



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

MICKAEL SOUSA DA LUZ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BORNEOL SOBRE A MODULAÇÃO
AUTONÔMICA DA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS NORMOTENSOS E COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

JOÃO PESSOA - PB

2021

MICKAEL SOUSA DA LUZ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BORNEOL SOBRE A MODULAÇÃO
AUTONÔMICA DA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS NORMOTENSOS E COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal da Paraíba como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Profª. Drª. Maria do Socorro de França Falcão

**JOÃO PESSOA - PB
2021**



**Ata de Defesa Pública de Dissertação de
Mestrado** do Programa de Pós-Graduação
Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da
Associada Universidade Federal da Paraíba,
realizada em 26 de fevereiro de 2021

Ao dia 26 de fevereiro de 2021, às 14h (horário local), foi realizada remotamente através da plataforma *Google Meet*, a defesa pública da Dissertação de Mestrado do discente **Mickael Sousa da Luz**, com o trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BORNEOL SOBRE A MODULAÇÃO AUTONÔMICA DA PRESSÃO ARTERIAL DE RATOS NORMOTENSOS E COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR”**. A banca examinadora foi constituída pela supervisora Profa. Dra. Camille M. Balarini (UFPB) na qualidade de presidente da banca, pelo 1º examinador (examinador externo) Prof. Dr. Gustavo R. Pedrino (UFG), 2º examinadora (examinador interno) Profa. Dra. Josiane de Campos Cruz (UFPB) e contou com a presença da orientadora Profa. Dra. Maria do Socorro de França Falcão (UFPB). Após a apresentação pública do trabalho, iniciou-se a arguição do candidato por cada membro da banca examinadora, tendo o candidato o mesmo tempo para responder a cada questionamento. Na sequência, a banca examinadora se reuniu em caráter sigiloso e considerou o candidato **APROVADO**. Em acordo com o Artigo 98 §1 §2 da Resolução 35/2019 do CONSEPE, o discente terá até 60 (sessenta) dias, a partir da presente data, para fazer as correções solicitadas pela banca examinadora e entregar as cópias corrigidas da dissertação à Biblioteca Central da UFPB e à secretaria deste programa, contendo obrigatoriamente a ficha catalográfica fornecida pela Biblioteca Central da UFPB.

Prof Dr. Gustavo R. Pedrino

Prof. Dr. Josiane C. Cruz

Camille M. Balarini
Profa. Dra. Camille M. Balarini

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

L979a Luz, Mickael Sousa da.

Avaliação do efeito do borneol sobre a modulação autonômica da pressão arterial de ratos normotensos e com hipertensão renovascular / Mickael Sousa da Luz. - João Pessoa, 2021.

70 f. : il.

Orientação: Maria do Socorro de França Falcão.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Hipertensão. 2. Borneol. 3. Barorreflexo. 4. Modulação autonômica. I. Falcão, Maria do Socorro de França. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.12-008.331.1

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me permitir o dom da vida abençoando todo o meu caminho até então, sendo o meu alfa e ômega, me trazendo paz e sabedoria nos momentos de dificuldade.

A toda a minha família pelo amor incondicional. Em especial, a meus pais: Rodrigues e Cleúma pelo incentivo ao estudo desde criança, por estarem ao meu lado em todas as minhas decisões e por, principalmente, me cercarem de amor, carinho, atenção em pequenas e grandes ações. E as minhas irmãs: Mickaelle e Mirelle por me darem apoio e me acompanharem em tudo. São o motivo de tudo e os amores da minha vida.

A Universidade Federal da Paraíba e ao Centro de Biotecnologia por propiciar esta pesquisa fornecendo aparato financeiro e estrutura física. Agradeço também as agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior que indiretamente contribuíram financeiramente para o desenvolvimento deste trabalho.

A Sociedade Brasileira de Fisiologia e ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas de João Pessoa-PB, que com todo seu corpo de docentes ajudou e contribuiu para a minha formação enquanto profissional, com as disciplinas, experiências, eventos e com a luta diária de valorização da ciência. Agradeço também a representação discente e colegiado por terem me acolhido de forma especial e enriquecendo minha experiência durante a pós-graduação.

Agradeço a todos os membros do Laboratório de controle neural da circulação e hipertensão arterial (LACONCHA), em especial os técnicos Sara Madeiro, Clênia Cavalcanti e Matheus Monteiro, que sempre estiveram dispostos a ensinar e auxiliar na rotina laboratorial diariamente. Além, dos pós-graduandos Danilo Duarte, Alyne Carvalho, Patrícia Rocha, Airlla Laana, Luciana Nascimento, Anderson Santos, Micaele Oliveira, Larissa Lins, Ivynna Suellen, Roxane Carvalho, Emmanuel Veríssimo, Giovana Cristina, e Camila de Castro, que tornaram meus dias no laboratório mais agradáveis e divertidos, sempre compartilhando conhecimento e experiência. Todos vocês do nomeado FunLab foram essenciais na minha singela passagem no laboratório.

A minha querida orientadora Profª. Drª. Maria do Socorro, que me deu o primeiro sim abrindo oportunidade para me apaixonar ainda mais pelo universo da fisiologia. Eu sou extremamente grato por todo o conhecimento a mim fornecido, por todas as orientações profissionais e pessoais, por toda a ajuda e por contribuir na minha formação com amor,

paciência e dedicação desde a graduação, sendo um exemplo e inspiração de profissionais de pessoas.

Aos meus queridos amigos Anna Julyana, Kaio Andrade, Bianca Teixeira, Renata Lira, Lucas Lima e tantos outros que me incentivaram do seu modo no universo da Pós-Graduação. Obrigado por todo o apoio e por compartilhar suas histórias comigo.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos que colaboraram direta ou indiretamente para a minha formação e conclusão desse trabalho.

“Não é o que o mundo reserva pra você, mas o que você traz para o mundo.”

Anne with an E, Moira Walley-Beckett

RESUMO

O borneol é um monoterpeno bicíclico extraído de óleos essenciais de diversas plantas medicinais. Este composto é utilizado há muito tempo na medicina tradicional chinesa com efeitos cardiovasculares promissores. Alguns estudos demonstraram o potencial antioxidante, vasodilatador e anti-hipertensivo do borneol em animais normotensos e com hipertensão L-NAME, entretanto nada tem sido relatado sobre seus efeitos na hipertensão renovascular, assim como na modulação autonômica da pressão arterial e em seus mecanismos de controle. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos induzidos pelo borneol em parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos e com hipertensão renovascular. Para isso, uma combinação de protocolos *in vivo* foi realizada em ratos SHAM e 2R1C, assim avaliou-se o efeito do tratamento oral por 14 dias com o borneol sobre a pressão arterial, frequência cardíaca, atividade autonômica simpática e parassimpática e sensibilidade do barorreflexo. O tratamento oral com o borneol foi capaz de reduzir a pressão arterial apenas em ratos 2R1C (2R1C + borneol: $123,12 \pm 6$ vs. 2R1C: $169,43 \pm 9$ mmHg, $p < 0,05$), assim como diminuiu a pressão arterial sistólica (2R1C + borneol: $144 \pm 5,3$ vs. 2R1C: $196 \pm 11,39$ mmHg, $p < 0,05$) e diastólica (2R1C + borneol: $103,1 \pm 4,5$ vs. 2R1C: $154,9 \pm 4,6$ mmHg, $p < 0,05$). O tratamento não provocou alterações significativas na frequência cardíaca. Ao avaliar a função autonômica por meio da administração de bloqueadores farmacológicos, o borneol não induziu alterações na atividade parassimpática, entretanto, foi capaz de reduzir a hiperatividade simpática em ratos 2R1C (2R1C + borneol: $-48,52 \pm 7,289$ vs. 2R1C: $-73,43 \pm 4,969$ mmHg, $p < 0,05$). Adicionalmente, também reduziu as bandas de baixa frequência - LF (2R1C + borneol: $3,14 \pm 0,29$ vs. 2R1C: $9,69 \pm 0,95$ mmHg², $p < 0,05$), sem demonstrar alteração nas bandas de alta frequência – HF e índice simpatovagal (LF/HF), suportando a redução da atividade simpática nos ratos 2R1C sem interferir na atividade parassimpática. Além disso, o tratamento oral com o borneol melhorou a sensibilidade do barorreflexo induzido farmacologicamente com agentes vasoativos (2R1C + borneol: $-3,6 \pm 0,3$ vs. 2R1C: $-1,3 \pm 0,1$ bpm.mmHg⁻¹, $p < 0,05$), assim como no barorreflexo espontâneo (2R1C + borneol: $-3,56 \pm 0,64$ vs. 2R1C: $-1,38 \pm 0,1$ bpm.mmHg⁻¹, $p < 0,05$). Finalmente, o tratamento oral com o borneol não foi capaz de reduzir o estresse oxidativo sérico. Esses dados em conjunto sugerem um efeito anti-hipertensivo do borneol, uma vez que ele reduziu a pressão arterial somente em ratos com hipertensão renovascular. Este efeito pode estar relacionado, em parte, pela capacidade de reduzir a atividade simpática e melhorar na sensibilidade do barorreflexo.

Essas informações fazem do borneol uma molécula com um futuro importante na terapia da hipertensão.

Palavras-chave: Borneol; anti-hipertensivo; barorreflexo; modulação autonômica; hipertensão renovascular.

ABSTRACT

Borneol is a bicyclic monoterpeno extracted essential oils of various medicinal plants. This compound has been used for a long time in traditional Chinese medicine with promising cardiovascular effects. Some studies have demonstrated the antioxidant, vasodilator and antihypertensive potential of borneol in normotensive animals and with L-NAME hypertension, however nothing has been reported about its effects on renovascular hypertension, as well as on the autonomic modulation of blood pressure and its control mechanisms. The present study aimed to evaluate the effects induced by borneol on cardiovascular parameters of normotensive rats and renovascular hypertension. For this, a combination of protocols *in vivo* was performed in SHAM and 2R1C rats, thus evaluating the effect of oral treatment for 14 days with borneol on blood pressure, heart rate, sympathetic and parasympathetic autonomic activity and baroreflex sensitivity. Oral treatment with borneol was able to reduce blood pressure only in 2R1C rats (2R1C + borneol: $123,12 \pm 6$ vs. 2R1C: $169,43 \pm 9$ mmHg, $p < 0,05$), as well as decreased blood pressure systolic (2R1C + borneol: $144 \pm 5,3$ vs. 2R1C: $196 \pm 11,39$ mmHg, $p < 0,05$) and diastolic (2R1C + borneol: $103,1 \pm 4,5$ vs. 2R1C: $154,9 \pm 4,6$ mmHg, $p < 0,05$). The treatment did not cause significant changes in heart rate. When assessing autonomic function through the administration of pharmacological blockers, borneol did not induce changes in parasympathetic activity, however, it was able to reduce sympathetic hyperactivity in 2R1C rats (2R1C + borneol: $-48,52 \pm 7,289$ vs. 2R1C: $-73,43 \pm 4,969$ mmHg, $p < 0,05$). Additionally, it also reduced the low frequency bands - LF (2R1C + borneol: $3,14 \pm 0,29$ vs. 2R1C: $9,69 \pm 0,95$ mmHg 2 , $p < 0,05$), without showing any change in the high frequency bands. frequency - HF and sympathovagal index (LF/HF), supporting the reduction of sympathetic activity in 2R1C rats without interfering with parasympathetic activity. Moreover, oral treatment with borneol improved baroreflex sensitivity pharmacologically induced with vasoactive drugs (2K1C + Borneol: $-3,6 \pm 0,3$ vs. 2K1C: $-1,3 \pm 0,1$ bpm.mmHg $^{-1}$, $p < 0,05$), as well as spontaneous baroreflex (2R1C + borneol: $-3,56 \pm 0,64$ vs. 2R1C: $-1,38 \pm 0,1$ bpm.mmHg $^{-1}$, $p < 0,05$). Finally, oral treatment with borneol was not able to reduce oxidative stress serum. These data together suggest an antihypertensive effect of borneol, since it reduced blood pressure only in rats with renovascular hypertension. This effect may be related, in part, to the ability to reduce sympathetic activity and improve baroreflex sensitivity. This information makes borneol a molecule with an important future in hypertension therapy.

Keywords: Borneol; antihypertensive; baroreflex; autonomic modulation; renovascular hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Taxa de mortes por doenças hipertensivas e outras doenças cardiovasculares no período de 2000 a 2013.....	20
Figura 2-	Aferências e eferências do reflexo barorreceptor.....	23
Figura 3-	Representação esquemática da formação da Ang II e seus principais efeitos.....	26
Figura 4-	Estrutura química do borneol ($C_{10}H_{18}O$).....	29
Figura 5-	Esquema temporal da preparação e protocolo experimental.....	35
Figura 6-	Rins esquerdo e direito de um animal submetido a indução da hipertensão 2R1C.....	40
Figura 7-	Traçados representativos de um animal de cada grupo demostrando a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).....	42
Figura 8-	Traçados representativos de um animal de cada grupo demostrando a avaliação da atividade parassimpática.....	46
Figura 9-	Traçados representativos de um animal de cada grupo demostrando a avaliação da atividade simpática.....	48
Figura 10-	Traçados representativos da faixa LF e HF de um animal de cada grupo.....	49
Figura 11-	Traçado representativo de um animal de cada grupo na avaliação do barorreflexo induzido.....	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Média do peso corporal (g) dos animais durante o período de tratamento.	40
Gráfico 2-	Consumo médio em gramas (g) de ração durante o período de tratamento.....	41
Gráfico 3-	Ingestão médio em mililitros (ml) de água durante o período de tratamento.....	41
Gráfico 4-	Efeito do tratamento oral com borneol sobre a pressão arterial média (PAM).....	43
Gráfico 5-	Efeito do tratamento oral com borneol sobre a frequência cardíaca (FC).....	43
Gráfico 6-	Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a pressão arterial sistólica (PAS).....	44
Gráfico 7-	Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a pressão arterial diastólica (PAD).....	45
Gráfico 8-	Influência do tratamento oral com o borneol no controle autonômico parassimpático.....	47
Gráfico 9-	Influência do tratamento oral com o borneol no controle autonômico simpático.....	48
Gráfico 10-	Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a oscilações na faixa LF...	50
Gráfico 11-	Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a oscilações na faixa HF...	50
Gráfico 12-	Efeito do tratamento oral com o borneol sobre o índice simpatovagal.....	51
Gráfico 13-	Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a sensibilidade do barorreflexo induzido por drogas vasoativas.....	53
Gráfico 14-	Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a sensibilidade do barorreflexo espontâneo.....	54
Gráfico 15-	Efeito do tratamento oral com o borneol sobre o estresse oxidativo sérico.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang II	Angiotensina II
CVLM	Bulbo ventrolateral caudal
DAG	Diacilglicerol
DC	Débito cardíaco
DCVs	Doenças cardiovasculares
DHE	Dihidroetídio
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GPCR	Receptor acoplado à Proteína G
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HF	<i>High frequency</i>
IP	Intervalo de pulso
IP ₃	Trifosfato de inositol
LF	<i>Low frequency</i>
L-NAME	Éster metílico de N-nitroarginina
M2	Receptor muscarínico tipo 2
MDA	Malondialdeído
NA	Núcleo ambíguo
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NPS	Nitropussiato de sódio
NTS	Núcleo do trato solitário
NO	Óxido nítrico
O ₂ -	Ânion superóxido
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAD	Pressão arterial sistólica
PAS	Pressão arterial diastólica
PAP	Pressão arterial de pulso
PIP ₂	Bifosfato de inositol

PKC	Proteína cinase C
PVN	Núcleo paraventricular
RVPT	Resistência vascular periférica total
RVLM	Bulbo ventrolateral rostral
SFO	Orgão subfornical
SNC	Sistema nervoso central
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TBA	Ácido tiobarbitúrico
VS	Volume sistólico
2R1C	2 rins-1 clipe

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA.....	19
2.2 PRINCIPAIS MECANISMOS DE CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL: BARORREFLEXO E SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA	20
2.3 MODELO DE HIPERTENSÃO RENOVASCULAR	27
2.4 BORNEOL	27
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 SUBSTÂNCIA TESTE	33
4.2 DROGAS UTILIZADAS	33
4.3 ANIMAIS	33
4.4 PREPARAÇÃO EXPERIMENTAL	33
4.4.1 Indução da hipertensão renovascular.....	33
4.4.2 Implantação de cateteres vasculares	34
4.4.3 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	34
4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	35
4.5.1 Avaliação do efeito do tratamento oral com o borneol sobre o controle autonômico da pressão arterial e frequência cardíaca.....	35
4.5.2 Análise espectral do componente de baixa frequência, alta frequência e índice simpatovagal em ratos normotensos e 2R1C.....	35
4.5.3 Avaliação do efeito do tratamento oral com o borneol sobre a sensibilidade do barorreflexo	36
4.5.4 Avaliação do efeito do tratamento oral com o borneol sobre o estresse oxidativo sérico	37
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5 RESULTADOS	39
5.1 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM O BORNEOL SOBRE O PESO CORPORAL, O PESO DOS RINS, CONSUMO DE RAÇÃO E INGESTÃO DE ÁGUA DOS ANIMAIS	39

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM O BORNEOL SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM RATOS SHAM E 2R1C	42
5.3 EFEITOS DO TRATAMENTO ORAL COM O BORNEOL NA FUNÇÃO AUTONÔMICA EM RATOS SHAM E 2R1C	45
5.4 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM O BORNEOL NO ESPECTRO DE BAIXA FREQUÊNCIA, ALTA FREQUÊNCIA E ÍNDICE SIMPATOVAGAL	49
5.5 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM O BORNEOL NA SENSIBILIDADE DO BARORREFLEXO EM RATOS SHAM E 2R1C	51
5.6 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM O BORNEOL NO ESTRESSE OXIDATIVO SÉRICO DE RATOS SHAM E 2R1C	54
6 DISCUSSÃO	57
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO I - CERTIDÃO DO CEUA	70

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada pela elevação sustentada dos níveis de pressão arterial sistólica e diastólica para valores iguais ou superiores a 140 e 90 mmHg, respectivamente (WHO, 2013; VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2016). Em 2017, a Associação Americana do Coração sugeriu considerar um indivíduo hipertenso com valores de pressão sanguínea a partir de 130 e 80 mmHg como forma de prevenir o agravamento dessa desordem e melhorar a eficácia no seu tratamento (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2017).

