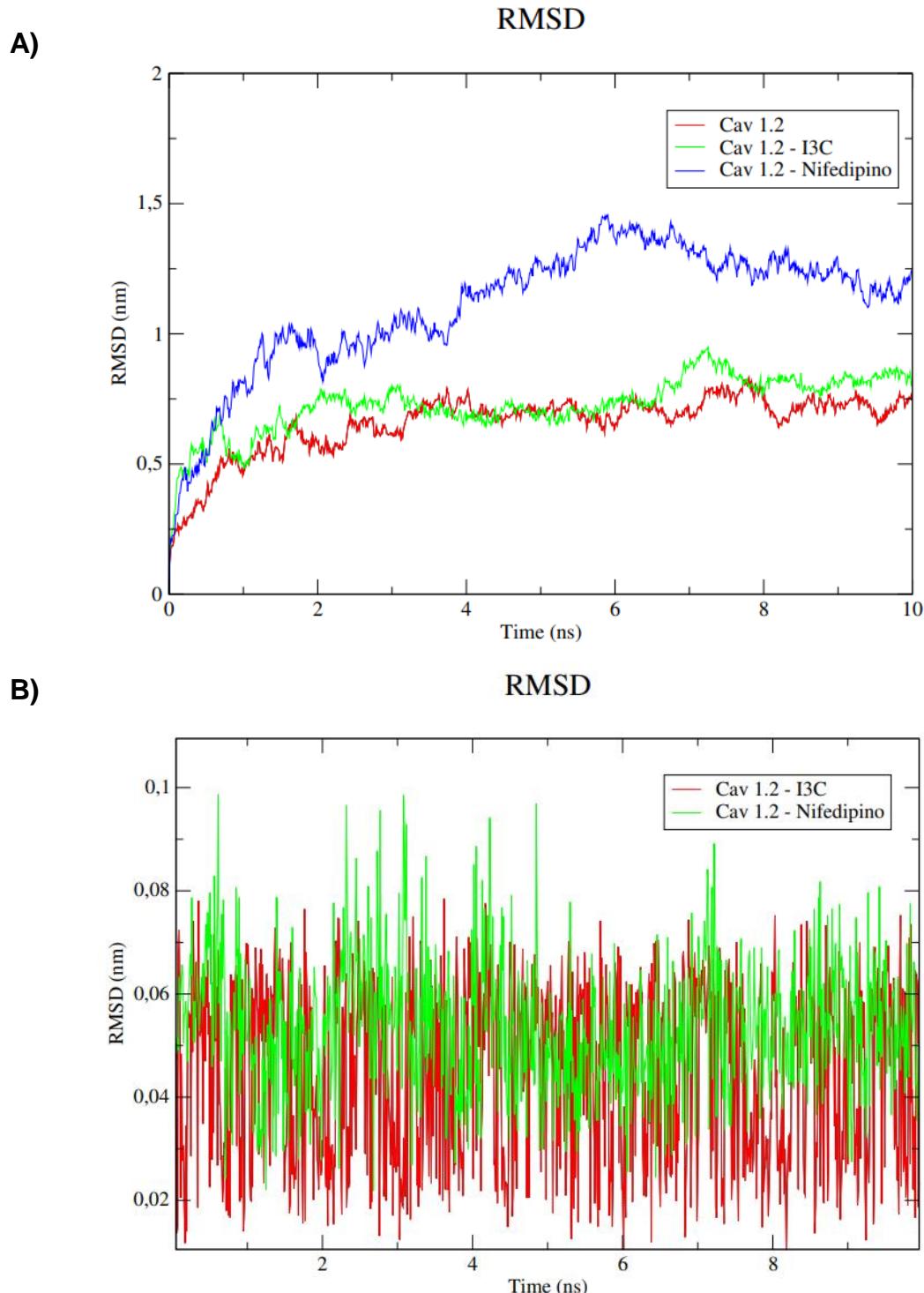
## 6.5 Simulações de dinâmica molecular

Simulações de DM foram realizadas para investigar se o I3C poderia se ligar à subunidade  $\alpha_1$  do canal Cav1.2 sob a influência de solvente, íons, temperatura e pressão. Flexibilidade e mudanças conformacionais na estrutura do canal iônico também foram investigadas. Para isso, o desvio quadrático médio (RMSD) e o desvio médio de flutuação (RMSF) foram calculados para os átomos de C $\alpha$  da subunidade e dos compostos separadamente.

A análise da métrica RMSD da subunidade  $\alpha_1$  do Cav1.2 (vermelho) (Figura 16A) mostrou que a estabilização da simulação ocorreu por volta de 3ns até o período de 6ns, em seguida, atingiu flutuações que variam de 0.5 até 1.0nm no período de tempo de 7ns, retornando a ficar estável a partir de 8ns. Dessa forma, foi observada uma alta estabilidade. O mesmo foi observado com a subunidade  $\alpha_1$  do Cav1.2 quando complexado ao I3C (verde). Já com relação a subunidade  $\alpha_1$  do Cav1.2 complexado

ao nifedipino (azul) (Figura 16A), foi observado um comportamento não estável. A estabilidade desta proteína é essencial para manter os compostos ligados ao sítio ativo.

Figura 16 - RMSD dos átomos de Ca do  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$  e dos compostos



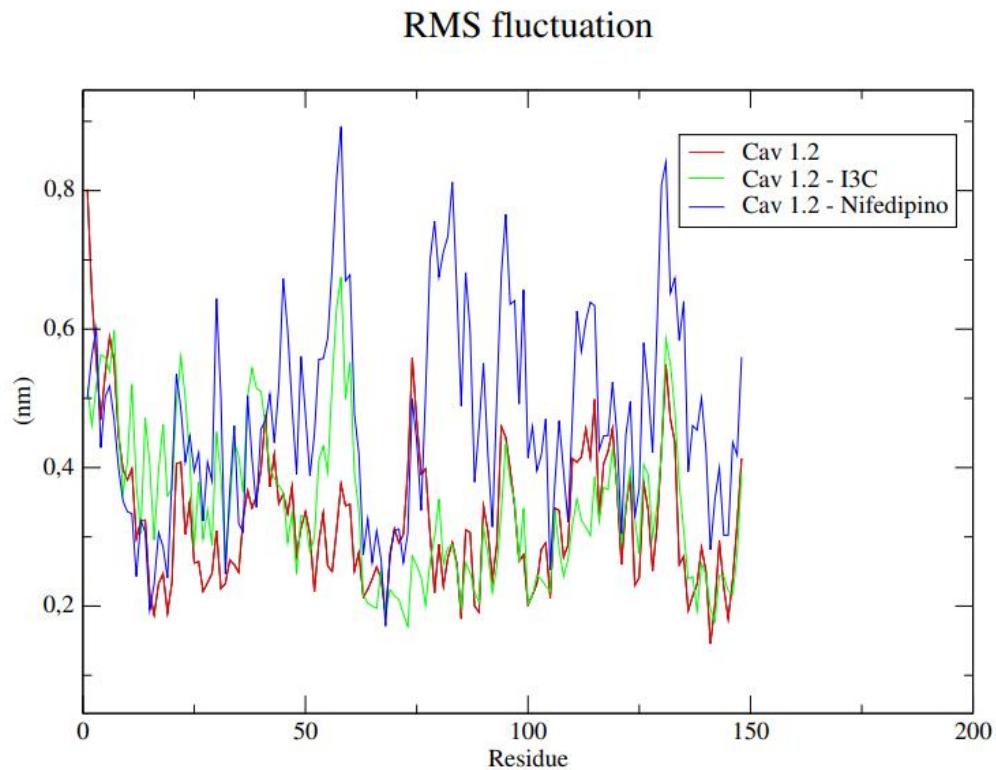
- A) RMSD dos átomos de Ca do  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$  (vermelho) complexados ao I3C (verde) e ao nifedipino (azul).
- B) RMSD dos átomos de Ca do I3C (vermelho) e do nifedipino (verde).

Fonte: Autor, 2022.

Ao analisar a estabilidade dos ligantes (Figura 16B) mediante a presença de solventes, foi verificado que os dois compostos em estudo apresentaram um comportamento semelhante, visto que, o resultado demonstrado encontra-se ampliado com valores de RMSD bem baixos a fim de proporcionar uma melhor visualização do valor da métrica em estudo. De um modo geral, é perceptível que o controle positivo nifedipino (verde) apresentou maiores flutuações o que acarretou em valor de RMSD mais alto quando comparado ao composto teste I3C (vermelho). O nifedipino apresentou RMSD de 0.1nm, enquanto que o valor de RMSD mais alto obtido pelo I3C correspondeu a 0.08nm (Figura 16B), o que indica uma maior estabilidade do composto em estudo. Portanto, na presença de solventes, íons e outros fatores, o I3C demonstrou ser capaz de estabelecer ligações fortes com o sítio ativo. Dessa forma, sugere-se que o I3C tende a permanecer no sítio ativo mesmo na presença de diferentes fatores como temperatura, pressão, solvente e íons.

Para entender a flexibilidade dos resíduos e dos aminoácidos que contribuem para a mudança conformacional no Cav1.2, foram calculados os RMSF de cada aminoácido na proteína (Figura 17). Resíduos com altos valores de RMSF sugerem mais flexibilidade e baixos valores de RMSF refletem menos flexibilidade. Considerando que aminoácidos com flutuações acima de 0,3nm contribuem para a flexibilidade da estrutura do canal, foi verificado que dentre os aminoácidos presentes na proteína, os resíduos das posições: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 21, 22, 23, 24, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 49, 50, 54, 57, 58, 59, 60, 70, 73, 74, 75, 76, 77, 86, 94, 95, 96, 97, 106, 107, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 122, 123, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 147 e 148, os quais correspondem a maior parte dos aminoácidos que compõem a estrutura da macromolécula em estudo, contribuem para a mudança conformacional da proteína complexada ao I3C. Os canais iônicos geralmente têm maior flexibilidade do que outros tipos de proteínas.

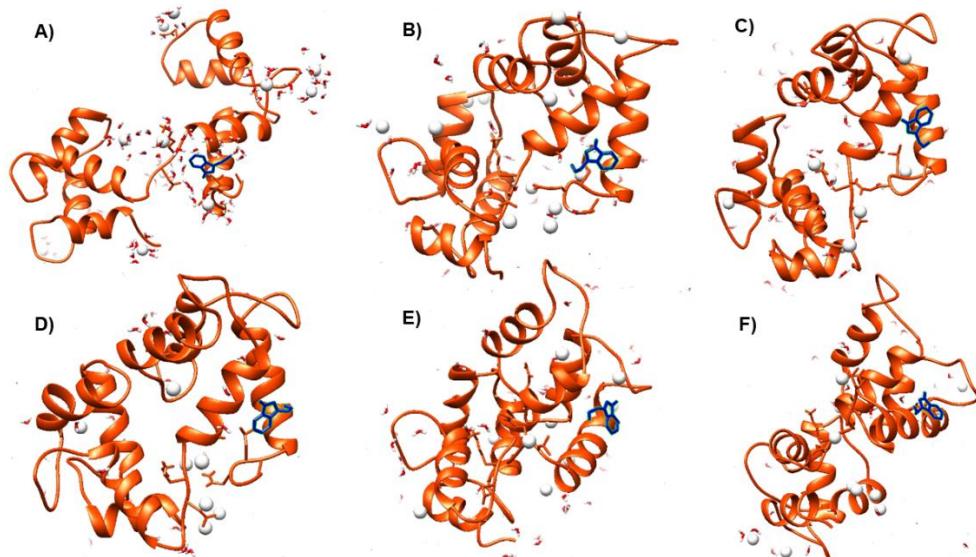
Figura 17 - RMSF para os átomos de Ca do canal Ca<sub>v</sub>1.2 e dos compostos



RMSF dos átomos de Ca do Ca<sub>v</sub>1.2 (vermelho) complexados ao I3C (verde) e ao nifedipino (azul).  
Fonte: Autor, 2022.

Quando analisado através de programas gráficos, foi observado que o Ca<sub>v</sub>1.2 complexado ao I3C apresentou mudanças conformacionais identificadas pelos valores de RMSD (Figura 18).

Figura 18 - Simulações de dinâmica molecular durante 1000ps



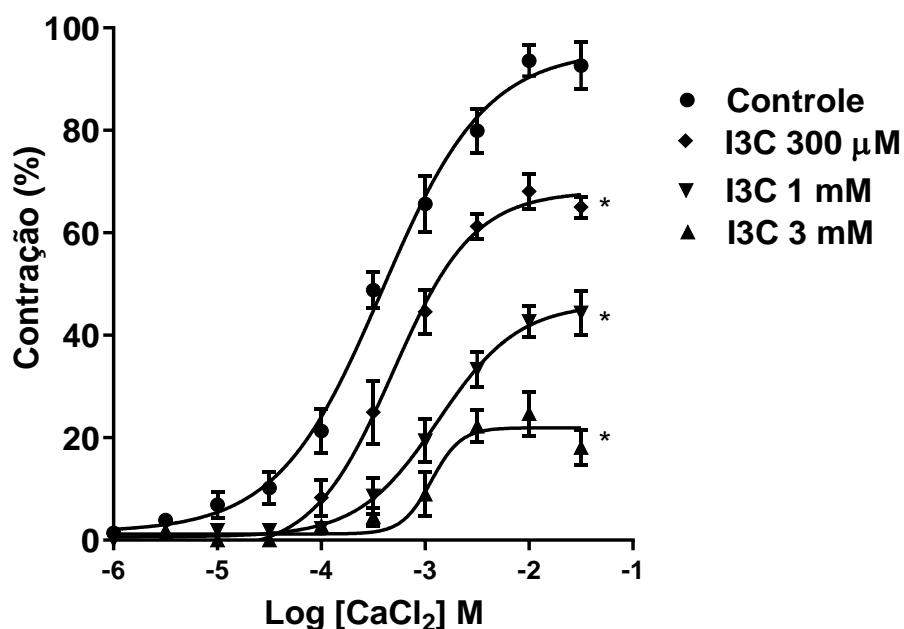
Estruturas 3D do complexo Ca<sub>v</sub>1.2 – I3C: A) Antes da simulação de DM; B) 200ps; C) 400ps; D) 600ps; E) 800ps e F) 1000ps.  
Fonte: Autor, 2022.

## 6.6 Efeito do I3C sobre as contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> em artéria mesentérica de ratos

O Gráfico 4 mostra que as adições crescentes e cumulativas do CaCl<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-2}$  M) em solução de KCl 60 mM livre de Ca<sup>+2</sup> promoveu uma resposta contrátil dependente de concentração ( $E_{máx} = 92,65 \pm 4,6\%$ ;  $pD_2 = 3,46 \pm 0,05$ , n = 15). Entretanto, a pré-incubação dos anéis mesentéricos de rato Wistar, sem endotélio funcional, com diferentes concentrações do I3C induziu uma redução nas contrações pelo CaCl<sub>2</sub>, de forma dependente de concentração.

Os valores obtidos foram:  $E_{máx} = 65,05 \pm 2,1\%$ ;  $pD_2 = 3,38 \pm 0,05$ , n = 5;  $E_{máx} = 44,37 \pm 4,3\%$ ;  $pD_2 = 2,93 \pm 0,06$ , n = 5 e  $E_{máx} = 18,11 \pm 3,5\%$ ;  $pD_2 = 3,23 \pm 0,13$ , n = 5, para as concentrações de I3C 300 μM, 1 mM e 3 mM, respectivamente. Esses valores foram comparados com a curva controle de CaCl<sub>2</sub>.

Gráfico 4 - Efeito inibitório do I3C na resposta contrátil induzida por CaCl<sub>2</sub> em anéis de artéria mesentérica isolada de ratos normotensos.

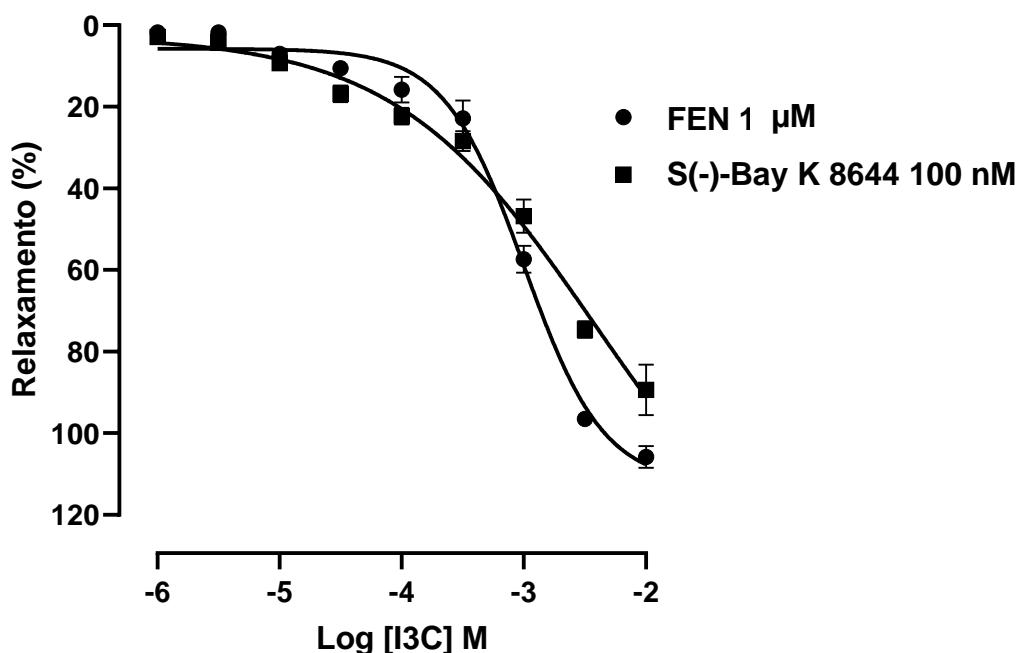


Curvas de concentração-resposta para CaCl<sub>2</sub> ( $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-2}$  M), em anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio funcional, na ausência (●) e após a incubação de concentrações isoladas do I3C a 300 μM (◆), 1 mM (▼) e 3 mM (▲) em solução livre de Ca<sup>+2</sup> contendo KCl 60 mM. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m (n = 5). \*p < 0,05 vs. Controle.  
Fonte: Autor, 2022.

## 6.7 Efeito do I3C sobre as contrações induzidas por S(-)-Bay K 8644 em artéria mesentérica de ratos

Nos anéis de artéria mesentérica superior, sem endotélio funcional, observou-se que as adições cumulativas de concentrações crescentes de I3C ( $10^{-6}$  -  $10^{-2}$  M) induziu uma resposta vasorrelaxante, de forma dependente de concentração, quando as preparações foram pré-contraídas com o ativador dos canais  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$ , S(-)-Bay K 8644 (100 nM), em meio despolarizante (KCl 20 mM) ( $E_{\text{máx}} = 89,33 \pm 6,0\%$ ;  $pD_2 = 3,18 \pm 0,05$ ;  $n = 5$ ). Os dados obtidos nessas condições experimentais foram comparados ao relaxamento em anéis, sem endotélio, pré-contraídos com FEN (1  $\mu\text{M}$ ) ( $E_{\text{máx}} = 105,8 \pm 2,6\%$ ;  $pD_2 = 3,09 \pm 0,03$ ;  $n = 5$ ) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Efeito vasorrelaxante induzido pelo I3C em anéis de artéria mesentérica pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644.



Curvas de concentração-resposta do I3C ( $10^{-6}$  –  $10^{-2}$  M) nos anéis de artéria mesentérica superior isolada de ratos Wistar sem endotélio, pré-contraídos com o ativador dos canais  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$ , S(-)-Bay K 8644 (100 nM) (■) ou FEN (1  $\mu\text{M}$ ) (●). Os valores estão expressos como média  $\pm$  e.p.m ( $n = 5$ ).

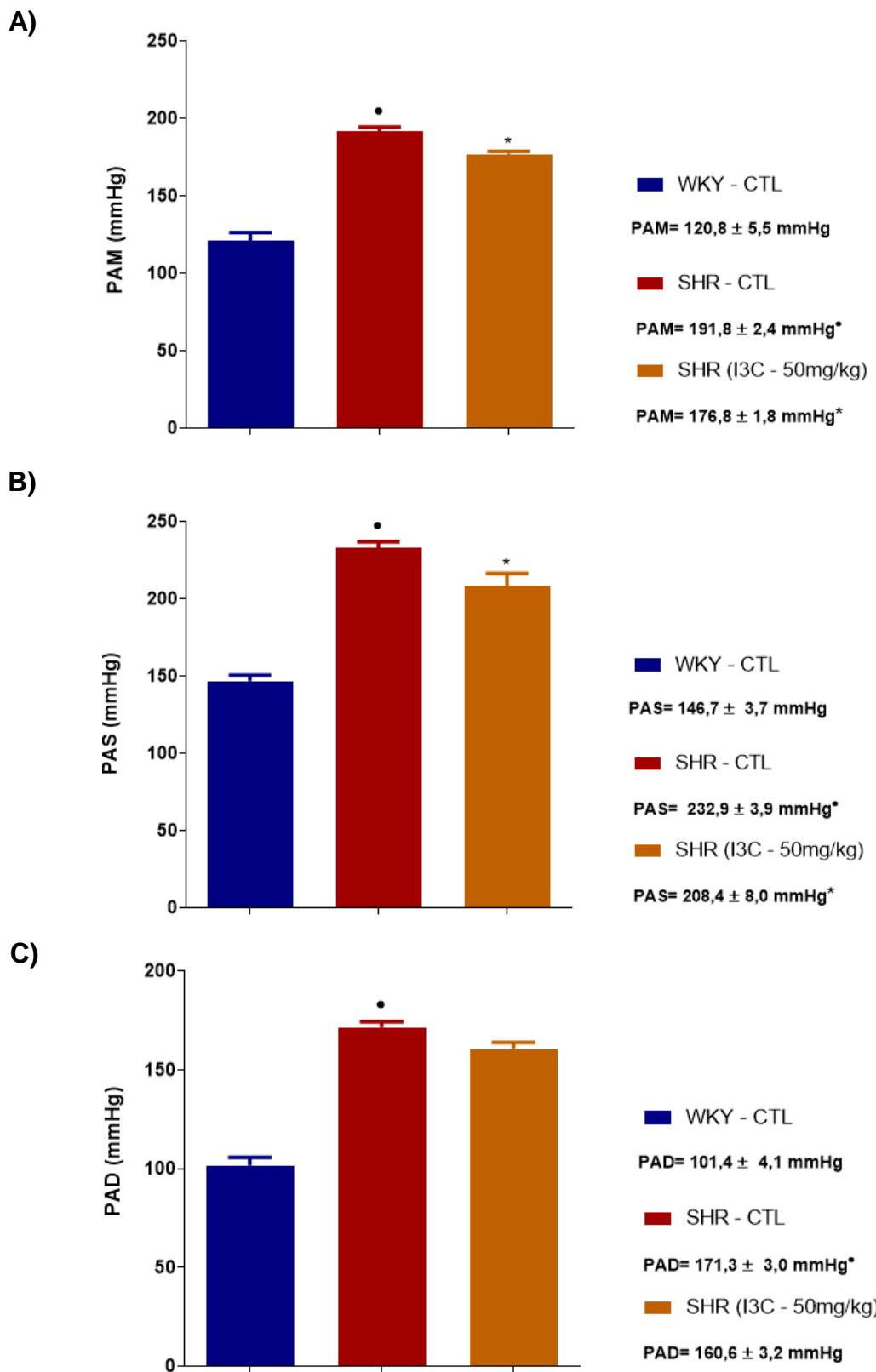
Fonte: Autor, 2022.