A HAS pode ser classificada em primária (ou essencial) e secundária. Cerca de 90 a 95% dos casos de hipertensão são de hipertensão primária, esta caracteriza-se por ter sua etiologia desconhecida, podendo estar frequentemente associada ao estilo de vida do indivíduo e agravada por fatores como obesidade, envelhecimento, alcoolismo e/ou diabetes. A hipertensão secundária compreende de 5 a 10% dos casos e é possível determinar a sua causa, muitas vezes, relacionada a danos em órgãos alvos, a exemplo de complicações renais (CHOBANIAN et al., 2003; SIMPLICIO et al., 2016). Portanto, adotar o estilo de vida saudável é extremamente importante para a prevenção da HAS e outras desordens cardiovasculares. Contudo, uma vez instalada o quadro hipertensivo, o uso de medicamentos é essencial para ajudar a manter os níveis pressóricos controlados.

Contamos com diversos medicamentos anti-hipertensivos no mercado que atuam das mais diferentes formas e, na maioria dos casos, o tratamento farmacológico para a hipertensão apresenta êxito quando ocorre a combinação de dois ou mais fármacos que atuam em mecanismos diferentes envolvidos na modulação da pressão sanguínea. Alguns indivíduos apresentam ainda resistência aos tratamentos existentes, mantendo a pressão sanguínea elevada mesmo fazendo uso concomitante de três medicamentos diferentes (AYDIN et al., 2007; PEIXOTO-NEVES et al., 2010; NOUBIAP et al., 2019).

Nesse contexto, a busca por novas terapias eficazes e seguras para a HAS é constante, e as plantas medicinais representam um conjunto de novas possibilidades para juntar as já disponíveis. Desde os tempos mais remotos, as plantas são utilizadas como extratos e outras apresentações para a cura de doenças. O avanço no campo científico e desenvolvimento de tecnologias tornou possível conhecer e caracterizar as ações de cada molécula de origem vegetal no sistema funcional humano, desta forma, trazendo mais eficácia para o tratamento das mais diversas doenças (CAMARGO et al., 2018). Logo, os produtos

naturais são considerados a principal fonte de obtenção de bioativos e novos fármacos, dada a sua grande variedade de compostos. Isso representa um caminho a ser explorado em busca de compostos que possam atuar de maneira benéfica no sistema cardiovascular.

Como um dos exemplos destes produtos naturais destaca-se o borneol, um composto extraído de óleo essencial de diversas plantas como por exemplo da *Dipterocarpus turbinatus*, *Salvia officinalis L.* e *Cinnamomum camphora L.*; e tem sido relacionado a efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular. SILVA-FILHO et al. (2011) demonstrou que o borneol exerceu efeito vasorrelaxante em anéis isolados de aorta torácica de ratos normotensos. Outros estudos têm relatado que o borneol possui propriedades anti-hipertensiva e antioxidante em ratos com hipertensão L-NAME (KUMAR et al., 2010). Além disso, dados do nosso laboratório corroboram com os achados da literatura, pois mostram a atividade vasorrelaxante relacionada ao borneol em anéis isolados de artéria mesentérica superior de ratos normotensos e com hipertensão renovascular (dados ainda não publicados). Porém, trabalhos sobre o seu efeito na modulação autonômica da pressão arterial, frequência cardíaca e na sensibilidade do barorreflexo ainda não foram realizados, tampouco a avaliação deste monoterpeno no modelo de hipertensão renovascular, uma vez que este modelo fornece condições apropriadas para o estudo de parâmetros associados à hipertensão arterial secundária de humanos.

Esses achados encorajam a pesquisa com o borneol, por ser um produto natural presente em diversos recursos vegetais e com potencial uso terapêutico. Baseado nessas informações a nossa hipótese é que o borneol reduz a pressão arterial, melhora o balanço autonômico e a sensibilidade do barorreflexo em ratos com hipertensão renovascular. Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento oral com o borneol sobre parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos e com hipertensão 2R1C por meio de abordagens *in vivo*.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

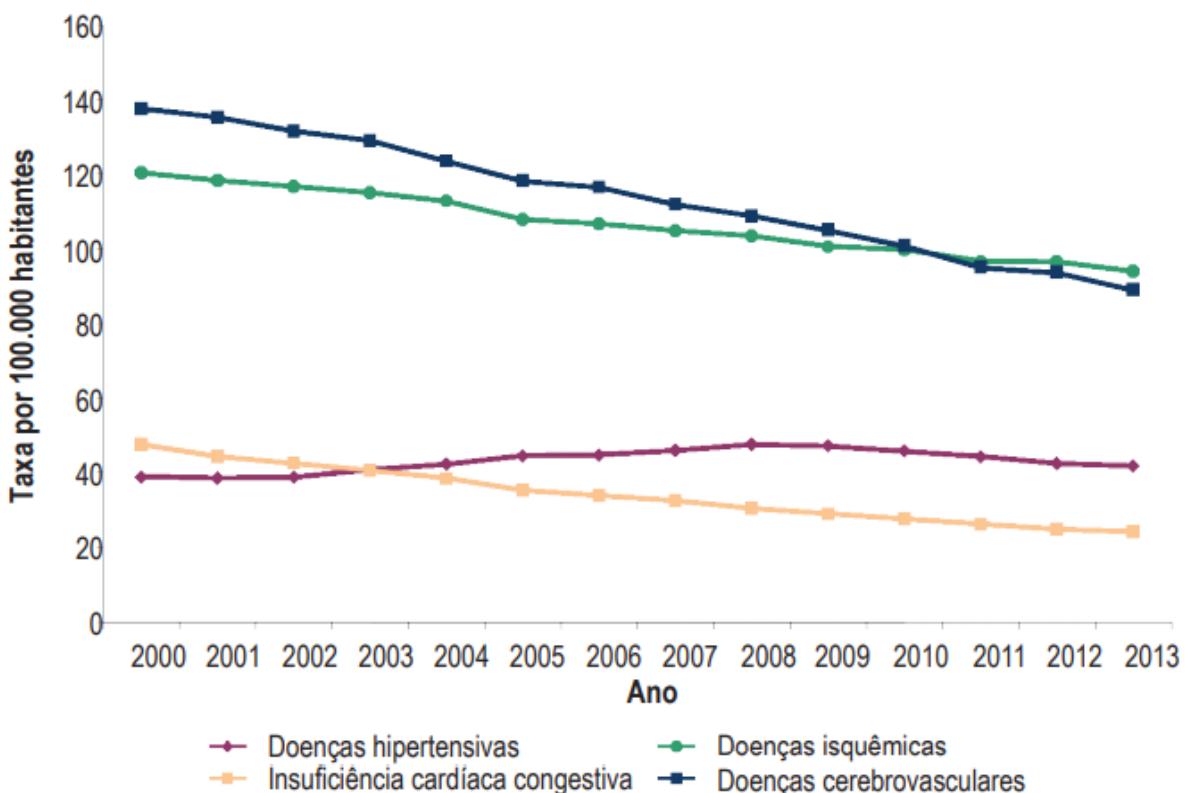
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

O desenvolvimento da HAS é silencioso, assintomático e geralmente precede o surgimento de diversas outras DCVs, sendo considerada o seu principal fator de risco. As DCVs são representadas por um conjunto de doenças que acometem o coração e vasos sanguíneos, e juntas foram responsáveis por 17,9 milhões de óbitos em escala mundial em 2015. A HAS tem sido responsável por 50% desses óbitos no mundo, sendo assim um dos principais problemas de saúde pública, com altos índices de prevalência e baixa taxa de controle (WHO, 2017).

No Brasil, o número de adultos que apresentam níveis elevados de pressão arterial (PA) é de aproximadamente 36 milhões, ocupando a sexta posição entre os países com altas taxas de mortes por DCVs (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016) e por isso essa desordem representa um problema na rede de saúde pública do país. Evidentemente, além de outros fatores, manter os níveis de PA controlados é crucial para reduzir o número dessas mortes no mundo.

Ainda no Brasil, dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2016) indicam uma diminuição nas mortes por doenças isquêmicas e cerebrovasculares no período de 2000 a 2013, mas houve um aumento das mortes por doenças hipertensivas nesse mesmo período (Figura 1). Estes dados refletem que ações preventivas devem ser realizadas para diminuir esses índices, além da intensificação de pesquisas guiadas na busca de novas alternativas para o tratamento da hipertensão.

Figura 1: Taxa de mortes por doenças hipertensivas e outras doenças cardiovasculares no período de 2000 a 2013.



Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2016.

2.2 PRINCIPAIS MECANISMOS DE CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL: BARORREFLEXO E SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

A PA é a força do sangue sobre paredes dos vasos sanguíneos ao ser bombeado pelo coração de forma rítmica. Em valores normais para a homeostase do organismo, a PA criada no sistema cardiovascular garante a perfusão adequada de sangue pelos diversos órgãos do corpo com entrega de oxigênio e nutrientes em suas células (VASQUEZ et al., 1997). Matematicamente, a PA pode ser determinada pelo produto das variações do débito cardíaco (DC) e resistência vascular periférica total (RVPT) (Equação 1). O DC corresponde ao volume de sangue bombeado pelo coração a cada minuto, sendo expresso como produto do volume sistólico (VS, em mL) pela frequência cardíaca (FC, em bpm); e a RVPT resulta do tônus vascular (WESS; EGLEN; GAUTAM, 2007).

Equação 1: Formula geral da pressão arterial.

$$\Delta PA = \underbrace{\Delta DC}_{VS \times FC} \times RVPT$$

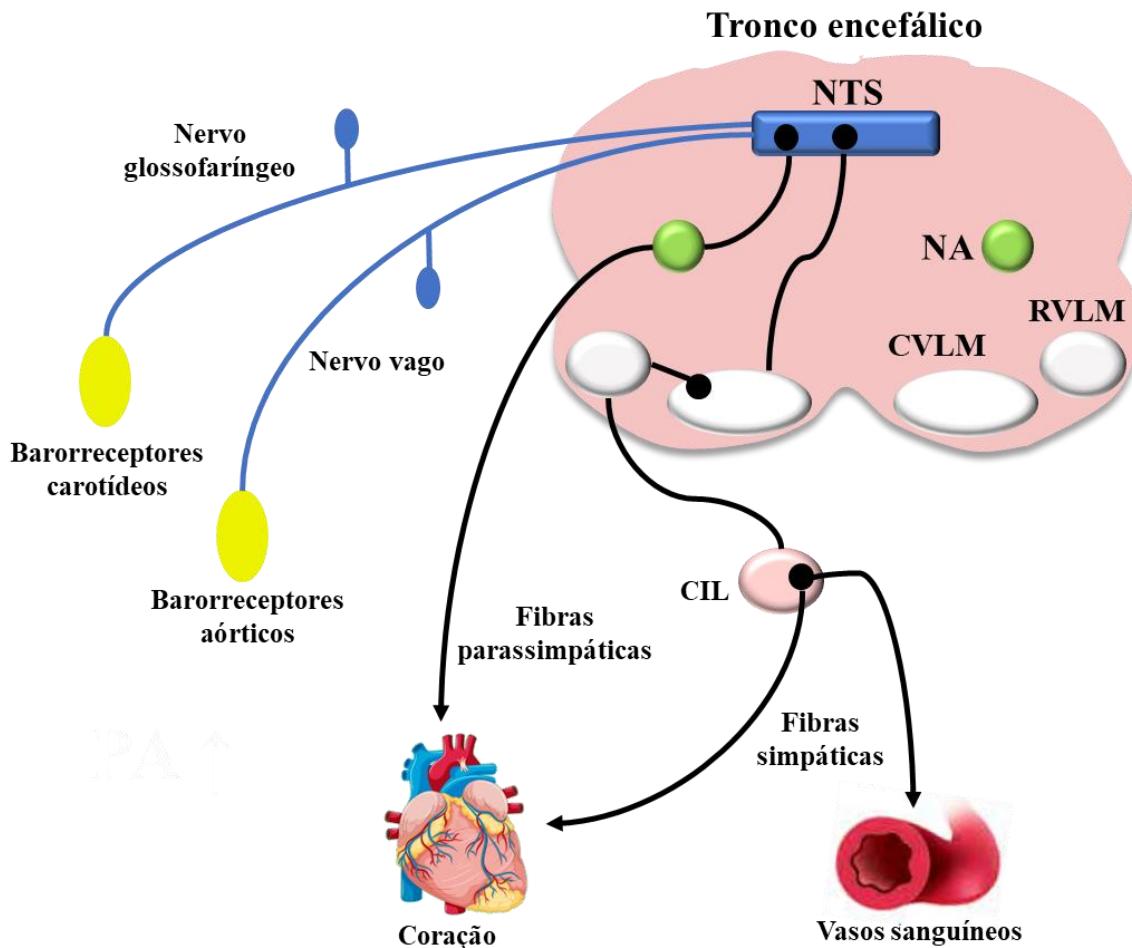
Legenda: ΔPA , variação da pressão arterial; ΔDC , variação do débito cardíaco; $RVPT$, resistência vascular periférica total; VS , volume sistólico e FC , frequência cardíaca.

Tanto o DC quanto a RVPT sofrem constante influência de diversos sistemas do corpo, os quais trabalham para manter a PA dentro dos valores adequados à homeostase. Um desequilíbrio em um ou mais dos sistemas que regulam a PA pode levar ao desenvolvimento de quadros hipertensivos. De forma geral, a PA é controlada por ações integradas, por mecanismos que agem em curto e longo prazo, dos sistemas neural, cardiovascular, renal e endócrino (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; CHOPRA, BABY, JACOB, 2011). Dentre os principais mecanismos envolvidos na regulação da PA, destacam-se o controle neural, desempenhado pelos reflexos cardiovasculares, tendo como principal representante o reflexo barorreceptor; e o controle renal, incluindo especialmente o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA).

O reflexo barorreceptor ou barorreflexo (Figura 2) monitora alterações na pressão arterial a cada batimento cardíaco e promove mudanças na PA e FC de forma a compensar essas variações. Este reflexo ocorre por meio de mecanorreceptores, conhecidos como barorreceptores, sensíveis ao estiramento ocasionados pelas alterações de PA e são localizados na parede do arco aórtico (barorreceptores aórticos) e na bifurcação do seio carotídeo (barorreceptores carotídeos). Estruturalmente, as terminações dos barorreceptores compõe a camada adventícia dos vasos juntamente com colágeno e elastina. Os barorreceptores possuem canais iônicos mechanossensíveis que mudam de conformação ao serem estimulados pelo estiramento dos vasos, desta maneira o potencial de ação é desencadeado e os sinais aferentes são enviados em conjunto ao Sistema Nervoso Central (SNC) por meio do nervo depressor aórtico e pelo nervo do seio carotídeo, os quais se associam ao nervo vago e ao nervo glossofaríngeo, respectivamente (KRIEGER, 1964; IRIGOYEN et al., 2001; TU, ZHANG, LI, 2019). Ambos formam sinapses com neurônios do Núcleo do Trato Solitário (NTS), um centro integrador localizado no bulbo. À partir do NTS

partem duas vias distintas, formadas pelas: via parassimpato-excitatória e via simpato-inibitória, propiciando a capacidade do barorreflexo agir sobre situações de aumento ou diminuição de PA. Na via parassimpato-excitatória, neurônios do NTS enviam projeções para o Núcleo Ambíguo (NA) que possui neurônios pré-ganglionares parassimpáticos. Na via simpato-inibitória, neurônios do NTS projetam-se para a região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM), estimulando neurônios GABAérgicos que enviam projeções inibitórias para a região rostral ventrolateral do bulbo (RVLM), nessa encontram-se neurônios pré-autonômicos simpáticos com atividade marcapasso, que uma vez inibidos pelo CVLM, reduz a atividade simpática de forma geral (SUN et al., 1988; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2016). Em resposta ao aumento de PA, há prevalência da função autonômica parassimpática pela ativação da via parassimpato-excitatória e redução da função autonômica simpática pela via simpato-inibitória, com isso é observada redução na FC; redução do DC; redução da força de contração (inotropismo negativo) e da resistência vascular; que em conjunto culmina na diminuição da PA. Por outro lado, em resposta à redução da PA, a relação entre as atividades parassimpáticas e simpática é invertida, estando reduzida e aumentada, respectivamente. Nesse novo contexto ocorre o aumento da FC, do DC, aumento da força de contração (inotropismo positivo) e da resistência vascular, resultando na elevação da PA.

Figura 2: Aferências e eferências do reflexo barorreceptor.



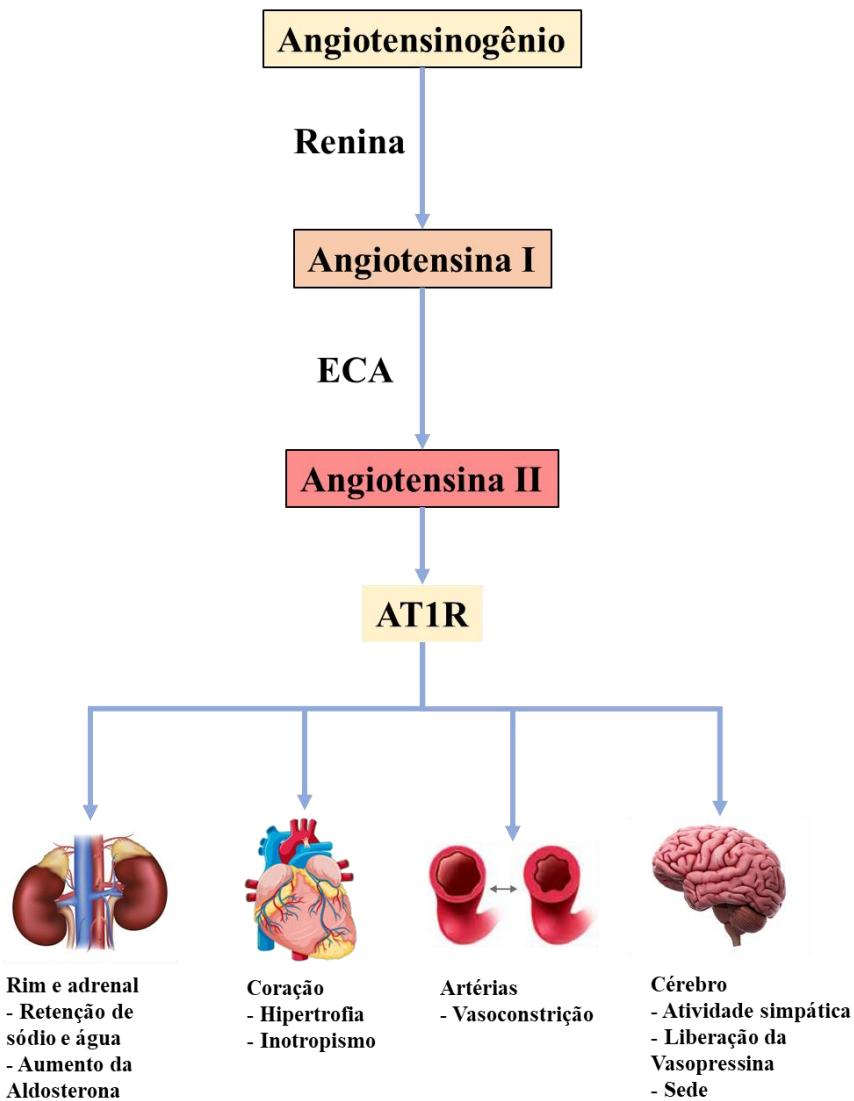
PA	PARASSIMPÁTICO	SIMPÁTICO	RESPOSTA
Aumento da PA	Aumenta	Diminui	Diminuição da PA
Diminuição da PA	Diminui	Aumenta	Aumento da PA

Legenda: Este esquema ilustra o funcionamento do reflexo barorreceptor, os barorreceptores são estimulados pelas variações de pressão em pontos estratégicos e por meio de suas aferências às regiões centrais de controle da pressão arterial induzem respostas parassimpáticas ou simpáticas guiadas por eferências à órgãos alvos como coração e vasos sanguíneos. NTS, núcleo do trato solitário; NA, núcleo ambíguo; CVLM, bulbo ventrolateral caudal; RVLM, bulbo ventrolateral rostral; CIL, coluna intermédio lateral. Adaptado de DONAUGHEY et al., 2002 e VASQUEZ et al., 1997.

Os rins exercem um papel importante na modulação da PA pela ativação do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) assim como influência direta na regulação do

volume extracelular (Figura 3). Nesse sistema, o aparelho justaglomerular localizado nos néfrons é formado por células da mácula densa, células mesangiais e células justaglomerulares, atua na modulação da PA através de vias hormonais. As células justaglomerulares se encontram na parede das arteríolas aferentes e são células musculares especializadas que sintetizam, armazenam e liberam renina após, por exemplo, a redução da concentração de Na^+ e redução da perfusão renal devido à diminuição da PA sistêmica ou devido a estimulação simpática (LI, et al., 2017). A renina é uma enzima responsável pela clivagem de angiotensinogênio, um zimogênio produzido pelo fígado e liberado na corrente sanguínea, em angiotensina I, este decapeptídio, por sua vez, sofre ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) transformando-se em angiotensina II (Ang II), um octapeptídeo, que na circulação promove efeitos, como por exemplo a vasoconstrição, que culminam no aumento da PA (CAMPOS, 2009).

Figura 3: Representação esquemática da formação da Ang II e seus principais efeitos.



Legenda: ECA, enzima conversora de angiotensina; ATR, receptor para angiotensina (isoforma 1). Adaptado de BADER et al., 2010.

A Ang II interage, preferencialmente, com o receptor AT₁ (AT₁R) localizado nos vasos sanguíneos, coração, em regiões do SNC, dentre outras, promovendo efeitos como a elevação do tônus simpático, aumento da reabsorção de sódio e consequentemente de água, aumento da RVPT pela vasoconstrição e estresse oxidativo (GOLDBLATT, 1934; WERNER et al., 2008). Na interação da Ang II com AT₁R, um receptor acoplado a proteína G_{q/11} (GPCR), há a união dos dímeros da enzima fosfolipase C (PLC) colocando-a em sua forma ativa. A PLC é responsável pela hidrólise do bisfosfato de inositol (PIP₂), um lipídeo de membrana, em trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG), esses funcionam como

segundos mensageiros elevando os níveis de cálcio intracelular, pela abertura dos canais para cálcio dependentes da proteína cinase C (PKC) (WEBB, 2003).

Diversos estudos têm relatado que a presença de Ang II e AT₁R em determinadas regiões do SNC, como o órgão subfornical (SFO), o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o RVLM, está associada com a modulação de parâmetros cardiovasculares (SAAVEDRA, 2005). No SNC, os neurônios e astrócitos expressam os componentes do SRA, como a renina, angiotensinogênio, AT₁R e ECA (em particular no plexo coroídes e nas células endoteliais dos capilares), desta forma a Ang II também pode ser sintetizada centralmente (KLOET et al., 2015; XUE et al., 2016). Além disso, a Ang II circulante é capaz de acessar o SNC pelas regiões desprovidas de barreira hematoencefálica localizadas nos órgãos circumventriculares, estimulando sua produção central (KLOET et al., 2015). Por outro lado, em algumas desordens cardiovasculares a permeabilidade da barreira hematoencefálica é prejudicada facilitando o acesso da Ang II circulante em alta concentração (BIANCARDI et al., 2014). Nessas regiões, o acoplamento da Ang II ao AT₁R promove a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) decorrentes da ativação da enzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH oxidase) pela fosforilação de suas subunidades promovida pela PKC, o que está relacionado em casos patológicos com hiperatividade simpática e disfunção do barorreflexo (BRAGA et al., 2011).

Esses radicais livres derivados do oxigênio desempenham um papel importante no desenvolvimento da hipertensão tanto a nível central pela disfunção do barorreflexo e influência na elevação da atividade simpática (BRAGA et al., 2011; 2012), quanto a nível periférico pela diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), um vasoprotetor que atua controlando o tônus vascular (DUSSE et al., 2003; HARRISON; GONGORA, 2009; TAN et al., 2017).

A avaliação dos níveis pressóricos, da integridade do barorreflexo e a verificação dos componentes autonômicos são considerados parâmetros importantes na avaliação da função cardiovascular. Os modelos animais podem contribuir significativamente neste tipo de investigação. Um modelo amplamente utilizado é o de hipertensão renovascular desenvolvido por Goldblatt em 1943, por possuir similaridades à hipertensão secundária humana.

2.3 MODELO DE HIPERTENSÃO RENOASCULAR

A hipertensão renovascular é uma das formas mais comuns de hipertensão secundária, é ocasionada principalmente por uma estenose localizada nas artérias renais. Essa condição promove uma redução da perfusão sanguínea para os rins levando a alterações hormonais e, consequentemente, elevação da PA em decorrência da ativação contínua do SRAA (PRAXEDES, 2002).

Em 1934, Goldblatt propôs um modelo animal experimental conhecido como 2 rins-1 clipe (2R1C) capaz de mimetizar esses aspectos da hipertensão renovascular. A inserção de um clipe de prata na artéria renal direita de ratos promove a redução do fluxo sanguíneo semelhante ao efeito causado pela estenose, com o posterior aumento na ativação do SRAA e, em algumas semanas, era possível observar a elevação sustentada da PA (GOLDBLATT et al., 1943).

No modelo 2R1C a superativação do SRAA leva a efeitos periféricos, como aumento da vasoconstrição, aumento da reabsorção de sódio e de água, estimulação do comportamento da sede; e efeitos centrais, como hiperatividade simpática, disfunção do barorreflexo e um aumento sistêmico do estresse oxidativo (MARTINEZ-MALDONADO, 1991; LERMAN et al., 2005). Em conjunto, esses efeitos promovem o estabelecimento da hipertensão e, assim, tornam possível uma variedade de experimentos utilizando esse modelo experimental focado em diversos candidatos a fármacos anti-hipertensivos.

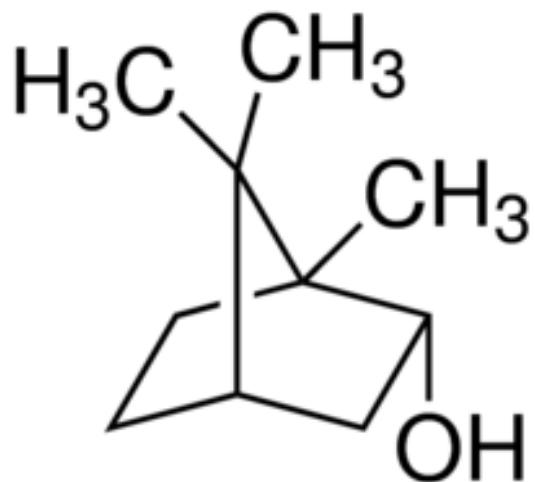
2.4 BORNEOL

Os produtos naturais constituem uma importante fonte de obtenção de novos fármacos, representando um novo caminho na busca de anti-hipertensivos alternativos, visando tratamentos mais eficientes para indivíduos hipertensos. Dentre os produtos naturais com atividades farmacológicas comprovadas, destacam-se os monoterpenos, os quais exercem efeitos benéficos ao sistema cardiovascular (AYDIN et al., 2007; PEIXOTO-NEVES et al., 2010; ANJOS et al., 2013). Os monoterpenos pertencem à classes dos terpenos (C_5H_8)n, são hidrocarbonetos cíclicos ou ramificados formados por duas porções de isopreno. São encontrados em metabólitos secundários extraídos de óleos essenciais de várias plantas medicinais.

Bastante utilizado na medicina tradicional chinesa como anestésico e analgésico, o borneol ($C_{10}H_{18}O$) é um monoterpeno bicíclico (Figura 4) que surge com um potencial anti-

hipertensivo e anti-oxidante. O borneol pode ser extraído de plantas de diversas famílias, tais como: Dipterocarpaceae (*Dipterocarpus turbinatus*); Lamiaceae (*Salvia officinalis L.*); Lauraceae (*Cinnamomum camphora L.*); Valerianaceae (*Valeriana officinalis L.*) (RAVID et al., 1996; XIAO-FEI, 2006; HORVATHOVÁ et al., 2009; WANG et al., 2014). O seu fácil acesso devido à vasta presença na flora permite uma gama de estudos relacionados ao efeito desse monoterpeno sobre o sistema cardiovascular.

Figura 4: Estrutura química do borneol ($C_{10}H_{18}O$). Peso molecular: 154,25.



Fonte: Sigma aldrich.

Estudos com esta molécula sugerem um efeito vasorrelaxante em aorta isolada de ratos normotensos e em ratos com hipertensão L-NAME (KUMAR et al., 2010; SILVA-FILHO et al., 2011; SANTOS et al., 2019). Corroborando com a mesma ideia, dados ainda não publicados do nosso laboratório indicam esta mesma atividade vasorrelaxante relacionada a este monoterpeno em anéis isolados de artéria mesentérica superior de ratos normotensos e com hipertensão renovascular.

Além disso, a integridade da barreira hematoencefálica é prejudicada pelo aumento de Ang II devido a superativação do SRAA no modelo de hipertensão renovascular, ampliando os efeitos deletérios da Ang II a regiões centrais (BIANCARD et al., 2016). Contudo, alguns estudos têm demonstrado que o borneol pode atravessar a barreira hematoencefálica e aumentar a permeabilidade à outras moléculas, sendo usado como sistema de liberação de moléculas no sistema nervoso central (ZHANG et al., 2017; ZHENG et al., 2018; WU et al., 2018). Desta forma o borneol possui acesso ao SNC, incluindo os núcleos de controle cardiovascular, podendo assim interferir nesses efeitos prejudiciais da Ang II. Ainda,

outros trabalhos mostram que o borneol exerce atividade antiepileptogênica em camundongos e efeito antinociceptivo (ALMEIDA et al., 2013; TAMBE et al., 2016), intensificando a sugestão de uma possível atuação a nível central desse monoterpeno.