## 6.8 Efeitos induzidos pelo I3C na PA de ratos hipertensos após o tratamento

Por meio da medida direta da pressão, foi constatado que os animais SHR-CTL apresentaram níveis de PAM, PAS e PAD ( $191,8 \pm 2,4$  mmHg;  $232,9 \pm 3,9$  mmHg;  $171,3 \pm 3,0$  mmHg;  $n = 5$ ; respectivamente) maiores que o grupo WKY-CTL ( $120,8 \pm 5,5$  mmHg ( $n = 6$ );  $146,7 \pm 3,7$  mmHg ( $n = 5$ );  $101,4 \pm 4,1$  mmHg ( $n = 6$ )), respectivamente,  $p < 0,05$ ) (Gráfico 6).

Por outro lado, o tratamento dos animais SHR com I3C 50 mg/kg os valores de PAM e PAS ( $176,8 \pm 1,8$  mmHg;  $208,4 \pm 8,0$  mmHg;  $n = 6$ ; respectivamente,  $p < 0,05$ ) foram reduzidos, de maneira significativa, quando comparados ao grupo SHR-CTL. Já em relação a medida da PAD não foi observado diferença estatística entre os animais hipertensos tratados com I3C na dose de 50 mg/kg ( $160,6 \pm 3,2$  mmHg;  $n = 5$ ) e o grupo SHR-CTL (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Efeito do I3C sobre a PAM, PAS e PAD nos diferentes grupos após o tratamento



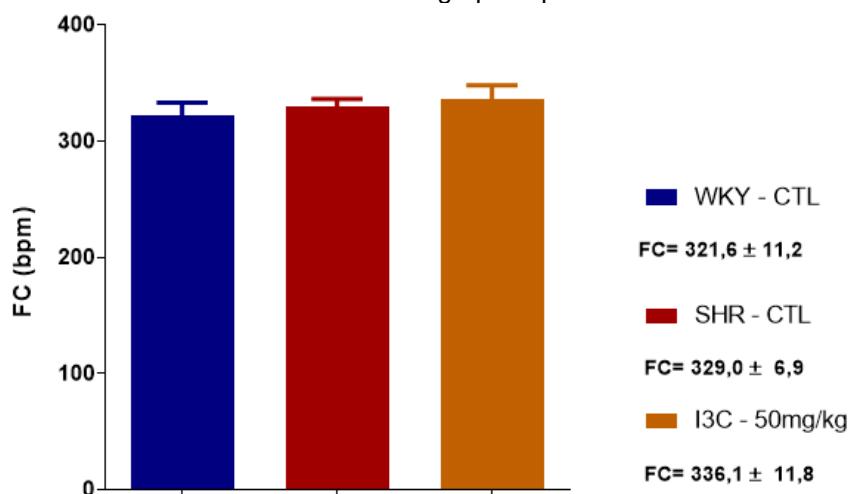
Valores de A) PAM; B) PAS e C) PAD obtidos por medida direta da pressão arterial, nos diferentes grupos de animais, após 28 dias de tratamento. Grupos: WKY-CTL; SHR-CTL e SHR-I3C 50 mg/kg. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguida do pós-teste de Dunnett. \* $p < 0,05$  vs. WKY-CTL; \* $p < 0,05$  vs SHR-CTL.

Fonte: Autor, 2022.

## 6.9 Efeitos induzidos pelo I3C na FC de ratos hipertensos após o tratamento

Em relação a FC não houve diferença estatística entre o grupo SHR-CTL ( $329,0 \pm 6,9$  bpm; n = 5) e WKY-CTL ( $321,6 \pm 11,2$  bpm; n = 6). Além disso, após os 28 dias de tratamento dos animais, também não foi observado modificação na FC no grupo SHR - I3C 50 mg/kg ( $336,1 \pm 11,8$  bpm; n = 6), quando comparado aos animais SHR-CTL (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Efeito do I3C sobre a FC nos diferentes grupos após o tratamento



Valores de FC dos diferentes grupos de animais, após 28 dias de tratamento. Grupos: WKY-CTL (n = 6); SHR-CTL (n = 5) e I3C-50 mg/kg (n = 6). Os dados foram analisados utilizando ANOVA *one way*, seguida do pós-teste de Dunnett.

Fonte: Autor, 2022.

# Discussão

## 7 Discussão

Este estudo foi realizado com o intuito de avaliar as ações cardiovasculares induzidas pelo I3C, empregando-se três abordagens metodológicas, *in vivo*, *in vitro* e *in silico*. O principal achado foi que a administração aguda do composto teste, por via i.v., promoveu efeito hipotensor associada à bradicardia e vasorrelaxamento, independente de endotélio, em anéis mesentéricos isolados de ratos normotensos. Além disso, em modelo animal de hipertensão, o tratamento com o I3C, por v.o., durante 28 dias, reduziu os níveis pressóricos de ratos SHR. O mecanismo provavelmente envolve o bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  do espaço extracelular através dos canais  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$  e consequente redução da  $[\text{Ca}^{+2}]_{\text{i}}$  nas CMLV, semelhante a algumas drogas comumente utilizadas no tratamento da HAS, tais como as DHP (WANG; IADECOLA; WANG, 2017).

Apesar da diversidade de propriedades farmacológicas do I3C já reportadas na literatura, até o momento, não há informações que mostre os seus efeitos na contratilidade dos vasos sanguíneos. Deste modo, este estudo foi realizado para investigar o efeito hipotensor e vasorrelaxante em ratos Wistar deste promissor composto, além de avaliar o efeito anti-hipertensivo em modelo animal de HAS, e o seu possível mecanismo relacionado a tais efeitos.

Inicialmente, como parte dos objetivos, foram realizados experimentos *in vivo* para avaliar a resposta do I3C sobre a PAM e a FC em ratos normotensos conscientes. Quando o I3C foi administrado de forma aguda (i.v.; *in bolus*), em doses randômicas, promoveu hipotensão dose-dependente associada à bradicardia. É importante destacar que geralmente a redução na PA desencadeia uma taquicardia como resposta reflexa. No entanto, além da hipotensão, o I3C induziu bradicardia. Esse resultado sugere que a redução da PA observada pela administração do I3C poderia ser explicado, pelo menos em parte, ao efeito da bradicardia da substância, tendo em vista que a PA é definida pela relação entre o DC e a RVPT. Outra explicação para essa atividade hipotensora provavelmente seria devido a um possível efeito direto do I3C no músculo cardíaco modulando o tônus vascular.

Com a finalidade de compreender o mecanismo referente a hipotensão do I3C e sabendo-se que, além da bradicardia, uma redução da RVPT pode provocar uma diminuição da PA, levantou-se a hipótese de que o composto, pode agir direto nas CMLV contribuindo para a resposta hipotensora obtida. Portanto, visando investigar o

efeito direto do I3C na vasculatura, foi realizado experimentos *in vitro* usando preparações mesentéricas isoladas de ratos Wistar.

Desta forma, este estudo forneceu evidências de que o I3C induziu relaxamento dependente de concentração em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio vascular intacto, quando eles foram pré-contraídos com FEN, sendo esta contração mediada pela ativação do acoplamento da proteína Gq/11 aos  $\alpha_1$ -adrenoceptores que é caracterizada por uma fase inicial de contração desencadeada pela liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular induzida pelo 1,4,5 trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) do RS seguida por uma fase tônica que resulta do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  através dos ROCCs (EHRLICH; WATRAS, 1988; WICHA et al., 2020).

Além disso, foi observado que a remoção do endotélio não alterou o vasorrelaxamento causado pelo I3C, sugerindo que possivelmente o efeito vasodilatador ocorre de forma independente da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio vascular e mediado provavelmente por sua ação direta na musculatura lisa arterial, podendo contribuir para a ação hipotensora.

Por outro lado, o I3C também induziu vasorrelaxamento dependente de concentração, quando os anéis mesentéricos desnudados pelo endotélio funcional foram pré-contraídos com KCl 60 mM, com resposta semelhante à apresentada pela FEN, sem diferenças significativas. A contração induzida por KCl ocorre devido à uma despolarização da membrana e, consequentemente, a um aumento no influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  através dos VOCCs (SOMLYO; SOMLYO, 1968; WICHA et al., 2020). Baseado nestes resultados, sugerimos que o I3C parece estar atuando, pelo menos em parte, através de etapas semelhantes ao mecanismo de ação destes dois agentes contráteis (FEN e KCl 60 mM).

Como é conhecido que as CMLV desempenham um papel crucial na regulação do tônus vascular por meio de uma via independente do endotélio, e levando-se em conta que a FEN e o KCl são os principais efeitos resultantes do aumento da  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ , causando um aumento do tônus das CMLV (WICHA et al., 2020), levantou-se a hipótese de que a vasodilatação induzida pelo I3C poderia estar relacionada à inibição do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  via canais  $\text{Ca}_v$ .

Com o intuito de verificar essa hipótese, decidiu-se realizar estudos *in silico* para avaliar o mecanismo de ação hipotensor e vasorrelaxante do I3C. Os métodos *in silico* estão sendo frequentemente utilizados na descoberta de novos medicamentos. O encaixe permite a identificação de compostos de interesse terapêutico, prevendo

interações entre o ligante e o alvo em nível molecular (PINZI; RASTELLI, 2019). Diante disso, no presente estudo foram avaliadas as interações moleculares do I3C com o canal Ca<sub>v</sub>1.2 ligado a CaM, pelo uso de ferramentas da biologia estrutural – *docking* e dinâmica molecular.

Os resultados obtidos no *docking* molecular, mostraram uma interação do I3C com o alvo, sendo observado para o composto um *score* menor no algoritmo PLANTS Score quando comparado com o nifedipino, o qual foi utilizado como controle positivo na simulação de encaixe molecular. Desta forma, esse resultado sugere que o I3C apresenta maior afinidade de ligação com o canal Ca<sub>v</sub>1.2 para esse algoritmo. No entanto, o mesmo não foi observado para o algoritmo MolDock Score.

Segundo os autores Carta, Knox e Lloyd (2007), algumas funções de pontuação exibem viés na priorização de moléculas mais complicadas decorrentes de componentes aditivos dentro da função. Além disso, o viés do ligante pode contribuir significativamente para o número de falsos positivos observados em uma triagem virtual. No cálculo do *score* de afinidade, o MolDock Score utiliza como um dos parâmetros de cálculo a massa molecular do composto em análise, dessa forma, moléculas de massa molecular mais baixa podem apresentar uma menor afinidade de ligação (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006; DE AZEVEDO; WALTER, 2010; ACEVEDO; SCOTTI; SCOTTI, 2018). Como o I3C (MM: 147,18 g/mol) apresenta massa molecular menor que o nifedipino (MM: 346,33 g/mol), pode explicar a menor afinidade de ligação com o alvo no algoritmo MolDock Score.

A partir dos resultados obtidos no docking, foram realizadas simulações de dinâmica molecular para investigar se o I3C poderia se ligar a principal subunidade ( $\alpha 1C$ ) formadora do poro do canal Ca<sub>v</sub>1.2 sob a influência de solventes, íons, temperatura e pressão. O resultado da simulação foi satisfatório, pois o I3C apresentou uma alta estabilidade, visto que foram observados valores de RMSD mais baixos quando comparado com os valores obtidos pelo controle positivo nifedipino. Com relação aos resultados referentes ao RMSF, foi observado que a proteína apresentou flutuações dos aminoácidos, porém isso representa uma característica de canais iônicos, os quais são muito flexíveis, mas, apesar disso, os resíduos do sítio ativo não foram comprometidos, demonstrando que o I3C permaneceu no sítio ativo da proteína durante toda a simulação. Além disso, foi perceptível que o canal iônico apresentou mudanças conformacionais, pois o complexo foi submetido a várias condições como mudanças de cargas, temperatura e pressão, como também

tratamento com íons, entretanto apresentou uma tendência a manter as características do sítio ativo conforme foi observado nos resultados referentes as métricas de RMSD e de RMSF.

A partir desta descoberta, e também, sabendo-se que os BCCs são capazes de diminuir a PA, o I3C foi avaliado na presença de contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> em meio despolarizante livre de cálcio em artéria mesentérica superior de ratos Wistar. Os resultados deste estudo revelaram que a pré-incubação com o I3C inibiu, de forma dependente de concentração, as contrações dependentes do influxo de Ca<sup>+2</sup>, confirmando a hipótese de que a inibição dos canais Ca<sub>v</sub> participa do efeito vasodilatador induzido pelo o I3C nos anéis mesentéricos de ratos.