Diante disso, o presente trabalho propôs avaliar o efeito do tratamento oral com o borneol nos parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos e com hipertensão renovascular, focando na modulação autonômica, funcionamento do barorreflexo e pressão arterial desses animais.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento oral com o borneol sobre parâmetros cardiovasculares de ratos normotensos e com hipertensão renovascular (2R1C).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o efeito do tratamento oral com o borneol em ratos normotensos e com hipertensão 2R1C sobre a/o:

- Pressão arterial e frequência cardíaca;
- Modulação autonômica cardiovascular parassimpática e simpática;
- Variabilidade da pressão arterial;
- Análise das bandas de baixa frequência (*Low Frequency*, LF); alta frequência (*High Frequency*, HF); e índice simpatovagal (LF/HF);
- Sensibilidade do barorreflexo;
- Estresse oxidativo sérico.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SUBSTÂNCIA TESTE

O (-)-borneol foi adquirido da Sigma-Aldrich® (Brasil), sendo portanto um composto sintético, mas que mimetiza o borneol de origem natural. Esse composto foi solubilizado em óleo mineral (SMITH, 1990; BOOGAARD et al., 2012) e diluído, obtendo a dose de 125 mg/Kg (ZHU et al., 2015). A dose foi preparada diariamente para a realização do tratamento.

4.2 DROGAS UTILIZADAS

Foram utilizadas as seguintes substâncias: heparina (Parinex® 5000 U.I/ml - Laboratório Hipolabor Brasil); cloridrato de cetamina (Quetamina® Laboratório – Vettinil, Brasil); xilazina (Dopaser - Laboratório Calier, Espanha). cloridrato de l (-) fenilefrina (FEN); nitroprussiato de sódio (NPS); atropina; cloreto de hexametônio; heparina sódica; ácido tiobarbitúrico (TBA) e ácido perclórico. Todas foram obtidas da Sigma-Aldrich®.

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 160 a 300 g disponibilizados pelo Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à água e ração (Labina®, Purina). O consumo de água e ração foi mensurado diariamente durante todo o período de tratamento. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) do Centro de biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba sob parecer nº 4169120220.

4.4 PREPARAÇÃO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos em 4 grupos: 1) Normotenso com óleo mineral (SHAM); 2) Normotenso tratado com 125 mg/Kg/dia de borneol (SHAM + borneol); 3) Hipertenso tratado com óleo mineral (2R1C) e 4) Hipertenso tratado com 125 mg/Kg/dia de borneol (2R1C + borneol). O borneol foi administrado via oral por gavagem durante 14 dias, na dose de 125 mg/Kg/dia, baseado em estudo prévio de ZHU et al. (2015).

4.4.1 Indução da hipertensão renovascular

Para o desenvolvimento da hipertensão, foi utilizado o modelo dois rins, um clipe (2R1C) descrito por Goldblatt (1934). A hipertensão renovascular foi provocada por meio da

clipagem do rim direito em animais com peso entre 160 a 170 g. Os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), em seguida, eles foram tricotomizados e uma secção no dorso do animal foi feita para a visualização e isolamento da artéria renal direita. Foi implantado um clipe de prata de 0.2 mm de abertura na artéria com a finalidade de diminuir o fluxo sanguíneo renal, e após seis semanas houve a instalação da hipertensão. Depois deste período, os animais foram submetidos ao tratamento de 14 dias e no 14º houve a implantação de cateteres vasculares como descrito no item 4.4.2. Como forma de padronizar e de se obter dados confiáveis, foram utilizados apenas aqueles animais que apresentaram um aumento da pressão arterial associado a uma redução do peso e tamanho do rim direito. Outros grupos de animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a clipagem do rim (Grupo SHAM).

4.4.2 Implantação de cateteres vasculares

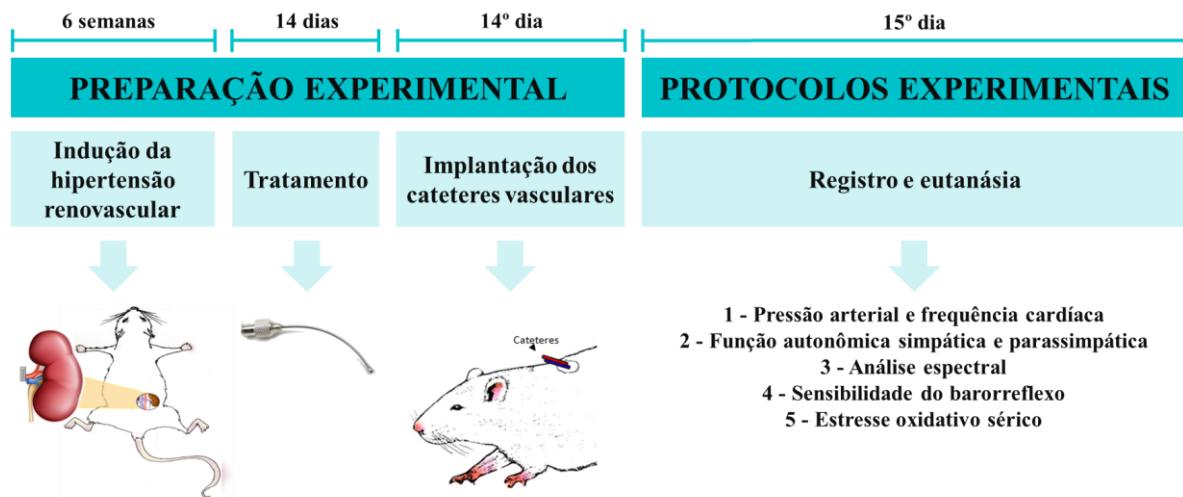
No 14º dia de tratamento os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg/Kg) + xilazina (10 mg/Kg), posteriormente, foram tricotomizados nas regiões inguinal e dorsal, em seguida, colocados em decúbito dorsal sobre uma prancha cirúrgica, a região femoral foi seccionada a fim de localizar e separar a artéria e veia femoral, logo após, cateteres de polietileno (3 a 4 centímetros de PE 10 e 16 a 18 centímetros de PE 50) foram introduzidas na artéria femoral em direção à artéria aorta abdominal para a mensuração direta da pressão arterial e frequência cardíaca; e na veia femoral em direção à veia cava inferior para a administração de agentes vasoativos. No final, os cateteres foram exteriorizados na região escapular dorsal do animal.

4.4.3 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

Após 24 horas foram realizados os registros da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em animais não-anestesiados, conectando-se a cânula arterial, previamente heparinizada para evitar a formação de coágulos, a um transdutor de pressão (Modelo BRPL2, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) acoplado a um amplificador e conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Unit 13, 22 Lexington Drive, Bella Vista, NSW, Austrália). O software de aquisição e análise de dados utilizado foi o LabChart 5.0. Este equipamento de aquisição permite o registro simultâneo da pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média e frequência cardíaca.

Logo após os registros os animais foram submetidos à eutanásia, o sangue e órgãos como: coração, rins, fígado e aorta foram coletados e mantidos refrigerados a -80 °C. Toda a fase de preparação e protocolo experimental pode ser observada na figura abaixo (Figura 5).

Figura 5: Esquema temporal da preparação e protocolo experimental.



Fonte: LUZ, 2020.

4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.5.1 Avaliação do efeito do tratamento oral com o borneol sobre o controle autonômico da pressão arterial e frequência cardíaca

No intuito de avaliar a função autonômica dos animais, foram administradas, intravenosamente, as seguintes drogas: hexametônio (30 mg/Kg), bloqueador colinérgico ganglionar, a fim de avaliar a função autonômica simpática; e a atropina (2 mg/Kg), um bloqueador colinérgico muscarínico, com o objetivo de avaliar a função autonômica parassimpática. As alterações na PAM ou FC promovidas por estas drogas foram comparadas entre os diferentes grupos.

4.5.2 Análise espectral do componente de baixa frequência, alta frequência e índice simpatovagal em ratos normotensos e 2R1C

Para a realização da análise espectral dentre os grupos adotados foram selecionados registros estáveis de pressão arterial pulsátil e frequência cardíaca de 10 minutos, em seguida os mesmos serão processados pelo software (LabChart, ADInstruments), que emprega o algoritmo para detectar pontos de inflexão batimento a batimento no sinal de pressão de pulso.

Em seguida, séries de batimento a batimento com valores de pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) foram divididos em períodos de segmentos de 350 batimentos para a realização da análise espectral auto regressiva no software personalizado (CardioSeries V2.4, <http://www.danielpenteado.com>), a fim de determinar os componentes oscilatórios de baixa e alta frequência no registro da pressão arterial.

As oscilações na banda de baixa frequência (*low frequency*, LF: 0.2–0.75 Hz) representam os efeitos da atividade simpática no tônus vascular ou cardíaco, oscilações na banda de alta frequência (*high frequency*, HF: 0.75–3.0 Hz) referem-se à modulação respiratória ou parassimpática e a razão LF/HF refere-se ao índice simpatovagal (CERUTTI et al., 1991).

Os componentes LF, HF e LF/HF foram avaliados neste trabalho por estarem relacionados indiretamente com a modulação autonômica neurogênica (LI et al., 2001). Os resultados foram expressos em valores absolutos e/ou unidades normalizadas.

4.5.3 Avaliação do efeito do tratamento oral com o borneol sobre a sensibilidade do barorreflexo

Para avaliação do barorreflexo foram analisadas as alterações reflexas na FC induzidas por alterações transitórias na PA. Estas alterações foram induzidas por injeção intravenosa de fenilefrina (8 µg/Kg), agonista α_1 adrenérgico; e nitroprussiato sódico (25 µg/Kg), doador de óxido nítrico; de maneira a se obter respostas pressoras e depressoras, respectivamente. Entre as injeções foi mantido um intervalo de no mínimo 15 minutos, para permitir que a PA e a FC retornassem aos valores basais. Para a determinação da sensibilidade do barorreflexo (SBR) foi adotada a técnica do pico da resposta ao agente vasoativo (Δ FC/ Δ PAM). Com essas variações foram construídas regressões lineares para cada grupo que fornecem o ganho do reflexo ou coeficiente de inclinação (*slope*), o qual expressa o índice da SBR, como previamente descrito no método Oxford modificado (Botelho-Ono et al., 2011; Alves et al., 2015). Em seguida esses valores para cada grupo foram utilizados para construção do gráfico em barra.

Adicionalmente foi avaliado a sensibilidade do barorreflexo espontâneo (SBRE) a partir do registro basal da PAM e FC dos animais, utilizando para isso o software Hemolab (Analyser versão 9.3), como previamente descrito (BRAGA et al., 2011; FAZAN et al., 2001). Nesta análise foi definida uma sequência barorreflexa que apresenta o mínimo de

quatro batidas do coração em que a pressão arterial sistólica e o intervalo de pulso (IP) estavam aumentados (*up sequences*) ou diminuídos (*down sequences*) obtida de um trecho estável de pelo menos 10 minutos no registro basal da PAP. A partir disso, o ganho da resposta do barorreflexo foi determinado pelo intervalo de pulso sobre a variação de pressão (ms/mmHg).

4.5.4 Avaliação do efeito do tratamento oral com o borneol sobre o estresse oxidativo sérico

Após o período de tratamento os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para a análise do estresse oxidativo. Todas as amostras foram usadas para a dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) como descrito por Cavalcanti et al., 2016. Nesse ensaio o malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, reage com o ácido tiobarbitúrico para produzir um complexo vermelho, o que funciona como um indicador do estresse oxidativo sérico. Portanto, depois de coletadas as amostras de sangue dos animais foram centrifugadas a 2000 g, 4° C, durante 15 min para a obtenção do soro, posteriormente 250 µL do soro foi aquecido em aquecimento à 37 °C por 1 hora. Em seguida, 400 µL de ácido perclórico (35%) foram adicionados, misturado e centrifugado a 600 g, 4° C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, e adicionado a 400 µL do ácido tiobarbitúrico (0,6%), a mistura foi aquecida a 100 °C durante 1 hora e a absorbância foi lida no espectrofotômetro ChemWell T em um comprimento de onda de 532 nm. Uma curva padrão do MDA com concentrações de 0 a 100 nmol/ml foi construída antes da leitura das amostras e os resultados foram expressos como nmol de MDA/mL.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m) e foram analisados pelo ANOVA One Way ou ANOVA Two Way, seguido do pós-teste Tukey no GraphPad Prism versão 5.00®. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM O BORNEOL SOBRE O PESO CORPORAL, O PESO DOS RINS, CONSUMO DE RAÇÃO E INGESTÃO DE ÁGUA DOS ANIMAIS

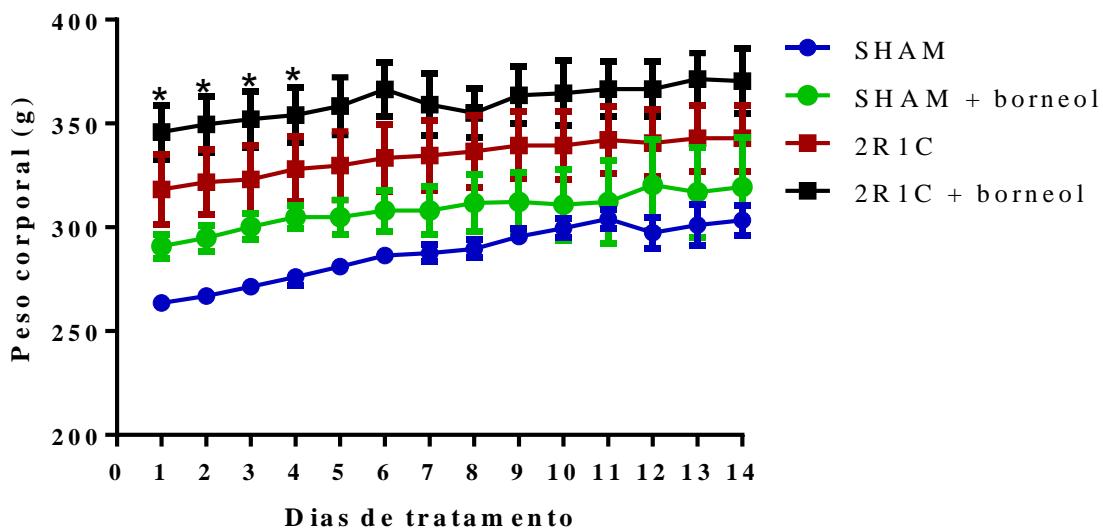
Como mostrado na Tabela 1, o tratamento com borneol ou veículo não alterou significativamente o ganho de peso dos animais entre os grupos avaliados, e no Gráfico 1 é possível verificar alterações pontuais quanto ao ganho de peso dos animais ao longo dos 14 dias do tratamento, sendo elas significantes apenas nos dias 1 a 4 entre os grupos 2R1C e SHAM. Foi observada uma redução no peso do rim direito nos animais dos grupos 2R1C quando comparado ao rim esquerdo dos animais do mesmo grupo, e também quando comparado ao rim direito dos grupos SHAM. Esses valores confirmam a redução na perfusão sanguínea do rim direito nos animais hipertensos devido à obstrução da artéria renal causada pela inserção do clipe (Figura 6).

Tabela 1 - Relação do peso corporal, rim direito e rim esquerdo dos animais dos grupos experimentais.