Diante disso, o próximo objetivo do estudo foi avaliar se o efeito vasorrelaxante promovido pelo o I3C envolveria o bloqueio dos canais Ca<sub>v</sub>1.2, para isso analisou-se o efeito induzido pelo o I3C sobre as contrações induzidas pelo o S(-)-Bay K 8644, um ativador dos canais Ca<sub>v</sub>1.2 (CATTERALL et al., 2021). Os dados obtidos neste protocolo experimental mostraram que o I3C induziu relaxamento em artérias mesentéricas isoladas pré-contraídas com o S(-)-Bay K 8644, portanto sugerindo que a inibição do influxo de íons Ca<sup>+2</sup> de fontes extracelulares via canais Ca<sub>v</sub>1.2, provavelmente, é o mecanismo responsável pela vasodilatação mediada pelo composto. Esses achados corroboram com os estudos reportados na literatura sobre os efeitos vasorrelaxantes induzidos por outros alcaloides que apresentam semelhança na classe química, os quais atuam bloqueando os canais Ca<sub>v</sub>1.2, incluindo alcaloides isolados da *Uncaria rhynchophylla* (YUN et al., 2020) e 8-oxo-9-dihidromakomakina, isolado de *Aristolochia chilensis* (CIFUENTES et al., 2018).

Diante do efeito hipotensor observado na administração aguda do I3C, bem como o seu efeito vasorrelaxante evidenciado no presente estudo, passou-se a avaliar a atividade anti-hipertensiva, para isso, ratos SHR foram tratados durante 28 dias com o I3C. O modelo experimental SHR é de essencial importância, uma vez que compartilha características comuns à hipertensão em humanos, desde a sua instalação, progressão e a resposta farmacológica, sendo o modelo animal mais utilizado atualmente (DORIS, 2017; DORNAS; SILVA, 2011). Dessa forma, optou-se por trabalhar com esse modelo animal para investigar as ações farmacológicas do tratamento com o I3C.

A seleção da dose deste alcaloide utilizada no estudo ocorreu inicialmente através de uma busca em outros trabalhos que já demonstraram a avaliação da sua

toxicidade e o efeito biológico do composto teste. Em um estudo preliminar de faixa de dose foi revelado que em ratas Sprague Dawley fêmeas as doses de 100 e 50 mg/dia, 5x/semana, por v.o., não apresentaram efeitos tóxicos (GRUBBS et al.; 1995). Para avaliar a ação benéfica do I3C na leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL), Machijima e colaboradores (2009) utilizaram a dose de 50 mg/kg em camundongos durante 28 dias por v.o., e os resultados observados demonstraram o efeito anti-ATLL do I3C. Em outro trabalho, o pré-tratamento com 50 mg/kg de I3C, por v.o., mostrou proteção contra a hepatotoxicidade mediada pelo tetracloreto de carbono ( $CCl_4$ ) em camundongos (SHERTZER; BERGER; TABOR, 1988).

Já no trabalho desenvolvido por Exon e colaborador (2000), evidenciaram o efeito imunomodulador do I3C, uma vez que utilizando as doses de 50 e 100 mg/kg em ratos, observaram que os animais alimentados com a dose mais alta de I3C diariamente por 7 semanas reduziram significativamente a atividade das células natural Killer. Em outro estudo publicado, os autores avaliaram o efeito protetor do I3C contra comportamentos semelhantes à depressão induzida por clonidina em ratos, para isso o I3C (50 mg/kg) foi administrado v.o. diariamente por 2 semanas, 7 dias antes da clonidina (0,8 mg/kg, i.p.), e os resultados demonstraram o efeito neuroprotetor do I3C (EL-NAGA; AHMED; ADB AL HALEEM, 2014).

O tratamento dos animais com o I3C foi iniciado na décima segunda semana de vida dos animais e ocorreu até a décima sexta semana de idade, período em que a hipertensão já está estabelecida (SCHLÜTER; SCHRECKENBERG; DA COSTA REBELO, 2010). Ao final dos 28 dias de tratamento, foi realizada a medida direta da PA e FC com a finalidade de verificar se o consumo do I3C reduziria os níveis pressóricos dos animais SHR. Inicialmente, como esperado, observou-se que o grupo SHR-CTL apresentou valores pressóricos mais elevados que os animais do grupo WKY-CTL.

Além disso, a avaliação dos parâmetros de PA e FC dos animais SHR-CTL apresentados no presente trabalho mostraram a instalação da hipertensão neste modelo animal, visto que se aproximaram dos valores obtidos em outros estudos publicados. No trabalho de LV e colaboradores (2013) utilizando a técnica não invasiva para a aferição da PA com a pleismografia de cauda, os valores hemodinâmicos obtidos foram de 215 mmHg para a PAS e 170 mmHg para a PAD. De forma semelhante ao presente trabalho, por meio da mesma técnica invasiva utilizando a medida direta para mensurar a PA e a FC dos animais hipertensos,

através da canulação da aorta abdominal, Calzerra e colaboradores (2022) verificaram valores de 174,2 mmHg para a PAM, 219,3 mmHg para a PAS e 151,8 mmHg para a PAD. Em outro estudo, também utilizando a medida direta, os dados registrados foram de 163,3 para a PAM e 325,6 para a FC (PUPPIN et al., 2022).

Os valores hemodinâmicos da PA e da FC dos animais WKY apresentados também evidenciaram a normotensão desses ratos. Conforme observado no trabalho desenvolvido por Calzerra et al. (2022), o registro da PAM foi de 113,9 mmHg, da PAS foi de 145,6 mmHg e da PAD foi de 98 mmHg para os animais WKY, utilizando o método de medida direta para verificar a PA. Em outro estudo utilizando medida indireta para o registro da PA, através da pleismografia de cauda, os autores verificaram a normotensão dos animais WKY com valores de PAM em 122,7 mmHg (DE ALMEIDA SILVA et al., 2020).

Neste estudo, ao final do tratamento dos animais utilizando o I3C na dose de 50 mg/kg/dia por v.o., observou-se uma redução significativa na PAM e na PAS dos animais hipertensos quando comparados ao veículo, grupo tratado apenas com solução salina e cremofor. É interessante notar que este resultado corrobora com um estudo publicado por Prado e seus colaboradores (2022), em que o tratamento com o I3C (2000 ppm/dia, v.o.), durante as primeiras 8 semanas de vida dos animais, também reduziu os valores da PAS dos ratos SHR, utilizando a medida indireta para aferição da PA.

Também, no presente estudo foi observado que não houve diferença estatística na FC dos animais SHR-CTL e WKY-CTL. Esse resultado corrobora com alguns dados da literatura, os quais mostram que a FC é significativamente maior em SHR comparada ao WKY em torno das quatro primeiras semanas de vida dos animais, entretanto, se torna semelhante à medida que ocorre a progressão da PA (FAZAN et al., 2006). Além disso, o tratamento oral com o I3C não alterou a FC dos animais hipertensos (SHR) nem normotensos (WKY), sugerindo que o I3C induz os seus efeitos, provavelmente, por atuar em nível vascular, corroborando com os achados nos experimentos realizados da reatividade vascular utilizando animais normotensos (Wistar).

Em conjunto, os experimentos evidenciam que o I3C apresenta uma redução nos níveis pressóricos de ratos normotensos e hipertensos por um efeito direto nas CMLV, modulando o tônus vascular, por uma participação do bloqueio dos canais Ca<sub>v</sub>1.2 como o mecanismo de ação referente ao vasorrelaxamento induzido pelo

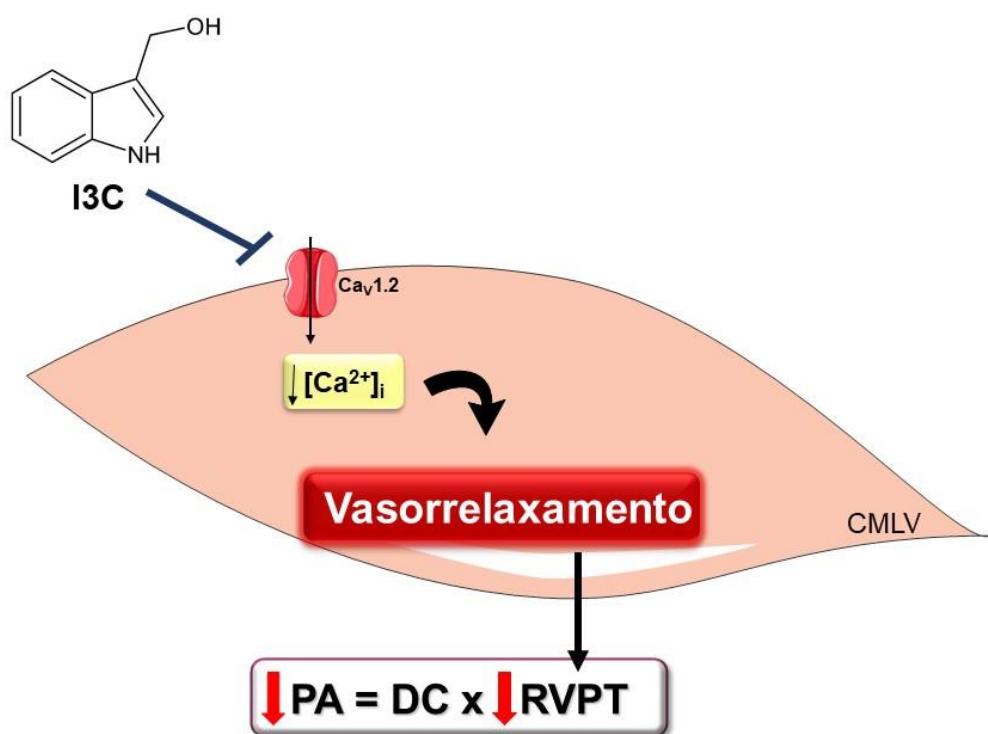
alcaloide indólico em anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato. Esses achados contribuem para o entendimento das propriedades farmacológicas e cardiovasculares, bem como para os benefícios da saúde do I3C.

# *Conclusões*

## 8 Conclusões

Este estudo demonstra que o alcaloide natural obtido de vegetais crucíferos, apresenta efeitos cardiovasculares em animais normotensos e hipertensos. A substância apresenta ação hipotensora associada à bradicardia nos animais normotensos, por um efeito direto nas CMLV reduzindo o tônus da musculatura lisa arterial. Além disso, os efeitos correlacionados ao modelo de hipertensão podem ser prevenidos pelo tratamento com o I3C, uma vez que ele promove uma redução da PA desses animais. Desta forma, os resultados reforçam os efeitos vasodilatador e hipotensor do I3C através de respostas independentes do endotélio vascular, decorrentes do bloqueio dos canais  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$  em músculo liso vascular, efeito que pode ser demonstrado por meio de experimentos *in silico*.

Esses achados têm potencial efeito clínico para a terapia da HAS, pois o bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pode causar uma redução da RVPT nas CMLV, e consequentemente, da PA, de forma semelhante aos bloqueadores dos canais  $\text{Ca}_{\text{v}}1.2$  já comumente utilizados clinicamente. Os resultados dessas investigações mostraram claramente uma forte relação entre o I3C e os seus efeitos farmacológicos sobre o sistema cardiovascular.