Grupos	Variação do peso corporal (g)	Rim direito (g)	Rim direito/peso corporal (mg/g)	Rim esquerdo (g)	Rim esquerdo/peso corporal (mg/g)
SHAM n= 8	35,5 ± 6	1,19 ± 0,06	0,0039 ± 0,0002	1,2 ± 0,02	0,004 ± 0,0001
SHAM + borneol n= 6	28,25 ± 3	1,17 ± 0,02	0,0041 ± 0,0001	1,1 ± 0,02	0,004 ± 3
2R1C n= 7	27,25 ± 5	0,92 ± 0,02 ^{a, b}	0,0033 ± 0,0017	1,4 ± 0,02	0,0048 ± 0,006
2R1C + borneol n= 8	16,92 ± 3	0,98 ± 0,11 ^{a, b}	0,0033 ± 0,0003	1,4 ± 0,04	0,004 ± 0,0003

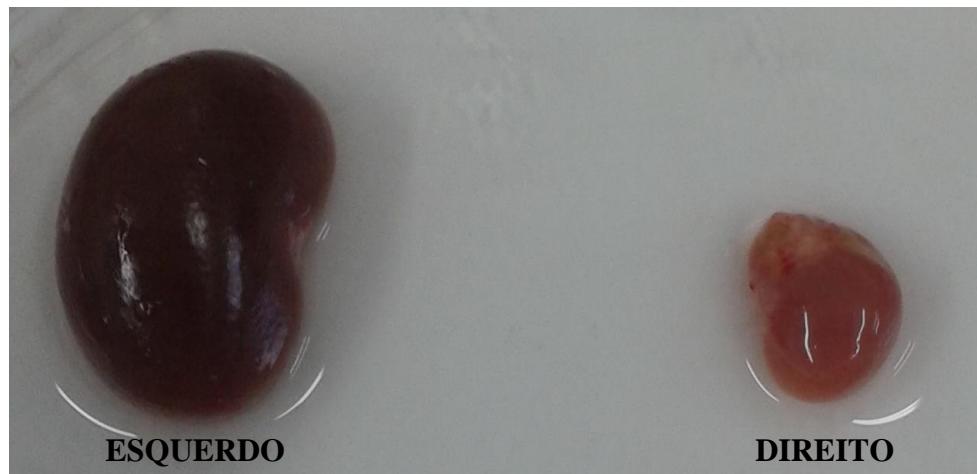
Legenda: Os valores representam a média ± e.p.m, onde a ($p < 0,05$ vs. SHAM) e b ($p < 0,05$ vs. Rim esquerdo do 2R1C). A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

Gráfico 1: Média do peso corporal (g) dos animais durante o período de tratamento.



Legenda: Os valores representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. SHAM). SHAM, n=6; SHAM + borneol, n=7; 2R1C, n=7; 2R1C + borneol, n=6. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova Two Way seguida do pós-teste de Tukey.

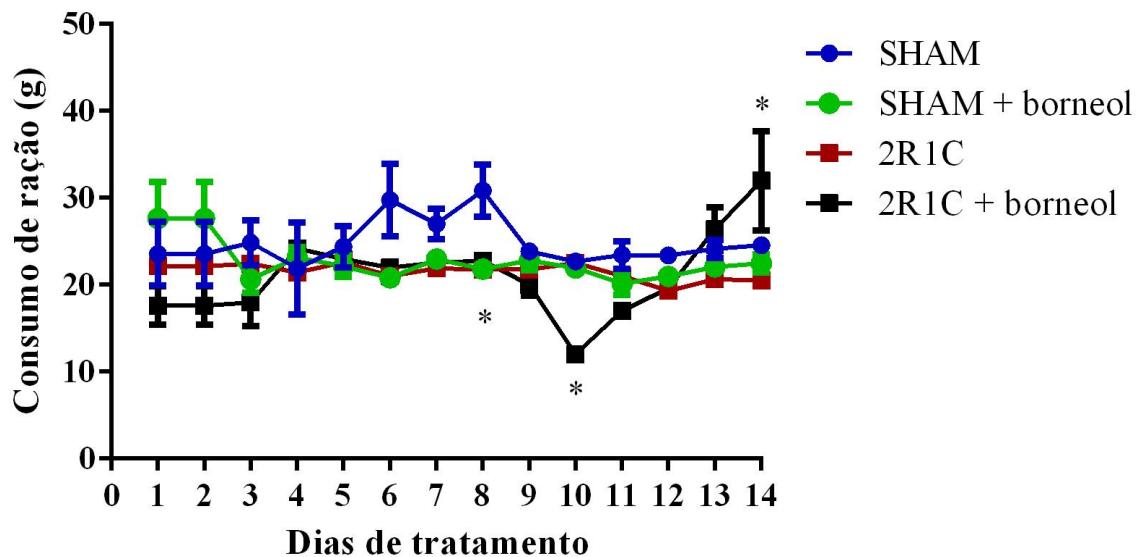
Figura 6 - Rins esquerdo e direito de um animal submetido a indução da hipertensão 2R1C.



Fonte: LUZ, 2020.

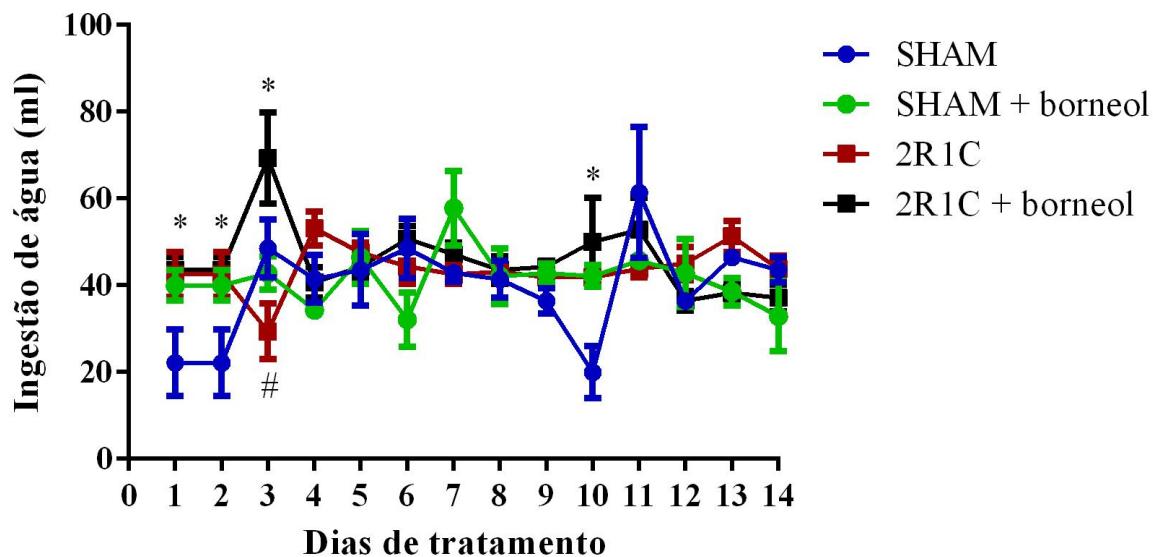
Não foram observadas alterações significativas no consumo de ração entre os grupos na maioria dos dias, exceto nos dias 8, 9 e 14 quando comparamos 2R1C + borneol e SHAM (Gráfico 2). De forma semelhante, não houve alterações significativas na ingestão de água, com exceção dos dias 1, 2, 3 e 10 quando comparamos 2R1C + borneol e SHAM; e dia 3 quando 2R1C e SHAM são comparados (Gráfico 3).

Gráfico 2: Consumo médio em gramas (g) de ração durante o período de tratamento.



Legenda: Os valores representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. SHAM). SHAM, n=7; SHAM + borneol, n=6; 2R1C, n=6; 2R1C + borneol, n=5. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova Two Way seguida do pós-teste de Tukey.

Gráfico 3: Ingestão médio em mililitros (mL) de água durante o período de tratamento.

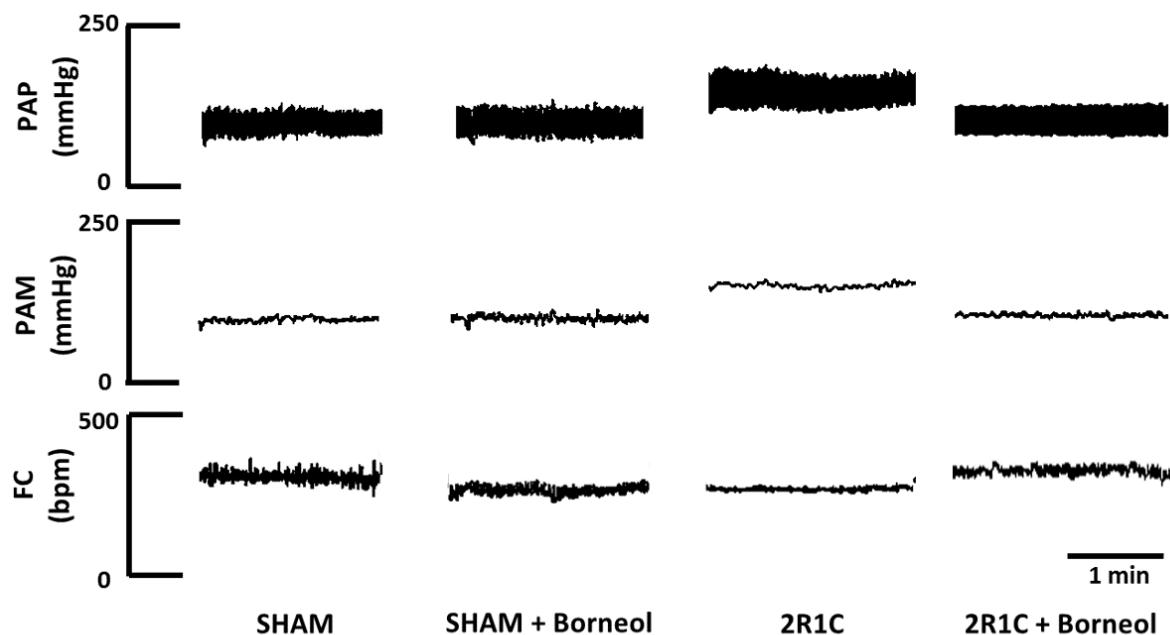


Legenda: Os valores representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. SHAM) e # ($p < 0,05$ vs. 2R1C). SHAM, n=7; SHAM + borneol, n=7; 2R1C, n=8; 2R1C + borneol, n=7. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova Two Way seguida do pós-teste de Tukey.

5.2 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM O BORNEOL SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM RATOS SHAM E 2R1C

A figura 7 mostra os traçados representativos da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basais de um animal de cada grupo estudado (SHAM, SHAM + borneol, 2R1C e 2R1C + borneol).

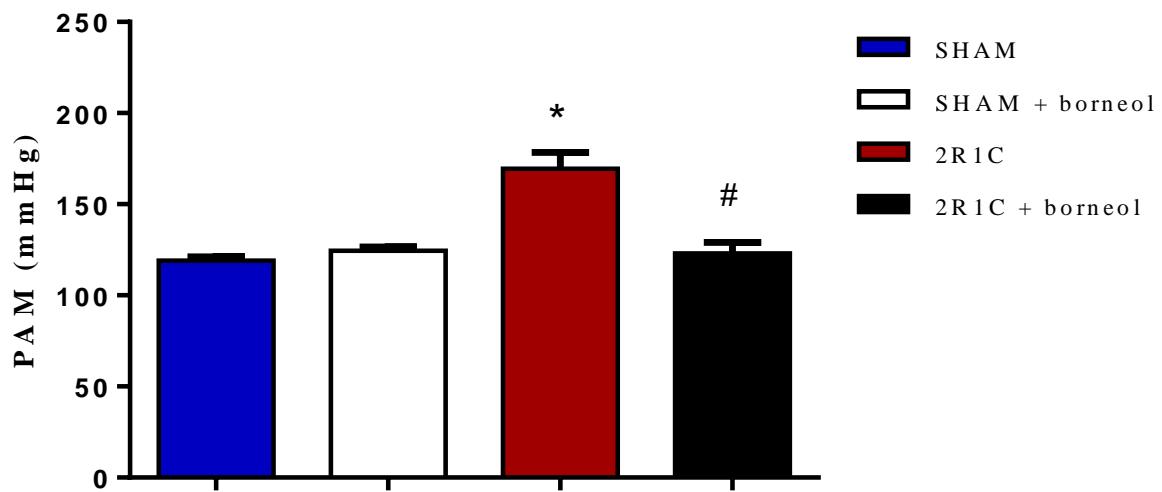
Figura 7 - Traçados representativos de um animal de cada grupo demonstrando a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).



Como esperado, observamos que houve um aumento da pressão arterial média no grupo 2R1C quando comparado ao grupo SHAM ($169,43 \pm 9$ vs. $119,12 \pm 2$ mmHg, $p < 0,05$) (Gráfico 4). Desse modo, os valores de PAM apresentados pelo grupo 2R1C associados à redução do rim direito confirmam o sucesso na instalação do modelo de hipertensão renovascular.

Ao compararmos os valores de PAM do grupo 2R1C com o grupo 2R1C + borneol ($169,43 \pm 9$ vs. $123,12 \pm 6$ mmHg, $p < 0,05$) é possível afirmar que o tratamento oral por 14 dias com borneol (125 mg/Kg/dia) foi capaz de reduzir a pressão arterial de ratos com hipertensão 2R1C (Gráfico 4). Não foi observada diferença significativa da PAM de ratos do grupo SHAM + borneol quando comparado ao seu controle ($124,50 \pm 2$ vs. $119,12 \pm 2$ mmHg, $p < 0,05$), sugerindo que o borneol atua apenas frente a um quadro patológico. O tratamento com o veículo não induziu alterações nos parâmetros avaliados.

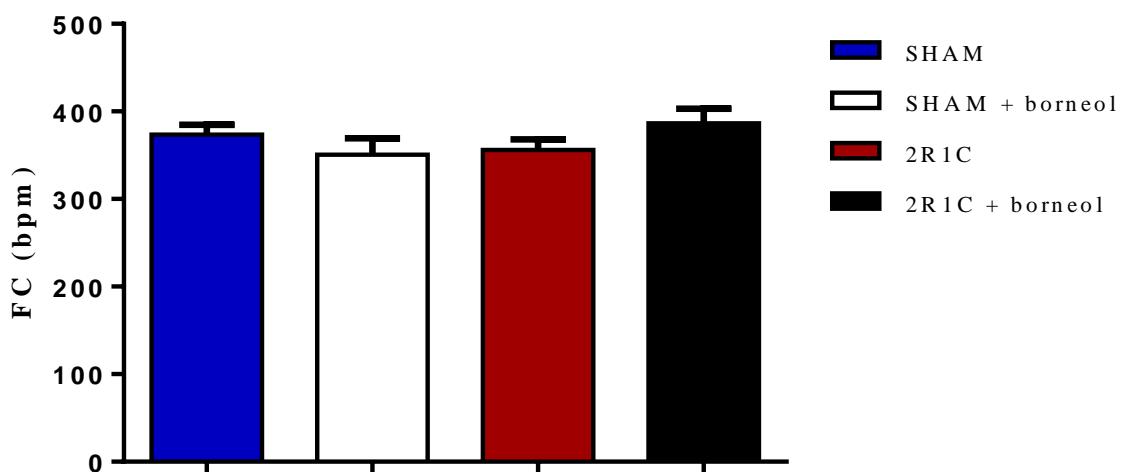
Gráfico 4 - Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a pressão arterial média (PAM).



Legenda: As barras verticais representam a média ± e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. SHAM) e # ($p < 0,05$ vs. 2R1C). SHAM, n=8; SHAM + borneol, n=6; 2R1C, n=7; 2R1C + borneol, n=7. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

Não houve diferença na FC entre os grupos avaliados (SHAM: $373,63 \pm 11$; SHAM + borneol: $350,5 \pm 19$ bpm; 2R1C: $355,98 \pm 12$ bpm; 2R1C + borneol: $386,25 \pm 17$ bpm) (Gráfico 5).