# *Referências*

## Referências

- ABERNETHY, D. R.; SCHWARTZ, J. B. Calcium-antagonist drugs. **New England journal of medicine**, v. 341, n. 19, p. 1447-1457, 1999.
- ABRAHAM, M. J.; MURTOOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J. C.; HESS, B.; LINDAHL, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1, p. 19-25, 2015.
- ACEVEDO, C. H.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T. In Silico Studies Designed to Select Sesquiterpene Lactones with Potential Antichagasic Activity from an In-House Asteraceae Database. **ChemMedChem**, v. 13, n. 6, p. 634-645, 2018.
- AGGARWAL, B. B.; ICHIKAWA, H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. **Cell cycle**, v. 4, n. 9, p. 1201-1215, 2005.
- AKKIRAJU, S.; KANALA, S. R.; KHATRI, S.; KUTAGULLA, V. K.; MALLELA, V.; PERAMAN, R. Cardioprotective potential of indol-3-carbinol against high salt induced myocardial stress and hypertrophy in Sprague Dawley rats besides molecular docking on muscarinic receptor-2. **Natural Product Research**, v. 36, n. 10, p. 2610-2614, 2021.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, p. 1698-1705, 1970.
- ANDERSSON, K. E. Pharmacology of penile erection. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 3, p. 417–450, 2001.
- ASSIS, K. S.; ARAUJO, I. G.; DE AZEVEDO, F. D. L.; MACIEL, P. M.; MACHADO CALZERRA, N. T.; DA SILVA, T. A., ... & MEDEIROS, I. A. Potassium channel activation is involved in the cardiovascular effects induced by freeze dried *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC fruit juice. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
- BANERJEE, S.; KONG, D.; WANG, Z.; BAO, B.; HILLMAN, G. G.; SARKAR, F. H. Attenuation of multi-targeted proliferation-linked signaling by 3,3'-diindolylmethane (DIM): from bench to clinic. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 728, p. 47-66, 2011.
- BARBA, F. J.; NIKMARAM, N.; ROOHINEJAD, S.; KHELFA, A.; ZHU, Z.; KOUBAA, M. Bioavailability of glucosinolates and their breakdown products: impact of processing. **Frontiers in nutrition**, v. 3, p. 24, 2016.
- BARROSO, W. K. S.; RODRIGUES, C. I. S.; BORTOLOTTO, L. A.; MOTA-GOMES, M. A.; BRANDÃO, A. A.; FEITOSA, A. D. D. M.; ... & NADRUZ, W. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial -2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, p. 516-658, 2021.

BENCZE, M.; BEHULIAK, M.; ZICHA, J. The impact of four different classes of anesthetics on the mechanisms of blood pressure regulation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Physiological research**, v. 62, n. 5, 2013.

BERENDSEN, H. J. C; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer physics communications**, v. 91, n. 1-3, p. 43-56, 1995.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The protein data bank. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BLAZOTTO, K. R.; DE SOUZA MESQUITA, L. M.; NEVES, B. V.; BRAGA, A. R. C.; TANGERINA, M. M. P.; VILEGAS, W., ... & DE ROSSO, V. V. Brazilian biodiversity fruits: discovering bioactive compounds from underexplored sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 7, p. 1860-1876, 2019.

BIOVIA, Dassault Systèmes. Discovery studio visualizer, v20.1.0.19295. **San Diego: Dassault Systèmes**, 2020.

BITENCOURT-FERREIRA, G.; AZEVEDO, W. F. Molegro virtual docker for docking. In: **Docking screens for drug discovery**. Humana, New York, NY, p. 149-167, 2019.

BONDI, A. Van der Waals volumes and radii. **The Journal of physical chemistry**, v. 68, n. 3, p. 441-451, 1964.

BRADLOW, H. L.; MICHNOVICZ, J. J.; HALPER, M.; MILLER, D. G.; WONG, G. Y.; OSBORNE, M. P. Long-term responses of women to indole-3-carbinol or a high fiber diet. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 3, n. 7, p. 591-595, 1994.

BRADLOW, H. L. Indole-3-carbinol as a chemoprotective agent in breast and prostate cancer. **Cancer lett**, v. 22, n. 4, p. 441-445, 2008.

BÜSCHER, R.; HERRMANN, V.; RING, K. M.; KAILASAM, M. T.; O'CONNOR, D. T.; PARMER, R. J.; INSEL, P. A. Variability in phenylephrine response and essential hypertension: a search for human  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor polymorphisms. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 291, n. 2, p. 793-798, 1999.

CALZERRA, N. T. M.; MELO, M. P.; SANTOS, P. F.; ASSIS, K. S.; MACIEL, P. M. P.; VIEIRA, R. L. P.; AZEVEDO, F. L. A. A.; CORDEIRO, A. M. T. M.; MEIRELES, B. R. L. A.; ARAÚJO, I. G. A.; VERAS, R. C.; MEDEIROS, I. A. Cardiovascular protection effect of a Northeastern Brazilian lyophilized red wine in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Functional Foods**, v. 88, p. 104868, 2022.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 30-40, 2001.

CAREY, R. M.; MUNTNER, P.; BOSWORTH, H. B.; WHELTON, P. K. Prevention and control of hypertension: JACC health promotion series. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 71, n. 19, p. 2199-2269, 2018.

CARTA, G.; KNOX, A. J. S.; LLOYD, D. G. Unbiasing scoring functions: a new normalization and rescaling strategy. **Journal of chemical information and modeling**, v. 47, n. 4, p. 1564-1571, 2007.

CARVALHO, A. L. M.; LEOPOLDINO, R. W. D.; SILVA, J. E. G. D.; CUNHA, C. P. D. Adesão ao tratamento medicamentoso em usuários cadastrados no Programa Hiperdia no município de Teresina (PI). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 7, p. 1885-1892, 2012.

CARVALHO, S. H. R.; FERNANDES, G. V. R.; SILVA, F. A. S.; DE PAIVA, N. C. N.; CARNEIRO, C. M.; ISOLDI, M. C.; NATALI, A. J.; LOCATELLI, JAMILLE. Parâmetros histológicos cardíacos e renais de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos ao treinamento em natação. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 32577-32593, 2020.

CASEY JR, D. E.; THOMAS, R. J.; BHALLA, V.; COMMODORE-MENSAH, Y.; HEIDENREICH, P. A.; KOLTE, D.; MUNTNER, P.; SMITH JR, S. C.; SPERTUS, J. A.; WINDLE, J. R.; WOZNIAK, G. D.; ZIAEIAN, B. 2019 AHA/ACC clinical performance and quality measures for adults with high blood pressure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Performance Measures. **Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes**, v. 12, n. 11, p. e000057, 2019.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 4, p. 411-425, 2005.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 8, p. a003947, 2011.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. Voltage-gated calcium channels ( $\text{Ca}_v$ ) in GtoPdb v. 2021.3. **IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE**, v. 2021, n. 3, 2021.

CHEMAXON. MARVIN SKETCH. Disponível em: <https://chemaxon.com/products/marvin>. Acesso em: 18 jul. 2022.

CHEN, X. L.; REMBOLD, C. M. Phenylephrine contracts rat tail artery by one electromechanical and three pharmacomechanical mechanisms. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 268, n. 1, p. H74-H81, 1995.

CHOI, Y.; ABDELMEGEED, M. A.; SONG, B. J. Preventive effects of indole-3-carbinol against alcohol-induced liver injury in mice via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms: Role of gut-liver-adipose tissue axis. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 55, p. 12-25, 2018.

- CHOPRA, H. K.; RAM, C. V. S. Recent guidelines for hypertension: a clarion call for blood pressure control in India. **Circulation research**, v. 124, n. 7, p. 984-986, 2019.
- CIFUENTES, F.; PALACIOS, J.; PAREDES, A. NWOKOCHA, C. R.; PAZ, C. 8-Oxo-9-Dihydromakomakine Isolated from *Aristotelia chilensis* Induces Vasodilation in Rat Aorta: Role of the Extracellular Calcium Influx. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 3050, 2018.
- CORRÊA, N. B.; DE FARIA, A. P.; JÚNIOR, H. M.; MODOLLO, R. Não adesão ao tratamento farmacológico anti-hipertensivo como causa de controle inadequado da hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, p. 58-65, 2016.
- COX, R. H.; HAAS, K. S.; MOISEY, D. M.; TULENKO, T. N. Effects of endothelium regeneration on canine coronary artery function. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 257, n. 5, p. H1681-H1692, 1989.
- CRIBBS, L. T-type calcium channel expression and function in the diseased heart. **Channels**, v. 4, n. 6, p. 447-452, 2010.
- DAMPNEY, R. A. L.; COLEMAN, M. J.; FONTES, M. A. P.; HIROOKA, Y.; HORIUCHI, J.; LI, Y. W.; POLSON, J. W.; POTTS, P. D.; TAGAWA, T. Central mechanisms underlying short-and long-term regulation of the cardiovascular system. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 29, n. 4, p. 261-268, 2002.
- DAVIE, C. S.; KUBO, M.; STANDEN, N. B. Potassium channel activation and relaxation by nicorandil in rat small mesenteric arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 8, p. 1715-1725, 1998.
- DE ALMEIDA SILVA, M.; MOWRY, F. E.; PEADEN, S. C.; ANDRADE, T. U.; BIANCARDI, V. C. Kefir ameliorates hypertension via gut-brain mechanisms in spontaneously hypertensive rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 77, p. 108318, 2020.
- DE AZEVEDO, J.; WALTER, F. MolDock applied to structure-based virtual screening. **Current drug targets**, v. 11, n. 3, p. 327-334, 2010.
- DE BRITO, S. F. L.; SALAZAE, A. S.; DA SILVA JÚNIOR, F. E.; FERNANDER, F. E. O.; CAVALCANTE, C. R. C.; SANTIAGO, R. F., ... & CARVALHO, G. D. Mecanismos de regulação da pressão arterial. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 43969-43986, 2021.
- DE MELLO, W. C. Local renin angiotensin aldosterone systems and cardiovascular diseases. **Medical Clinics**, v. 101, n. 1, p. 117-127, 2017.
- DE PAFFER FILHO, S. H.; DE ARAÚJO, L. B. F.; CAVALCANTE, M. P. S. M.; PAFFER, M. T.; DE ALBUQUERQUE, N. C. F. Tratamento não-farmacológico da hipertensão arterial sistêmica. **ANAIIS DA FACULDADE DE MEDICINA DE OLINDA**, v. 1, n. 2, p. 87-91, 2018.

DEWICK, P. M. Alkaloids. In: **Medicinal Natural Products**. Wiley Online Books, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. 311–420, 2009. DOI: 10.1002/9780470742761.ch6.

DOLPHIN, A. C. A short history of voltage-gated calcium channels. **British journal of pharmacology**, v. 147, n. Suppl 1, p. S56-S62, 2006.

DORIS, P. A. Genetics of hypertension: an assessment of progress in the spontaneously hypertensive rat. **Physiological genomics**, v. 49, n. 11, p. 601-617, 2017.

DORNAS, W. C.; SILVA, M. E. Animal models for the study of arterial hypertension. **Journal of biosciences**, v. 36, n. 4, p. 731-737, 2011.

DUFLOS, A.; KRUCZYNSKI, A.; BARRET, J.-M. Novel aspects of natural and modified vinca alkaloids. **Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents**, v. 2, n. 1, p. 55–70, 2002.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EGAN, B. M.; STEVENS-FABRY, S. Prehypertension—prevalence, health risks, and management strategies. **Nature Reviews Cardiology**, v. 12, n. 5, p. 289-300, 2015.

EHRLICH, B. E.; WATRAS, J. Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. **Nature**, v. 336, n. 6199, p. 583-586, 1988.

EL-NAGA, R. N.; AHMED, H. I.; ABD AL HALEEM, E. N. Effects of indole-3-carbinol on clonidine-induced neurotoxicity in rats: impact on oxidative stress, inflammation, apoptosis and monoamine levels. **Neurotoxicology**, v. 44, p. 48-57, 2014.

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T. P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R. W.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, v. 25, n. 3, p. 533-535, 2000.

EXON, J. H.; SOUTH, H. E. Dietary indole-3-carbinol alters immune functions in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, v. 59, n. 4, p. 271-279, 2000.

FALLON, J. L.; BAKER, M. R.; XIONG, L.; LOY, R. E.; YANG, G.; DIRKSEN, R. T.; HAMILTON, S. L.; QUIOCHE, F. A. Crystal structure of dimeric cardiac L-type calcium channel regulatory domains bridged by  $\text{Ca}^{2+}$ . calmodulins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 13, p. 5135-5140, 2009.

FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the world health organization**, v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985.

FAZAN JR, R.; SILVA, V. J. D.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, p. 19-29, 2001.