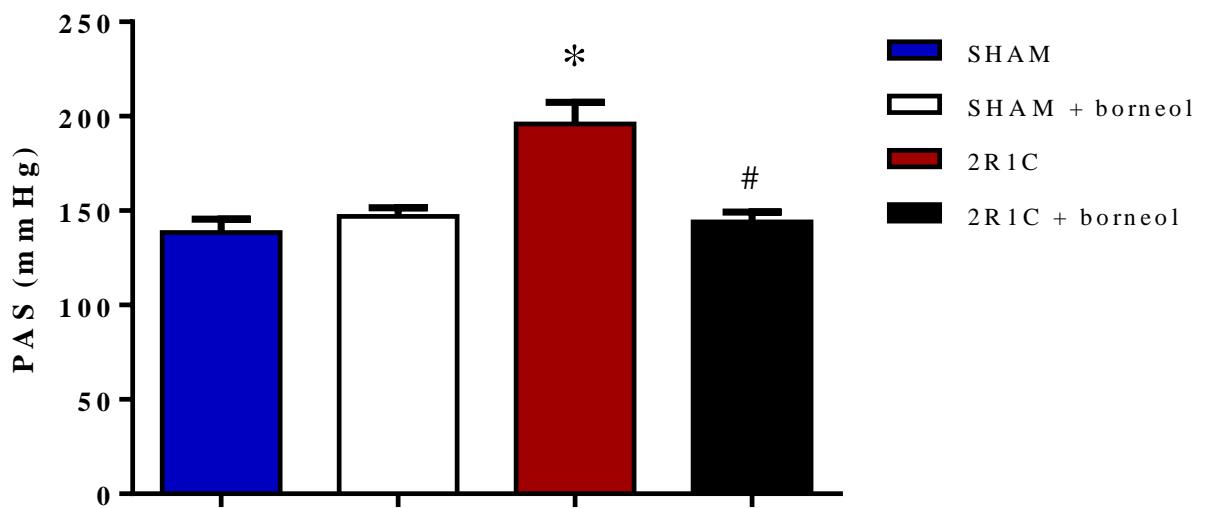
Gráfico 5 - Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a frequência cardíaca (FC).



Legenda: As barras verticais representam a média ± e.p.m. SHAM, n=8; SHAM + borneol, n=6; 2R1C, n=7; 2R1C + borneol, n=7. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

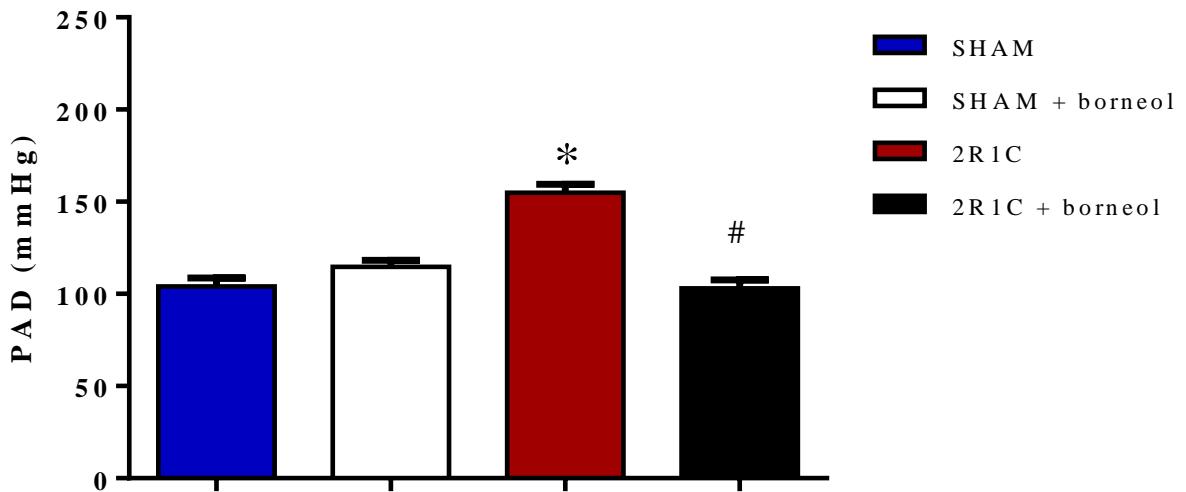
Adicionalmente, vimos efeitos semelhantes ao avaliar a PAS (Gráfico 6) e PAD (Gráfico 7) separadamente. Ambas foram maiores no grupo 2R1C em comparação ao grupo SHAM (PAS: $196 \pm 11,39$ vs. $138,4 \pm 7,2$ mmHg; PAD: $154,9 \pm 4,6$ vs. $104 \pm 4,6$ bpm, respectivamente, $p < 0,05$), o grupo 2K1C tratado com borneol apresentou os níveis de PAS e PAD ($144 \pm 5,3$ mmHg; $103,1 \pm 4,5$ bpm, respectivamente) semelhantes ao SHAM.

Gráfico 6 - Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a pressão arterial sistólica (PAS).



Legenda: As barras verticais representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. SHAM) e # ($p < 0,05$ vs. 2R1C). SHAM, n=8; SHAM + borneol, n=8; 2R1C, n=7; 2R1C + borneol, n=7. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

Gráfico 7 - Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a pressão arterial diastólica (PAD).



Legenda: As barras verticais representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. SHAM) e # ($p < 0,05$ vs. 2R1C). SHAM, n=8; SHAM + borneol, n=8; 2R1C, n=7; 2R1C + borneol, n=7. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

5.3 EFEITOS DO TRATAMENTO ORAL COM O BORNEOL NA FUNÇÃO AUTONÔMICA EM RATOS SHAM E 2R1C

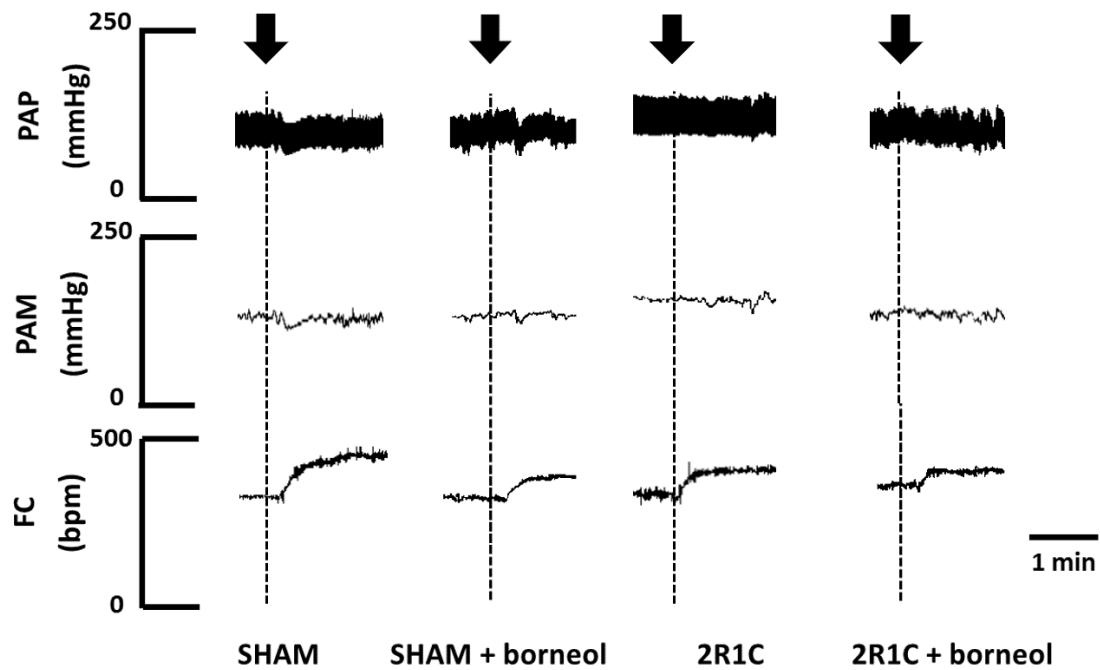
Com o intuito de avaliar a influência do tratamento com o borneol no controle autonômico da pressão arterial, realizou-se bloqueios na atividade parassimpática e simpática, utilizando atropina (2 mg/Kg) e hexametônio (30 mg/Kg), respectivamente.

A atropina é um antagonista muscarínico que impede a ação da acetilcolina, liberada pelo sistema nervoso autônomo parassimpático, em seus órgãos alvos. No coração a atropina bloqueia a atividade parassimpática, por antagonizar os receptores muscarínicos do tipo M₂ presentes nas células do nó sinoatrial e atrioventricular, o que culmina no aumento da frequência cardíaca.

Os dados referentes ao componente parassimpático da função autonômica estão apresentados no gráfico 8. Pode ser observado que o grupo 2R1C apresentou um ΔFC inferior ao observado para o grupo SHAM ($54,73 \pm 8,546$ vs. $116,9 \pm 11,44$ bpm, respectivamente; $p < 0,05$), esse efeito era esperado, uma vez que na hipertensão arterial há um aumento da atividade simpática associado a uma diminuição da atividade parassimpática (LERMAN et al., 2005), logo o bloqueio da atividade parassimpática com a atropina no grupo hipertenso

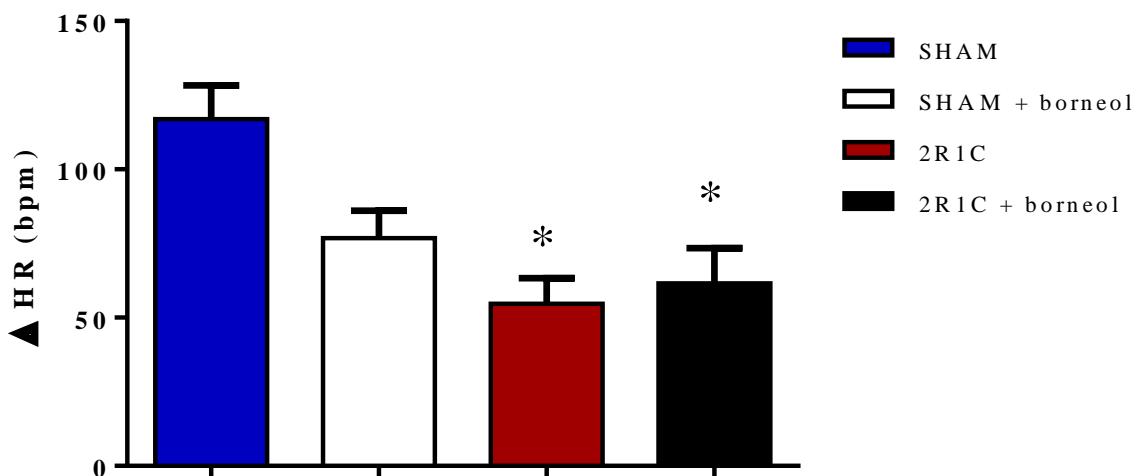
exerce pouca influência na FC. O tratamento oral com o borneol (125 mg/Kg/dia) não foi capaz de melhorar significativamente este componente.

Figura 8 - Traçados representativos de um animal de cada grupo demonstrando a avaliação da atividade parassimpática.



Legenda: A seta preta representa o momento da administração intravenosa de atropina.

Gráfico 8 - Influência do tratamento oral com o borneol no controle autonômico parassimpático.

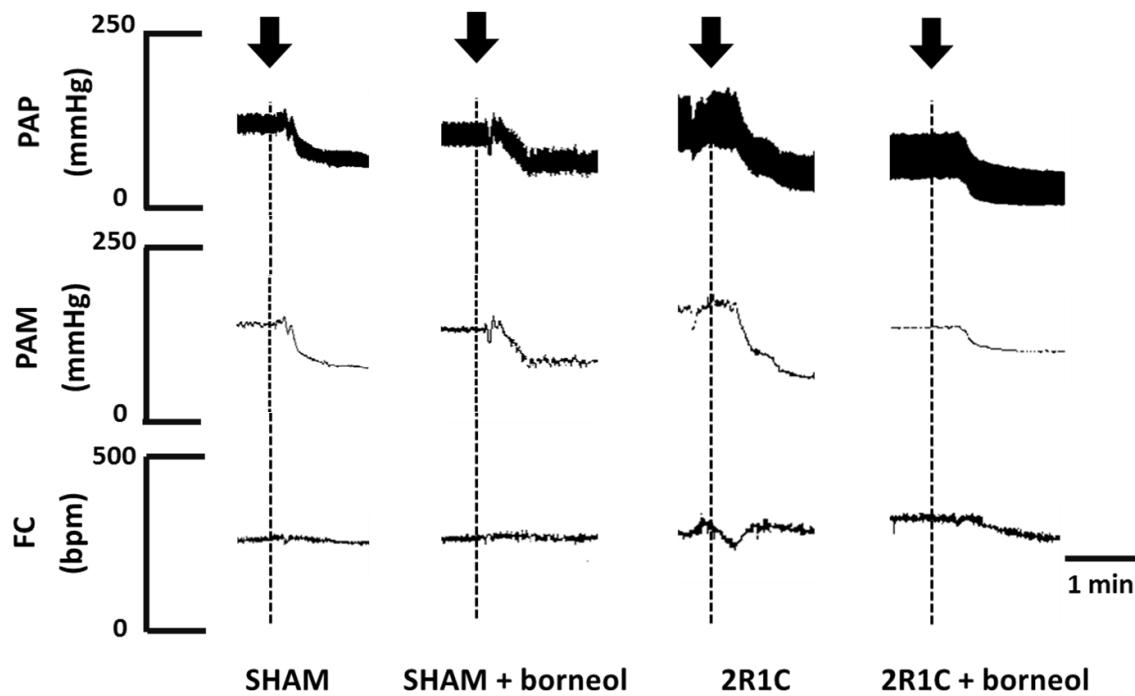


Legenda: As barras verticais representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. SHAM). SHAM, n=10; SHAM + borneol, n=8; 2R1C, n=6; 2R1C + borneol, n=8. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

O hexametônio, por sua vez, é um bloqueador nicotínico ganglionar, que quando usado cessa a função autonômica. Contudo, diferentemente de como é feito quando se utiliza a atropina, o parâmetro observado após o uso do hexametônio, com o objetivo de avaliar o componente simpático, é a pressão arterial média dos animais, uma vez que na maioria dos vasos só existe inervação simpática. O efeito do hexametônio na PAM dos animais dos diferentes grupos avaliados é demonstrado nos traçados representativos na figura 9 e no gráfico 9.

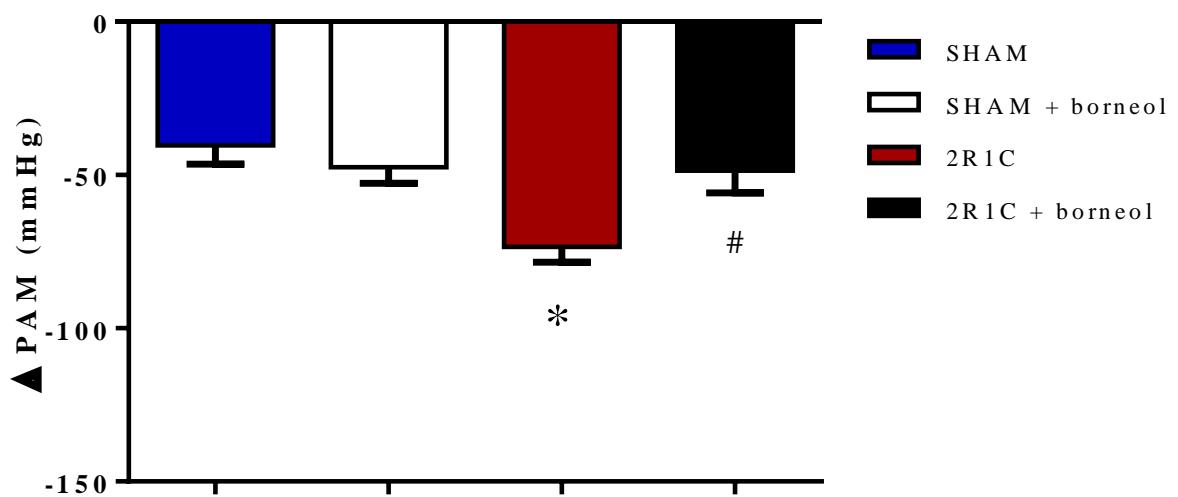
Neles observamos que a administração do hexametônio no grupo 2R1C induziu a uma maior diminuição dos valores de PAM, quando comparado aos animais SHAM ($-73,43 \pm 4,969$ vs. $-40,29 \pm 6,144$ mmHg, $p < 0,05$), demonstrando a hiperatividade simpática no grupo 2R1C. O tratamento com o borneol no grupo 2R1C + borneol previnu esse efeito ($-48,525 \pm 7,289$; $p < 0,05$), igualando-se estatisticamente ao grupo SHAM. Este dado sugere que o tratamento oral com o borneol (125 mg/Kg/dia) é capaz de diminuir a hiperatividade simpática, característica do grupo com hipertensão 2R1C.

Figura 9 - Traçados representativos de um animal de cada grupo demonstrando a avaliação da atividade simpática.



Legenda: A seta preta representa o momento da administração intravenosa de hexametônio.

Gráfico 9 - Influência do tratamento com o borneol no controle autonômico simpático.

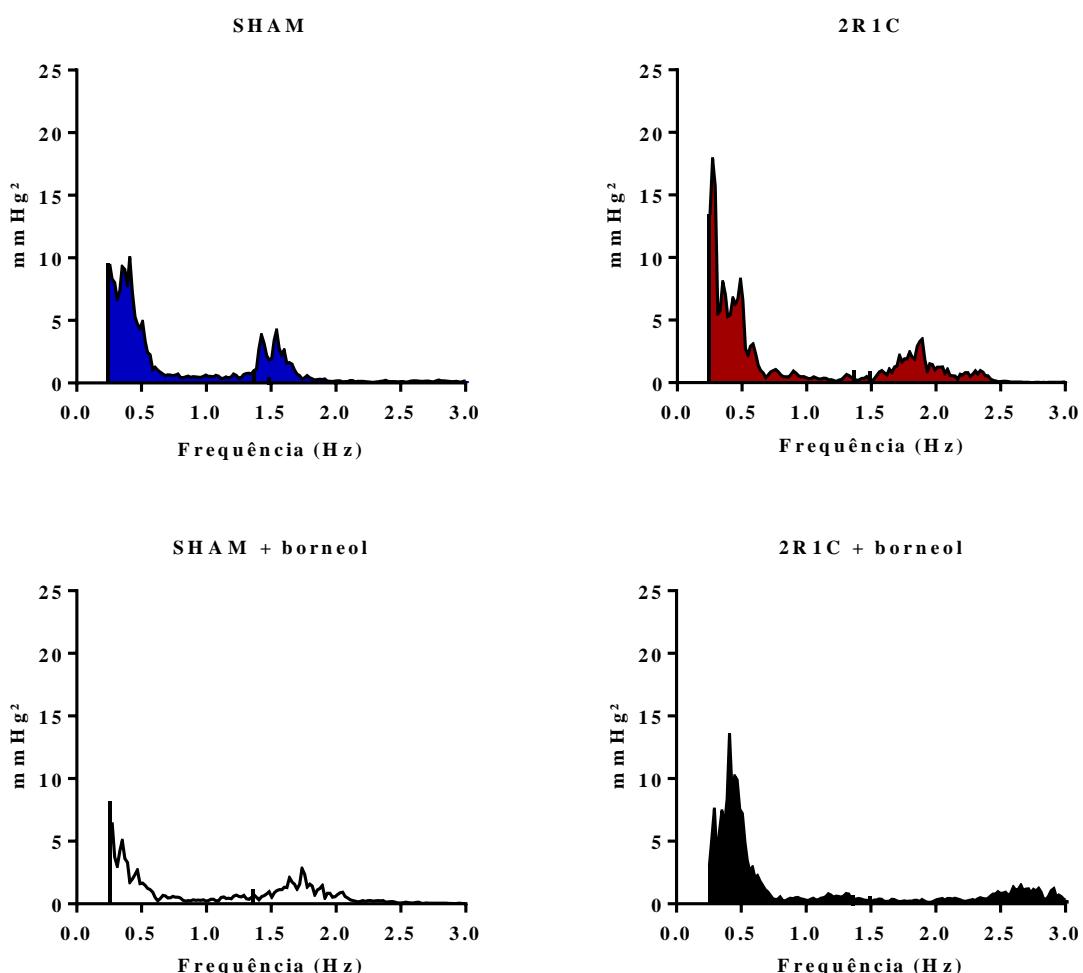


Legenda: As barras verticais representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. SHAM) e # ($p < 0,05$ vs. 2R1C). SHAM, n=3; SHAM + borneol, n=8; 2R1C, n=6; 2R1C + borneol, n=8. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

5.4 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM O BORNEOL NO ESPECTRO DE BAIXA FREQUÊNCIA, ALTA FREQUÊNCIA E ÍNDICE SIMPATOVAGAL

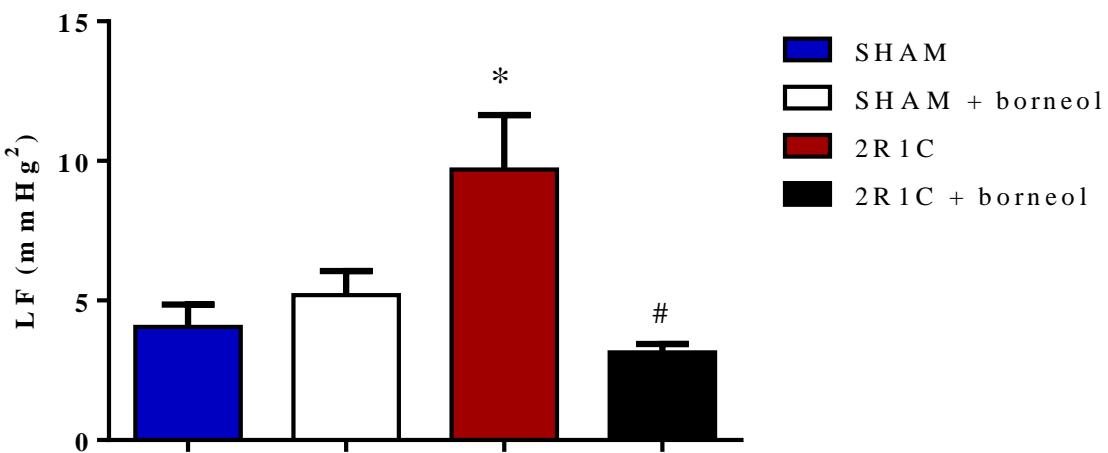
Para confirmar as alterações na atividade vasomotora simpática, foi avaliada a variabilidade da PA por meio da análise da faixa LF (0.2–0.75 Hz) de todos os grupos. Os espectros representativos (Figura 10) destacam o aumento esperado da oscilação na faixa LF em 2R1C em comparação com ratos SHAM, o mesmo é possível observar no gráfico 10 ($9,69 \pm 1,93$, $n = 7$ vs. $4,05 \pm 0,79$ mmHg 2 , $n = 8$, $p < 0,05$, respectivamente). O tratamento com borneol diminuiu a magnitude da oscilação na faixa de LF em 2R1C ($3,14 \pm 0,29$ mmHg 2 , $n = 7$, $p < 0,05$) e não produziu mudanças significativas em ratos SHAM + borneol ($n = 5$).

Figura 10: Traçados representativos da faixa LF e HF de um animal de cada grupo.



Legenda: Os traçados representam as oscilações na faixa LF (0.2–0.75 Hz) e HF (0.75–3.0 Hz) de um animal de cada grupo.

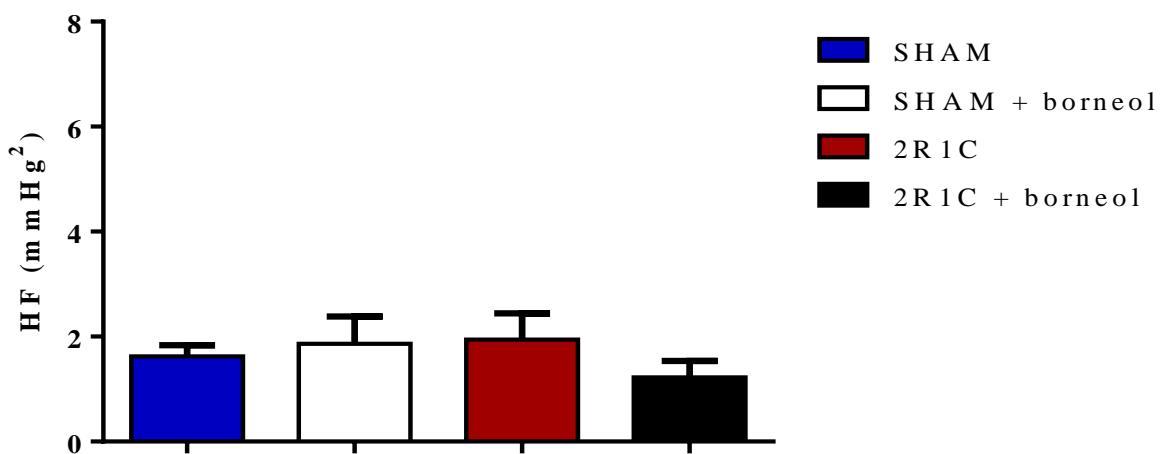
Gráfico 10: Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a oscilações na faixa LF.



Legenda: As barras verticais representam a média ± e.p.m do LF de cada grupo, onde * ($p < 0,05$ vs. SHAM) e # ($p < 0,05$ vs. 2R1C). SHAM, n=8; SHAM + borneol, n=7; 2R1C, n=7; 2R1C + borneol, n=7. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

Ao avaliar as bandas de alta frequência (HF), as quais estão relacionadas com o tônus parassimpático, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos avaliados (SHAM: $1,62 \pm 0,21$; SHAM + borneol: $1,86 \pm 0,52$; 2R1C: $1,94 \pm 0,49$; 2R1C + borneol: $1,22 \pm 0,3$ mmHg^2) (Gráfico 11).

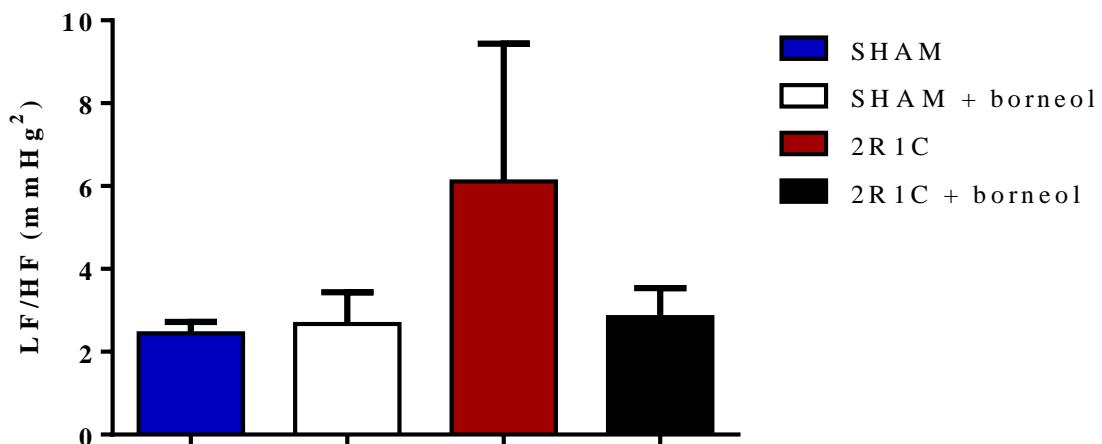
Gráfico 11: Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a oscilações na faixa HF.



Legenda: As barras verticais representam a média ± e.p.m do HF de cada grupo. SHAM, n=8; SHAM + borneol, n=7; 2R1C, n=7; 2R1C + borneol, n=7. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

Ainda, também foi avaliado o índice simpatovagal que é expresso como a razão entre LF e HF em mmHg². Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos avaliados (SHAM: $2,44 \pm 0,27$; SHAM + borneol: $2,67 \pm 0,76$; 2R1C: $6,10 \pm 3,32$; 2R1C + borneol: $2,83 \pm 0,69$ mmHg²) (Gráfico 12).

Gráfico 12: Efeito do tratamento oral com o borneol sobre o índice simpatovagal.

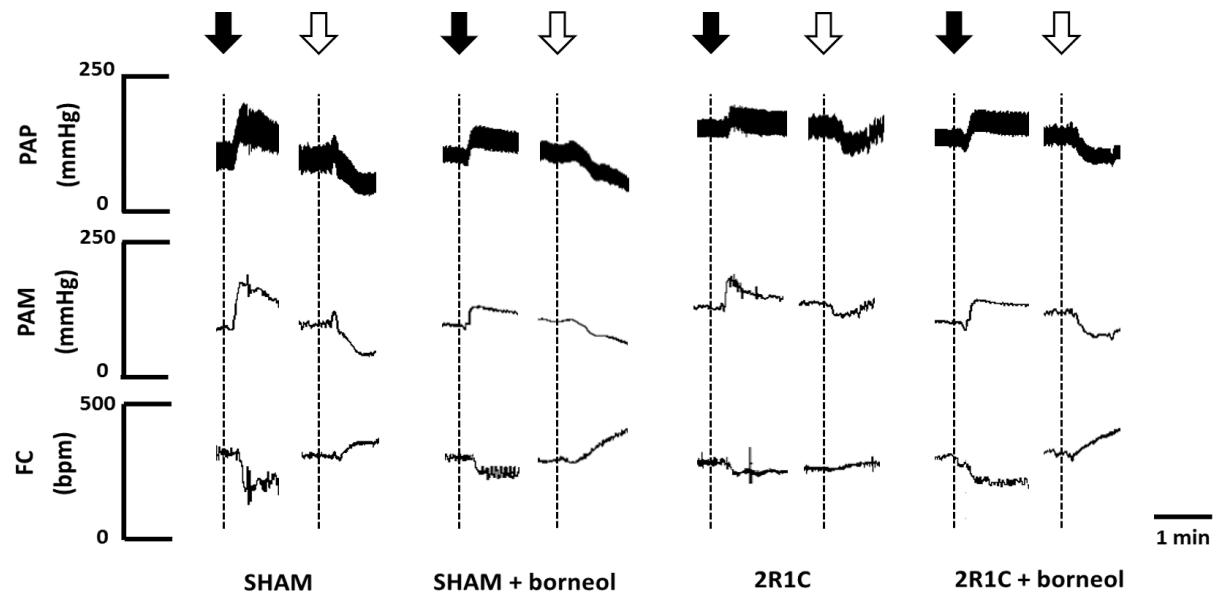


Legenda: As barras verticais representam a média \pm e.p.m do índice simpatovagal (LF/HF) de cada grupo. SHAM, n=8; SHAM + borneol, n=7; 2R1C, n=7; 2R1C + borneol, n=7. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

5.5 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM O BORNEOL NA SENSIBILIDADE DO BARORREFLEXO EM RATOS SHAM E 2R1C

A figura 11 mostra os traçados representativos da PAP, PAM e FC de um animal de cada grupo (SHAM, SHAM + borneol, 2R1C, 2R1C + borneol) durante a avaliação da sensibilidade do barorreflexo induzido farmacologicamente.

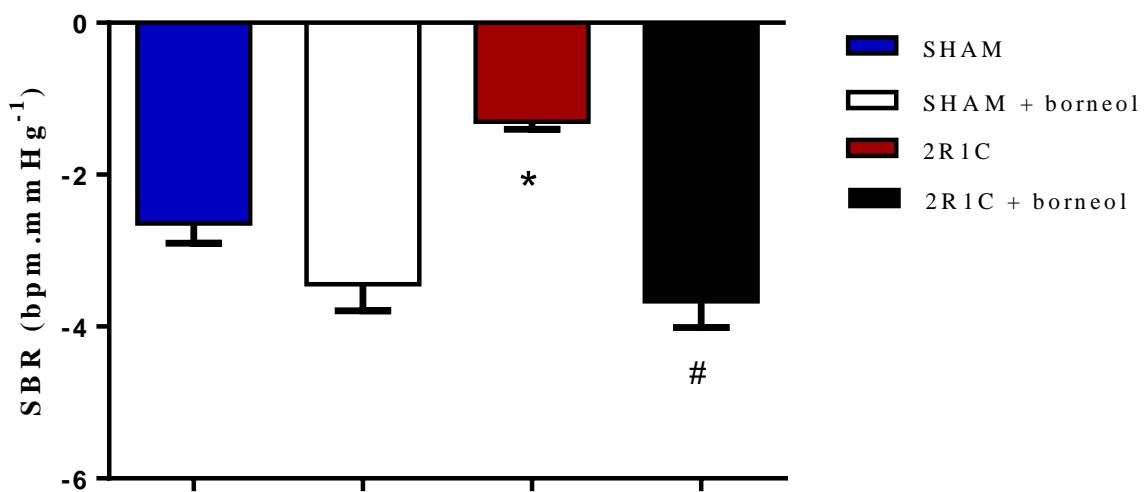
Figura 11 - Traçado representativo de um animal de cada grupo na avaliação do barorreflexo induzido.