FAZAN, V. P.; KALIL, A. L.; ALCÂNTARA, A. C.; GENARI, A. B.; TAVARES, M. R.; RODRIGUES, A. R.; SALGADO, H. C. Ratos espontaneamente hipertensos e neuropatias periféricas. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 39, n. 1, p. 39-50, 2006.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. **Clinical science**, v. 117, n. 4, p. 139-155, 2009.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. **Current hypertension reports**, v. 12, n. 4, p. 267-275, 2010.

FENG, T.; KALYAANAMOORTHY, S.; BARAKAT, K. L-type calcium channels: structure and functions. **Ion Channels in Health and Sickness**, v. 77305, 2018.

FERREIRA, S. H.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. **Nature: New Biology**, v. 231, n. 25, p. 237-239, 1971.

FIRMO, J. O. A.; PEIXOTO, S. V.; LOYOLA FILHO, A. I. D.; SOUZA-JÚNIOR, P. R. B. D.; ANDRADE, F. B. D.; LIMA-COSTA, M. F.; MAMBRINI, J. V. D. M. Comportamentos em saúde e o controle da hipertensão arterial: resultados do ELSI-BRASIL. **Cadernos de saúde pública**, v. 35, n. 7, p. e00091018, 2019.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **The FASEB Journal**, v. 3, n. 9, p. 2007-2018, 1989.

GEHRCKE, Mailine. **Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo Indol-3-Carbinol e avaliação biológica das formulações**. 2016. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 2016.

GODFRAIND, T. Calcium channel blockers in cardiovascular pharmacotherapy. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, v. 19, n. 6, p. 501-515, 2014.

GRADMAN, A. H.; BASILE, J. N.; CARTER, B. L.; BAKRIS, G. L.; AMERICAN SOCIETY OF HYPERTENSION WRITING GROUP. Combination therapy in hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 4, n. 1, p. 42-50, 2010.

GRUBBS, C. J.; STEELE, V. E.; CASEBOLT, T.; JULIANA, M. M.; ETO, I.; WHITAKER, L. M., DRAGNEV, K. H.; KELLOFF, G. J.; LUBET, R. L. Chemoprevention of chemically-induced mammary carcinogenesis by indole-3-carbinol. **Anticancer research**, v. 15, n. 3, p. 709-716, 1995.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, p. 119-136, 2017.

GUPTA, A.; CHAUDHARY, N.; KAKULARAM, K. R.; PALLU, R.; POLAMARASSETTY, A. The augmenting effects of desolvation and conformational energy terms on the predictions of docking programs against mPGES-1. **PLoS one**, v. 10, n. 8, p. e0134472, 2015.

GUYTON; HALL. **Tratado de fisiología médica**. 14 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2021.

HASAN, H.; ISMAIL, H.; EL-ORFALI, Y.; KHAWAJA, G. Therapeutic benefits of Indole-3-Carbinol in adjuvant-induced arthritis and its protective effect against methotrexate induced-hepatic toxicity. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 337, 2018.

HAUBRICH, D. R.; WARD, S. J.; BAIZMAN, E.; BELL, M. R.; BRADFORD, J.; FERRARI, R.; MILLER, M.; PERRONE, M.; PIERSON, A. K.; SAELENS, J. K. Pharmacology of pravadolone: a new analgesic agent. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 255, n. 2, p. 511–522, 1990.

HEHRE, W.; OHLINGER, S. Spartan'14 for Windows, Macintosh and Linux, Tutorial and User's Guide; **Wavefunction Inc.**: Irvine, CA, USA, 2014.

HESS, P.; LANSMAN, J. B.; TSIEN, R. W. Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. **Nature**, v. 311, n. 5986, p. 538-544, 1984.

HOCKERMAN, G.; PETERSON, B. Z.; JOHNSON, B. D.; CATTERALL, W. A. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 37, n. 1, p. 361-396, 1997.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. **Natural product reports**, v. 21, n. 3, p. 425-447, 2004.

HONG, C.; KIM, H. A.; FIRESTONE, G. L.; BJELDANES, L. F. 3,3'-Diindolylmethane (DIM) induces a G1 cell cycle arrest in human breast cancer cells that is accompanied by Sp1-mediated activation of p21WAF1/CIP1 expression. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 8, p. 1297-1305, 2002.

IBRAHIM, M. M.; DAMASCENO, A. Hypertension in developing countries. **The Lancet**, v. 380, n. 9841, p. 611-619, 2012.

JAMES, P. A.; OPARIL, S.; CARTER, B. L.; CUSHMAN, W. C.; DENNISON-HIMMELFARB, C.; HANDLER, J., ... & ORTIZ, E. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **Jama**, v. 311, n. 5, p. 507-520, 2014.

JIN, X.; SATOH-OTONASHI, Y.; ZAMAMI, Y.; TAKATORI, S.; HASHIKAWA-HOBARA, N.; KITAMURA, Y.; KAWASAKI, H. New molecular mechanisms for cardiovascular disease: contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of vasoconstriction in peripheral resistance arteries. **Journal of pharmacological sciences**, v. 116, n. 4, p. 332-336, 2011.

JOSEPH, B. K.; THAKALI, K. M.; MOORE, C. L.; RHEE, S. W. Ion channel remodeling in vascular smooth muscle during hypertension: Implications for novel therapeutic approaches. **Pharmacological research**, v. 70, p. 126-138, 2013.

JULIÃO, N. A.; SOUZA, A.; GUIMARÃES, R. R. M. Tendências na prevalência de hipertensão arterial sistêmica e na utilização de serviços de saúde no Brasil ao longo de uma década (2008-2019). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, p. 4007-4019, 2021.

JULLIARD, W.; JULLIARD, W.; DE WOLFE, T.; FECHNER, J. H.; SAFDAR, N.; AGNI, R.; MEZRICH, J. D. Amelioration of *Clostridium difficile* disease in mice by dietary supplementation with indole-3-carbinol. **Annals of surgery**, v. 265, n. 6, p. 1183, 2017.

KARNIK, S. S.; UNAL, H.; KEMP, J. R.; TIRUPULA, K. C.; EGUCHI, S.; VANDERHEYDEN, P. M.; THOMAS, W. G. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin receptors: interpreters of pathophysiological angiotensinergic stimuli. **Pharmacological reviews**, v. 67, n. 4, p. 754-819, 2015.

KATZ, E.; NISANI, S.; CHAMOVITZ, D. A. Indole-3-carbinol: a plant hormone combatting cancer. **F1000Research**, v. 7, 2018.

KHOR, S.; CAI, D. Hypothalamic and inflammatory basis of Hypertension. **Clinical Science**, v. 131, n. 3, p.211-223, 2017.

KIRCHHEIM, H. R. Systemic arterial baroreceptor reflexes. **Physiological reviews**, v. 56, n. 1, p. 100-177, 1976.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy – Fisiologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

KRISTAL, A. R.; LAMPE, J. W. Brassica vegetables and prostate cancer risk: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and cancer**, v. 42, n. 1, p. 1-9, 2002.

KUMADA, M.; TERUI, N.; KUWAKI, T. Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. **Progress in neurobiology**, v. 35, n. 5, p. 331-361, 1990.

KUNDU, A.; QUIRIT, J. G.; KHOURI, M. G.; FIRESTONE, G. L. Inhibition of oncogenic BRAF activity by indole-3-carbinol disrupts microphthalmia-associated transcription factor expression and arrests melanoma cell proliferation. **Molecular carcinogenesis**, v. 56, n. 1, p. 49-61, 2017.

LACINOVÁ, L. Voltage-dependent calcium channels. **General physiology and biophysics**, v. 24, p. 1-78, 2005.

LAW M. R., WALD N. J., MORRIS J. K., JORDAN R. E. Value of low dose combination treatment with blood pressure lowering drugs: analysis of 354 randomised trials. **BMJ**, v. 326, n. 7404, p.1427, 2003.

LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology**, v. 21, n. 1, p. 69-78, 2006.

LEE, J. Y.; LIM, H. M.; LEE, C. M.; PARK, S. H.; NAM, M. J. Indole-3-carbinol inhibits the proliferation of colorectal carcinoma LoVo cells through activation of the apoptotic signaling pathway. **Human & Experimental Toxicology**, v. 40, n. 12, p. 2099-2112, 2021.

LEONG, X.-F.; NG, C.-Y.; JAARIN, K. Animal models in cardiovascular research: hypertension and atherosclerosis. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

LI, B.; CONG, M.; ZHU, Y.; XIONG, Y.; JIN, W.; WAN, Y.; ZHOU, Y.; AO, Y.; WANG, H. Indole-3-carbinol induces apoptosis of hepatic stellate cells through K63 deubiquitination of RIP1 in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 1481-1490, 2017.

LI, Y.; KONG, D.; FU, Y.; SUSSMAN, M. R.; WU, H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80-89, 2020.

LICZNERSKA, B.; BAER-DUBOWSKA, W. Indole-3-carbinol and its role in chronic diseases. **Anti-inflammatory Nutraceuticals and Chronic Diseases**. Springer, Cham, p. 131-154, 2016.

LIM, H. M.; PARK, S. H.; NAM, M. J. Induction of apoptosis in indole-3-carbinol-treated lung cancer H1299 cells via ROS level elevation. **Human & Experimental Toxicology**, v. 40, n. 5, p. 812-825, 2021.

LOH, Y. C.; TAN, C. S.; CH'NG, Y. S.; YEAP, Z. Q.; NG, C. H.; YAM, M. F. Overview of the microenvironment of vasculature in vascular tone regulation. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 120, 2018.

LV, G. Y.; ZHANG, Y. P.; GAO, J. L.; YU, J. J.; LEI, J.; ZHANG, Z. R.; LI, B.; ZHAN, R. J.; CHEN, S. H. Combined antihypertensive effect of luteolin and buddleioside enriched extracts in spontaneously hypertensive rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 507-513, 2013.

MACHADO, N. T.; MACIEL, P. M.; ALUSTAU, M. C.; QUEIROZ, T. M.; FURTADO, F. F.; ASSIS, V. L.; VERAS, R. C.; ARAÚJO, I. G.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; MEDEIROS, I. A. Nitric oxide as a target for the hypotensive and vasorelaxing effects induced by (Z)-ethyl 12-nitrooxy-octadec-9-enoate in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, p. 317-325, 2014.

MACHADO-CALZERRA, Natália Tabosa. **LIOFILIZADO DO VINHO TINTO DO VALE DO RIO SÃO FRANCISCO REDUZ O ESTRESSE OXIDATIVO E MELHORA AS**

**ALTERAÇÕES VASCULARES, CARDÍACAS E PLAQUETÁRIAS EM MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO.** 2017. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

MACHHOLZ, E.; MULDER, G.; RUIZ, C.; CORNING, B. F. PRITCHETT-CORNING, K. R. Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 67, p. 900-911, 2012.

MACHIJIMA, Y.; ISHIKAWA, C.; SAWADA, S.; OKUDAIRA, T.; UCHIHARA, J. N.; TANAKA, Y.; TAIRA, N.; MORI, N. Anti-adult T-cell leukemia/lymphoma effects of indole-3-carbinol. **Retrovirology**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2009.

MAGDER, S. The meaning of blood pressure. **Critical Care**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2018.

MALACHIAS, M. V. B.; SOUZA, W. K. S. B.; PLAVNIK, F. L.; RODRIGUES, C. I. S.; BRANDÃO, A. A.; NEVES, M. F. T.; BORTOLOTTO, L. A.; FRANCO, R. J. S.... & MORENO JÚNIOR, H. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 1-83, 2016.

MANCIA, G.; REA, F.; CORRAO, G.; GRASSI, G. Two-drug combinations as first-step antihypertensive treatment. **Circulation Research**, v. 124, n. 7, p. 1113-1123, 2019.

MAROM, M.; HAGALILI, Y.; SEBAG, A.; TZVIER, L.; ATLAS, D. Conformational changes induced in voltage-gated calcium channel Cav1.2 by BayK 8644 or FPL64176 modify the kinetics of secretion independently of  $\text{Ca}^{2+}$  influx. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 6996-7005, 2010.

MARTINS, J. D. N.; SARDINHA, D. M.; DA SILVA, R. R.; LIMA, K. V. B.; LIMA, L. N. G. C. As implicações da COVID-19 no sistema cardiovascular: prognóstico e intercorrências. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2020.

MASCARENHAS, C. H. M. Adesão ao tratamento no grupo de hipertensos do bairro Joaquim Romão-Jequié/BA. **Revista Saúde.com**, v. 2, n. 1, p. 30-38, 2006.

MAYET, J.; HUGHES, A. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. **Heart**, v. 89, n. 9, p. 1104-1109, 2003.

MCFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **British journal of pharmacology**, v. 135, n. 1, p. 1-13, 2002.

MILLS, K. T.; STEFANESCU, A.; HE, J. The global epidemiology of hypertension. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 4, p. 223-237, 2020.

MIN, S.; CHANG, R. B.; PRESCOTT, S. L.; BEELER, B.; JOSHI, N. R.; STROCHLIC, D. E.; LIBERLES, S. D. Arterial baroreceptors sense blood pressure through decorated aortic claws. **Cell reports**, v. 29, n. 8, p. 2192-2201. e3, 2019.

MOHAMMADI, S.; SEYEDHOSSEINI, F. S.; BEHNAMPOUR, N.; YAZDANI, Y. Indole-3-carbinol induces G1 cell cycle arrest and apoptosis through aryl hydrocarbon

receptor in THP-1 monocytic cell line. **Journal of receptors and signal transduction**, v. 37, n. 5, p. 506-514, 2017.

Molexus Computational Drug Discovery. Molegro Virtual Docker User Manual - MVD 2019.7.0. **Copyr. Molexus**, p. 1-239, 2019.

MONDAL, A.; GANDHI, A.; FIMOGNARI, C.; ATANASOV, A. G.; BISHAYEE, A. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. **European journal of pharmacology**, v. 858, p. 172472, 2019.

MORAES, R. D. A.; ALVES, Q. L.; CAMARGO, S. B.; MEDEIROS, C. F. D. A.; JESUS, A. D. M.; DA HORA, V. R. S.; STIZ, D. S.; CORRÊA, R.; CECHINEL-FILHO, V.; SILVA, D. F. Itaconimides derivatives induce relaxation in mesenteric artery and negative inotropism by inhibition of CA<sup>2+</sup> influx. **Pharmacological Reports**, v. 72, n. 4, p. 890-902, 2020.

MOTA, L. P.; DE SOUSA, M. V. A.; ARAÚJO, E. B.; SILVA, I. M. B.; DE OLIVEIRA, S. A.; DE ARAÚJO, G. L., ... & DE CARVALHO NETO, A. L. Correlação da Infecção por SARS-CoV-2 com o Sistema Cardiovascular. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e15311326252, 2022.

MOURA, I. H.; VIEIRA, E. E. S.; SILVA, G. R. F.; CARVALHO, R. B. N.; SILVA, A. R. V. Prevalência de hipertensão arterial e seus fatores de risco em adolescentes. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 28, p. 81-86, 2015.

NAGHAVI, M.; ABAJOBIR, A. A.; ABBAFATI, C.; ABBAS, K. M.; ABD-ALLAH, F.; ABERA, S. F., ... & FISCHER, F. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1151-1210, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 27, n. 3, p. 282-293, 1963.

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; MAFRA, R. A.; ARAÚJO, D. A.; CRUZ, J. S.; MEDEIROS, I. A. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14 labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vascular Pharmacology**, v. 44, p. 338-344, 2006.

OLIVEIRA, G. M. M. D.; MENDES, M.; MALACHIAS, M. V. B.; MORAIS, J.; MOREIRA, O.; COELHO, A. S., ... & FERNANDES, M. 2017 guidelines for arterial hypertension management in primary health care in Portuguese language countries. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, p. 389-396, 2017.

ONG, J. J. Y.; DE FELICE, M. Migraine treatment: current acute medications and their potential mechanisms of action. **Neurotherapeutics**, v. 15, n. 2, p. 274-290, 2018.

PAIK, W. H.; KIM, H. R.; PARK, J. K.; SONG, B. J.; LEE, S. H.; HWANG, J. H. Chemosensitivity induced by down-regulation of microRNA-21 in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells by indole-3-carbinol. **Anticancer research**, v. 33, n. 4, p. 1473-1481, 2013.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; MENG, E. C.; COUCH, G. S.; CROLL, T. I.; MORRIS, J. H.; FERRIN, T. E. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70-82, 2021.

PIJACKA, W.; MORAES, D. J. A.; RATCLIFFE, L. E. K.; NIGHTINGALE, A. K., HART, E. C.; DA SILVA, M. P.; MACHADO, B. H.; MCBRYDE, F. D.; ABDALA, A. P.; FORD, A. P.; PATON, J. F. R. Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. **Nature medicine**, v. 22, n. 10, p. 1151-1159, 2016.

PIKE, E.; FAGERLUND, B. C.; GISKE, L.; DESSER, A.; HARBOE, I. Baroreflex activation therapy for drug-resistant hypertension. A single technology assessment from Norwegian Institute of Public Health (Folkehelseinstituttet). Oslo: Norwegian Institute of Public Health, 2017.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

POULTER, N. R.; PRABHAKARAN, D.; CAULFIELD, M. Hypertension. **Lancet**, v. 386, p. 801-812, 2015.

PÓVOA, R.; BARROSO, W. S.; BRANDÃO, A. A.; JARDIM, P. C. V.; BARROSO, O.; PASSARELLI JR, O., ... & SANJULIANI, A. F. I Brazilian position paper on antihypertensive drug combination. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 102, n. 3, p. 203-210, 2014.

PRADO, N. J.; RAMIREZ, D.; MAZZEI, L.; PARRA, M.; CASAROTTO, M.; CALVO, J. P.; CARRIÓN, D. C.; ZUMINO, A. Z. P.; DIEZ, E. R.; CAMARGO, A.; MANUCHA, W. Anti-inflammatory, antioxidant, antihypertensive, and antiarrhythmic effect of indole-3-carbinol, a phytochemical derived from cruciferous vegetables. **Heliyon**, v. 8, n. 2, p. e08989, 2022.

PUPPIN, A. A.; DA SILVA, C. L.; RONCHI, S. N.; DE ALMEIDA SILVA, M.; DE LIMA, E. M.; DE OLIVEIRA, B. G.; ROMÃO, W.; BISSOLI, N. S.; DE ANDRADE, T. U.; ENDRINGER, D. C.; BRASIL, G. A. Chronic treatment with juçara (*Euterpe edulis*) fruit pulp produces antihypertensive effect and improve on baroreflex sensitivity in Spontaneous Hypertensive Rats (SHR). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e5711728995, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i7.28995>

REED, G. A.; PETERSON, K. S.; SMITH, H. J.; GRAY, J. C.; SULLIVAN, D. K.; MAYO, M. S.; CROWELL, J. A.; HURWITZ, A. A phase I study of indole-3-carbinol in women: tolerability and effects. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 14, n. 8, p. 1953-1960, 2005.

ROMERO, F.; PALACIOS, J.; JOFRÉ, I.; PAZ, C.; NWOKOCHA, C. R.; PAREDES, A.; CIFUENTES, F. Aristoteline, an indole-alkaloid, induces relaxation by activating potassium channels and blocking calcium channels in isolated rat aorta. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2748, 2019.

SAFA, M.; TAVASOLI, B.; MANAFI, R.; KIANI, F.; KASHIRI, M.; EBRAHIMI, S.; KAZEMI, A. Indole-3-carbinol suppresses NF- $\kappa$ B activity and stimulates the p53 pathway in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. **Tumor Biology**, v. 36, n. 5, p. 3919-3930, 2015.

SAINI, N.; AKHTAR, A.; CHAUHAN, M.; DHINGRA, N.; SAH, S. P. Protective effect of indole-3-carbinol, an NF- $\kappa$ B inhibitor in experimental paradigm of Parkinson's disease: In silico and in vivo studies. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 90, p. 108-137, 2020.

SANG, Y. L.; ZHANG, W. M.; LV, P. C.; ZHU, H. L. Indole-based, antiproliferative agents targeting tubulin polymerization. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 17, n. 2, p. 120-137, 2017.

SAUGEL, B.; KOUZ, K.; SCHEEREN, T. W.; GREIWE, G.; HOPPE, P.; ROMAGNOLI, S.; DE BACKER, D. Cardiac output estimation using pulse wave analysis—physiology, algorithms, and technologies: a narrative review. **British journal of anaesthesia**, v. 126, n. 1, p. 67-76, 2021.

SAVALLI, N.; PANTAZIS, A.; SIGG, D.; WEISS, J. N.; NEELY, A.; OLCESE, R. The  $\alpha_2\delta$ -1 subunit remodels Cav1.2 voltage sensors and allows  $\text{Ca}^{2+}$  influx at physiological membrane potentials. **Journal of General Physiology**, v. 148, n. 2, p. 147-159, 2016.

SCALA, L. C.; MAGALHÃES, L. B.; MACHADO, A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. **Moreira SM, Paola AV; Sociedade Brasileira de Cardiologia. Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. 2<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Manole, p. 780-5, 2015.

SCHLÜTER, K. D.; SCHRECKENBERG, R.; DA COSTA REBELO, R. M. Interaction between exercise and hypertension in spontaneously hypertensive rats: a meta-analysis of experimental studies. **Hypertension Research**, v. 33, n. 11, p. 1155-1161, 2010.

SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R.; FRANCKOWIAK, G. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels. **Nature**, v. 303, p. 535-537, 1983.

SENGUPTA, S.; WEST, K. O.; SANGHVI, S.; LALIOTIS, G.; AGOSTO, L. M.; LYNCH, K. W.; TSICHLIS, P. N.; SINGH, H.; PATRICK, K. L.; GUERAU-DE-ARELLANO, M. PRMT5 promotes symmetric dimethylation of RNA processing proteins and modulates

activated T cell alternative splicing and Ca<sup>2+</sup>/NFAT signaling. **Immunohorizons**, v. 5, n. 10, p. 884-897, 2021.

SETO, S. L.; BARRA, M. E.; HAMIDI, A.; SIN, J. H.; DEVINE, L. T. Efficacy and Safety of Immediate-Release Nifedipine in Critically Ill Patients. **Journal of Pharmacy Practice**, p. 08971900221074953, 2022.

SHAH, K.; SEELEY, S.; SCHULZ, C.; FISHER, J.; GURURAJA RAO, S. Calcium channels in the heart: Disease states and drugs. **Cells**, v. 11, n. 6, p. 943, 2022.

SHERER, C.; TOLAYMAT, I.; ROWTHER, F.; WARR, T.; SNAPE, T. J. Preliminary SAR on indole-3-carbinol and related fragments reveals a novel anticancer lead compound against resistant glioblastoma cells. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 7, p. 1561-1565, 2017.

SHERTZER, H. G.; BERGER, M. L.; TABOR, M. Wilson. Intervention in free radical mediated hepatotoxicity and lipid peroxidation by indole-3-carbinol. **Biochemical pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 333-338, 1988.

SHERTZER, H. G.; SENFT, A. P. The micronutrient indole-3-carbinol: implications for disease and chemoprevention. **Drug metabolism and drug interactions**, v. 17, n. 1-4, p. 159-188, 2000.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 7 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2017.

SINGH, T. P.; SINGH, O. M. Recent progress in biological activities of indole and indole alkaloids. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 9-25, 2018.

SINGH, A. A.; PATIL, M. P.; KANG, M. J.; NIYONIZIGIYE, I.; KIM, G. D. Biomedical application of indole-3-carbinol: A mini-review. **Phytochemistry Letters**, v. 41, p. 49-54, 2021a.

SINGH, H. Mitochondrial ion channels in cardiac function. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 321, n. 5, p. C812-C825, 2021b.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159, n. 1, p. 129-145, 1968.

SOUSA, Natália Ferreira. **Triagem virtual de selenoetilenolácticamidas e nariopropanamidas com potencial atividade antileishmania**. 2020.

SYED, A. U.; LE, T.; NAVEDO, M. F.; NIEVES-CINTRÓN, M. Ion Channels and Their Regulation in Vascular Smooth Muscle. In: **Basic and Clinical Understanding of Microcirculation**. IntechOpen, 2019.

TANAKA, Y.; MOCHIZUKI, Y.; TANAKA, H.; SHIGENOBU, K. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of

rat mesenteric artery. **British journal of pharmacology**, v. 128, n. 7, p. 1602-1608, 1999.

TANG, L.; GAMAL EL-DIN, T. M.; PAYANDEH, J.; MARTINEZ, G. Q.; HEARD, T. M.; SCHEUER, T.; ZHENG, N.; CATTERALL, W. A. Structural basis for  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity of a voltage-gated calcium channel. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 56-61, 2014.

TANG, L.; GAMAL EL-DIN, T. M.; SWANSON, T. M.; PRYDE, D. C; SCHEUER, T.; ZHENG, N.; CATTERALL, W. A. Structural basis for inhibition of a voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel by  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist drugs. **Nature**, v. 537, n. 7618, p. 117-121, 2016.

Task Force of the Latin American Society of Hypertension. Guidelines on the management of arterial hypertension and related comorbidities in Latin America. **Journal of Hypertension**, v. 35, n. 8, p. 1529–1545, 2017.

TAYLOR-HARDING, B.; AGADJANIAN, H.; NASSANIAN, H.; KWON, S.; GUO, X.; MILLER, C.; KARLAN, B. Y.; ORSULIC, S.; WALSH, C. S. Indole-3-carbinol synergistically sensitises ovarian cancer cells to bortezomib treatment. **British journal of cancer**, v. 106, n. 2, p. 333-343, 2012.

TEIXEIRA, C. E.; PRIVIERO, F. B. M.; WEBB, R. C. Molecular mechanisms underlying rat mesenteric artery vasorelaxation induced by the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulators BAY 41-2272 [5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo [3, 4-b] pyridin-3-yl] pyrimidin-4-ylamine] and YC-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl Indazole]. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 317, n. 1, p. 258-266, 2006.

THAWABTEH, A.; JUMA, S.; BADER, M.; KARAMAN, D.; SCRANO, L.; BUFO, S. A.; KARAMAN, R. The biological activity of natural alkaloids against herbivores, cancerous cells and pathogens. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 656, 2019.

THOMFORD, N. E.; SENTHEBANE, D. A.; ROWE, A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; MAROYI, A.; DZOBO, K. Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, 2006.

TIN, A. S.; PARK, A. H.; SUNDAR, S. N.; FIRESTONE, G. L. Essential role of the cancer stem/progenitor cell marker nucleostemin for indole-3-carbinol anti-proliferative responsiveness in human breast cancer cells. **BMC biology**, v. 12, n. 1, p. 1-22, 2014.

TRIPATHI, A.; MISRA, K. Molecular docking: a structure-based drug designing approach, **JSM Chem**, v.5, n.2, p. 1042, 2017.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90 (1 suplemento 1), p. 763–778, 2018.

VAN PETEGEM, F.; MINOR JR, D. L. The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation. 2006.

VAN THIEL, B. S.; VAN DER PLUIJM, I.; TE RIET, L.; ESSERS, J.; DANSER, A. J. The renin–angiotensin system and its involvement in vascular disease. **European journal of pharmacology**, v. 763, p. 3-14, 2015.

VERAS, R.; SILVA, D. F.; BEZERRA, L. S.; ASSIS, V. L. D.; VASCONCELOS, W. P. D.; ALUSTAU, M. D. C., ... & MEDEIROS, I. A. N-Salicyloyltryptamine, an N-Benzoyltryptamine Analogue, Induces Vasorelaxation through Activation of the NO/sGC Pathway and Reduction of Calcium Influx. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 253, 2018.

WALD, D. S.; LAW, M.; MORRIS, J. K.; BESTWICK, J. P.; WALD, N. J. Combination therapy versus monotherapy in reducing blood pressure: meta-analysis on 11,000 participants from 42 trials. **The American Journal of Medicine**, v. 122, n. 3, p. 290-300, 2009.

WANG, J.; JIANG, Y. F. Natural compounds as anticancer agents: Experimental evidence. **World journal of experimental medicine**, v. 2, n. 3, p. 45, 2012.

WANG, G.; ZHU, W. Molecular docking for drug discovery and development: a widely used approach but far from perfect. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 14, p. 1707-1710, 2016.

WANG, A. L.; IADECOLA, C.; WANG, G. New generations of dihydropyridines for treatment of hypertension. **Journal of geriatric cardiology: JGC**, v. 14, n. 1, p. 67, 2017.

WANG, X.; ZHANG, L.; DAI, Q.; SI, H.; ZHANG, L.; ELTOM, S. E.; SI, H. Combined Luteolin and Indole-3-Carbinol Synergistically Constrains ER $\alpha$ -Positive Breast Cancer by Dual Inhibiting Estrogen Receptor Alpha and Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Pathway in Cultured Cells and Xenograft Mice. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2116, 2021.

WEBER, M. A.; SCHIFFRIN, E. L.; WHITE, W. B.; MANN, S., LINDHOLM, L. H., KENERSON, J. G., ... & HARRAP, S. B. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. **The journal of clinical hypertension**, v. 16, n. 1, p. 14-26, 2014.

WHELTON, P. K.; CAREY, R. M.; ARONOW, W. S.; CASEY JR., D. E.; COLLINS, K. J.; HIMMELFARB, C. D. et al. 2017 Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation and Management of High Blood Pressure in Adults. **Journal of the American College of Cardiology**, 23976, 2017.

WICHA, P.; ONSA-ARD, A.; CHAICHOMPOO, W.; SUKSAMRARN, A.; TOCHARUS, C. Vasorelaxant and antihypertensive effects of neferine in rats: an in vitro and in vivo study. **Planta Medica**, v. 86, n. 07, p. 496-504, 2020.

WILLIAMS, B.; MANCIA, G.; SPIERING, W.; AGABITI ROSEI, E.; AZIZI, M.; BURNIER, M., ... & DESORMAIS, I. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). **European heart journal**, v. 36, n. 10, p. 1953-2041, 2018.

WILLIAMS, D. E. Indoles Derived From Glucobrassicin: Cancer Chemoprevention by Indole-3-Carbinol and 3,3'-Diindolylmethane. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis: World Health Day 2013**. 2013. World Health Organization, 2013. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/a-global-brief-on-hypertension-silent-killer-global-public-health-crisis-world-health-day-2013>. Acesso em: 29 jul. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cardiovascular Diseases (CVDs)**. 2021. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em: 29 jul. 2022.

WU, C. H.; MOHAMMADMORADI, S.; CHEN, J. Z.; SAWADA, H.; DAUGHERTY, A.; LU, H. S. Renin-angiotensin system and cardiovascular functions. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 38, n. 7, p. e108-e116, 2018.

WU, Y.; LI, R. W.; HUANG, H.; FLETCHER, A.; YU, L.; PHAM, Q.; YU, L.; HE, Q.; WANG, T. T. Y. Inhibition of tumor growth by dietary indole-3-carbinol in a prostate cancer xenograft model may be associated with disrupted gut microbial interactions. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 467, 2019.

WU, W.; ZHANG, Z.; LI, F.; DENG, Y.; LEI, M.; LONG, H.; HOU, J.; WU, W. A network-based approach to explore the mechanisms of *Uncaria* alkaloids in treating hypertension and alleviating Alzheimer's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1766, 2020.

XU, L.; SUN, L.; XIE, L.; MOU, S.; ZHANG, D.; ZHU, J.; XU, P. Advances in L-Type Calcium Channel Structures, Functions and Molecular Modeling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 514-524, 2021.

YANG, M. H.; KIM, J.; KHAN, I. A.; WALKER, L. A.; KHAN, S. I. Nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene-1 (NAG-1) modulators from natural products as anti-cancer agents. **Life sciences**, v. 100, n. 2, p. 75-84, 2014.

YAXLEY, J. P.; THAMBAR, S. V. Resistant hypertension: an approach to management in primary care. **Journal of family medicine and primary care**, v. 4, n. 2, p. 193, 2015.

YOUNG, D. Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems; **Wiley-Interscience**: New York, NY, USA, 2001.

YUGAR-TOLEDO, J. C.; MORENO JUNIOR, H.; GUS, M.; ROSITO, G. B. A.; SCALA, L. C. N.; MUXFELDT, E. S., ... & JARDIM, T. D. S. V. Brazilian Position Statement on

Resistant Hypertension–2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 114, n. 3, p. 576-596, 2020.

YUN, W. J.; ZHANG, X. Y.; LIU, T. T.; LIANG, J. H.; SUN, C. P.; YAN, J. K.; HUO, X. K.; TIAN, X. G.; ZHANG, B. J.; HUANG, H. L.; MA, X. C. The inhibition effect of uncarialin A on voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C: inhibition potential and molecular stimulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 1022-1030, 2020.

ZAMPONI, G. W.; STRIESSNIG, J.; KOSCHAK, A.; DOLPHIN, A. C. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. **Pharmacological reviews**, v. 67, n. 4, p. 821-870, 2015.

ZHAO, Y.; ZHU, Q.; SUN, S.; QIU, Y.; LI, J.; LIU, W.; YUAN, G.; MA, H. Renal transplantation increases angiotensin II receptor-mediated vascular contractility associated with changes of epigenetic mechanisms. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 4, p. 2375-2388, 2018.

# Anexos

## Anexos

### Anexo 1 – Certidão de aprovação da CEUA-UFPB 056/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



#### CERTIFICADO (2<sup>a</sup> VIA)

Certificamos que o projeto intitulado "CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO VASORRELAXANTE DO INDOL-3-CARBINOL EM ARTÉRIA MESENTÉRICA DE RATO" protocolo nº 056/2016 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2017 - 2018
Espécie/linhagem	Rato Wistar
Número de animais	22 animais
Idade/peso	12 semanas / 250-300 g
Sexo	Machos
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra  
CEUA-UFPB

## Anexo 2 – Certidão de aprovação da CEUA-UFPB 4234221121



Universidade  
Federal da  
Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

REITORIA



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos hipotensor e vasorrelaxante do indol-3-carbinol e de seu metabólito principal 3,3'-diindolilmetano em ratos: o papel dos canais para cálcio", protocolada sob o CEUA nº 4234221121 (nº 001632), sob a responsabilidade de **Islania Gisella Albuquerque Gonçalves** e equipe; **Isac Almeida de Medeiros**; **Alinne Villar de Arruda** - 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 da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 13/05/2022.

We certify that the proposal "Evaluation of the hypotensive and vasorelaxant effects of indole-3-carbinol and its main metabolite 3,3'-diindolylmethane in rats: the role of calcium channels", utilizing 48 Heterogenics rats (48 males), protocol number CEUA 4234221121 (nº 001632), under the responsibility of **Islania Gisella Albuquerque Gonçalves** and team; **Isac Almeida de Medeiros**; **Alinne Villar de Arruda** - 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 Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/13/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **07/2022** a **12/2024** Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem:	<b>Biotério José Paulino</b>	sex:	<b>Machos</b>	idade:	<b>12 a 12 semanas</b>	N:	<b>48</b>
Espécie:	<b>Ratos heterogênicos</b>						
Linhagem:	<b>Rattus Norvegicus - Wistar</b>						

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia Cardiovascular/PeFarM/UFPB

João Pessoa, 13 de maio de 2022

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivia Carmem Talleri  
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

**Anexo 3 – Declaração de aprovação da CEUA-UFPB 066/2017**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

**DECLARAÇÃO**

Declaramos para os devidos fins que o projeto intitulado “ANÁLISE DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO INDOL-3-CARBINOL EM DOENÇAS CARDIOVASCULARES”, protocolo nº 066/2017 foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) na 9ª Reunião Ordinária do ano de 2017 ocorrida em 24 de maio de 2017.

João Pessoa - PB, 29 de maio de 2017.

Profa. Dra. Islânia Giselia Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da CEUA-UFPB