Legenda: A seta preenchida representa a administração intravenosa de fenilefrina, enquanto a seta vazada representa a administração intravenosa de nitroprussiato de sódio.

Observando o Gráfico 13, referente a média dos dados da sensibilidade do barorreflexo induzido (SBR) de todos os animais, é possível perceber uma diminuição da sensibilidade do barorreflexo no grupo 2R1C quando comparado ao grupo SHAM ($-1,3 \pm 0,1$ vs. $-2,6 \pm 0,3 \text{ bpm.mmHg}^{-1}$, $p < 0,05$). Pode-se, também, notar que o tratamento oral com o borneol (125 mg/Kg/dia) foi capaz de melhorar a sensibilidade do barorreflexo do grupo hipertenso (2R1C + borneol), quando comparamos com o grupo 2R1C ($-3,6 \pm 0,3$ vs. $-1,3 \pm 0,1 \text{ bpm.mmHg}^{-1}$, $p < 0,05$).

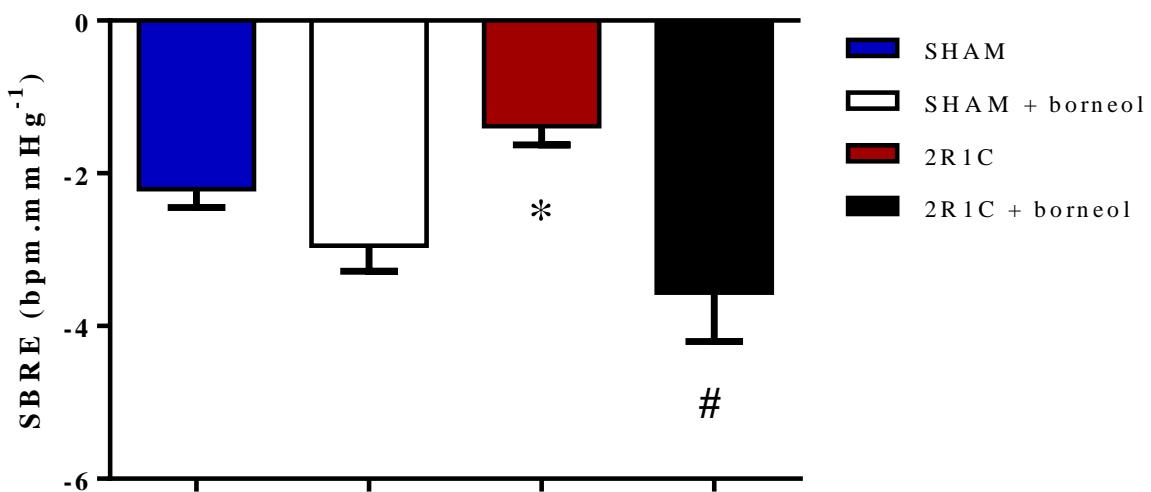
Gráfico 13 - Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a sensibilidade do barorreflexo induzido por drogas vasoativas.



Legenda: As barras verticais representam a média \pm e.p.m do slope de cada grupo, obtido pela $\Delta FC/\Delta PAM$, onde * ($p < 0,05$ vs. SHAM) e # ($p < 0,05$ vs. 2R1C). SHAM, n=10; SHAM + borneol, n=8; 2R1C, n=4; 2R1C + borneol, n=7. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

Corroborando com o que foi visto no dado anterior, os dados referentes a sensibilidade do barorreflexo espontâneo (SBRE), apresentados no gráfico 14, mostram que o grupo 2R1C apresentou um ganho do barorreflexo espontâneo inferior em comparação com os animais do grupo SHAM ($-1,38 \pm 0,24$ vs. $-2,20 \pm 0,23$ bpm.mmHg $^{-1}$, $p < 0,05$). O tratamento oral com o borneol (125 mg/Kg/dia) induziu melhora significativa na sensibilidade do barorreflexo durante a hipertensão 2R1C ($-3,56 \pm 0,64$ vs. $-1,38 \pm 0,24$ bpm.mmHg $^{-1}$, $p < 0,05$). Portanto, os dados apresentados até o momento sugerem o papel do borneol em restaurar a sensibilidade do barorreflexo em animais com hipertensão 2R1C, sem alterar sua função em condições normais, como visto nos animais SHAM + borneol, onde este monoterpeno não produziu alteração.

Gráfico 14 - Efeito do tratamento oral com o borneol sobre a sensibilidade do barorreflexo espontâneo.

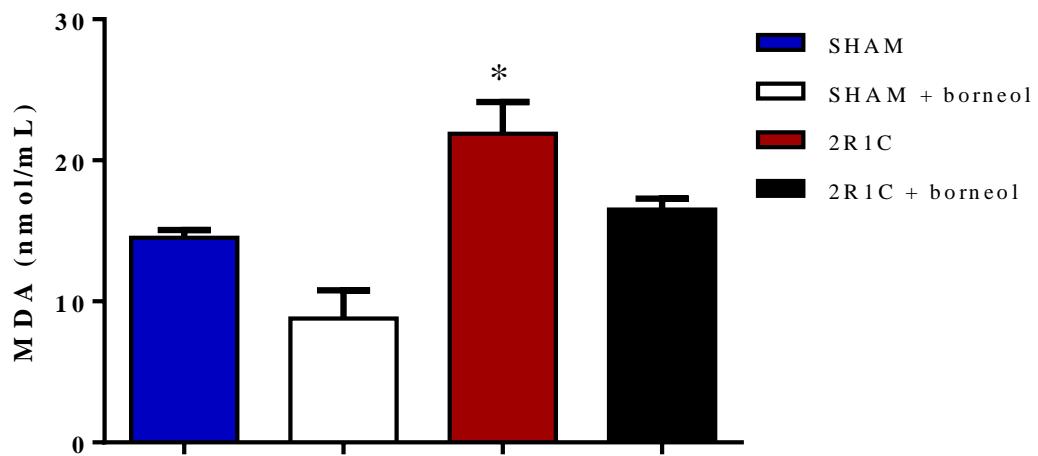


Legenda: As barras verticais representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. SHAM) e # ($p < 0,05$ vs. 2R1C). SHAM, n=7; SHAM + borneol, n=8; 2R1C, n=6; 2R1C + borneol, n=9. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

5.6 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM O BORNEOL NO ESTRESSE OXIDATIVO SÉRICO DE RATOS SHAM E 2R1C

No ensaio de reação ao TBA, a concentração de MDA é utilizada como indicador do estresse oxidativo sistêmico. O MDA foi medido de amostras de soro obtidos do sangue dos animais utilizados neste trabalho. Como mostrado no gráfico 15, o grupo 2R1C apresentou maiores concentrações de MDA quando comparado ao SHAM ($21,88 \pm 2,25$ vs. $14,53 \pm 0,54$ nmol/ml, $p < 0,05$), sugerindo um maior estresse oxidativo sérico na hipertensão renovascular, como esperado. Entretanto, o tratamento oral durante 14 dias com o borneol não foi capaz de promover alterações significativas ($16,50 \pm 0,76$ nmol/ml).

Gráfico 15 - Efeito do tratamento oral com o borneol sobre o estresse oxidativo sérico.



Legenda: As barras verticais representam a média \pm e.p.m, onde * ($p < 0,05$ vs. SHAM). SHAM, n=4; SHAM + borneol, n=6; 2R1C, n=6; 2R1C + borneol, n=3. A diferença entre os grupos foi analisada por Anova One Way seguida do pós-teste de Tukey.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostra os efeitos induzidos pelo tratamento oral durante 14 dias com o borneol sobre o sistema cardiovascular de ratos com hipertensão renovascular. O conjunto de dados obtidos demonstram que o borneol exerce atividade anti-hipertensiva associada à redução da atividade simpática e melhora da sensibilidade do barorreflexo desses animais. Não foram observadas alterações significativas entre os animais SHAM tratados, sugerindo que o borneol possui efeitos relevantes apenas na presença da hipertensão.

Como produto natural, o borneol possui baixa toxicidade com LD₅₀, dose letal capaz de matar 50% da população de animais, de 5800 mg/Kg em roedores (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1201518>). Em nossos ensaios iniciais, com a dose de 125 mg/Kg diluídos em óleo mineral, os animais mantiveram seus padrões de alimentação, ingestão de água e ganho de peso, sem apresentar alterações relevantes entre os grupos.

No modelo animal de hipertensão 2R1C observa-se uma redução do fluxo sanguíneo renal, reduzindo a taxa de filtração glomerular, o que ao longo de seis semanas promove a perda de massa no rim clipado associado a uma hipertrofia do rim não clipado, o que foi observado nos nossos animais 2R1C. Esta redução do fluxo aciona o SRAA, elevando os níveis de Ang II circulante, que por sua vez, proporciona um aumento na reabsorção de sódio e água; vasoconstrição; aumento da produção de EROs, entre outros efeitos, que em conjunto aumentam os níveis pressóricos (MARTINEZ-MALDONADO, 1991; CARVALHO-GALVÃO et al. 2018; 2019).

No nosso trabalho, demostramos que os animais 2R1C exibiam níveis elevados de PAM, assim como PAS e PAD, corroborando com outros autores (CAVALCANTI et al., 2016; CARVALHO-GALVÃO et al., 2018; 2019). Também mostramos que o tratamento por 14 dias com o borneol foi capaz de reduzir os níveis elevados de PAM, PAS e PAD nos animais com hipertensão renovascular, sem alterações dos animais SHAM, demonstrando a atuação do borneol apenas frente à hipertensão. Esse efeito anti-hipertensivo pode estar relacionado com a melhora de diversos fatores chaves para a hipertensão, como por exemplo atividade simpática elevada, disfunção do barorreflexo, alteração na função vascular ou perfil oxidativo (CAMPOS 2009; KUMAR et al., 2010; CAMARGO et al., 2018; CARVALHO-GALVÃO et al. 2018; 2019).

De forma geral, os monoterpenos apresentam uma variedade de efeitos relevantes sobre diversos sistemas, em especial o sistema cardiovascular. Por exemplo, em ensaios recentes foi demonstrado que o linalol apresenta um efeito anti-hipertensivo em ratos espontaneamente hipertensos atribuído às propriedades cardiovasculares da molécula, e sendo até comparado a fármacos referência como o captopril (CAMARGO et al., 2018). Adicionalmente, Bastos et al. (2010), atribuiu ao citronelol um efeito hipotensor em ratos normotensos e um efeito vasorelaxante em artéria mesentérica de ratos. O mesmo foi observado com o terpineol (MAGALHÃES et al., 1998; RIBEIRO et al., 2010). Outros estudos já relacionam alguns efeitos benéficos do borneol em outros modelos de hipertensão (KUMAR et al., 2010; SILVA-FILHO, 2011; SANTOS, 2019).

Nos ensaios de Silva-Filho et al. (2011) e Santos et al. (2019) o borneol apresentou um efeito relaxante em anéis isolados de artéria torácica de ratos normotensos. Compartilhando da mesma ideia, dados ainda não publicados do nosso grupo mostraram o mesmo efeito vasorrelaxante deste monoterpeno em anéis isolados de artéria mesentérica de animais normotensos e 2R1C. Ainda foi observado que este efeito relaxante envolve a redução do influxo de cálcio nas células musculares lisas. Logo, sugerimos que a capacidade de reduzir a RVP seja responsável, ao menos em parte, pelo efeito anti-hipertensivo do borneol.

É bem descrito na literatura que a alta concentração de Ang II estimulada pela superativação do SRAA nos rins de animais 2R1C promove alterações centrais, especialmente em regiões importantes no controle da PA como o eixo SFO-PVN-RVLM, causando o desequilíbrio na função autonômica e disfunção do barorreflexo (BOTELHO-ONO et al., 2011; BRAGA et al., 2011; CARVALHO-GALVÃO et al. 2018; 2019). A Ang II periférica é capaz de acessar o SNC tanto pela alteração da permeabilidade em regiões providas de barreira hematoencefálica, quanto em regiões desprovidas de barreira, como nos órgãos circunventriculares (BIANCARD et al., 2016). A ação da Ang II em receptores AT₁ presentes no SFO estimula a produção de Ang II central e aumenta a ação desse peptídeo em outras regiões como o PVN e o RVLM. A ligação da Ang II ao AT₁R ativa a NADPH oxidase, elevando assim a produção das EROs (SAAVEDRA, 2005; BOTELHO-ONO et al., 2011; BRAGA et al., 2011; 2012 GUIMARÃES; CARVALHO; BRAGA, 2012). Desta forma, o aumento de EROs nessas regiões é a principal causa do aumento da descarga simpática à periferia e redução na sensibilidade do barorreflexo.

Nesse contexto, foram realizados ensaios para avaliar a função autonômica parassimpática e simpática periférica, bem como avaliar a sensibilidade do reflexo barorreceptor. A atividade autonômica é responsável por controlar diversas funções corporais involuntárias, como respiração, digestão, temperatura e circulação sanguínea. No contexto do sistema cardiovascular o tônus simpático controla o tônus da musculatura lisa dos vasos, assim como a liberação de hormônios importantes no sistema cardiovascular, como a Ang II. Durante a hipertensão há um desequilíbrio na função autonômica, em que o tônus simpático está aumentado e o parassimpático está reduzido (CAVALCANTI et al., 2016; CARVALHO-GALVÃO et al., 2018). Em nossos resultados, os animais 2R1C apresentaram uma elevação do tônus simpático associado a uma redução da função parassimpática, o que corrobora com outros achados da literatura que demonstram uma hiperatividade simpática no modelo de hipertensão renovascular (BRAGA et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2016; CARVALHO-GALVÃO et al., 2018). Observamos ainda que o tratamento oral por 14 dias com o borneol é capaz de reduzir a hiperatividade simpática atribuída a esse modelo de hipertensão sem influenciar na atividade parassimpática, sugerindo que o borneol atua apenas frente ao desequilíbrio do tônus simpático característico da hipertensão renovascular, visto que também não demonstrou alterações entre os animais SHAM. Ao analisar a variabilidade da pressão arterial por análise espectral observou-se um aumento das bandas LF nos animais 2R1C sugerindo tônus simpático elevado, o que também foi demonstrado por CARVALHO-GALVÃO et al. (2018), e o tratamento com o borneol foi capaz de reduzir esse parâmetro, o que suporta o último resultado citado. Ainda, o borneol não produziu nenhuma alteração nas bandas HF e no índice simpatovagal em animais 2R1C, o que ajuda a confirmar sua não participação na modulação do tônus parassimpático.

É descrito que os barorreceptores possuem a capacidade de se adaptar à níveis de PA elevados de forma persistente por um período de tempo, alterando seu limiar de sensibilidade e aumentando sua variação de atuação (KRIEGER, 1989). Além disso, na hipertensão existe outro fenômeno conhecido como disfunção do barorreflexo caracterizado pelo prejuízo e redução na sensibilidade deste reflexo, ou seja, os ajustes reflexos ocorrem em menor escala (BRAGA et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2016). O comprometimento na função do barorreflexo na hipertensão pode ser atribuído a alterações morfológicas dos barorreceptores aórticos e carotídeos, mudanças mecanoelásticas dos vasos, prejuízo na ativação de canais iónicos e disfunção endotelial (KRAUHS, 1979; KIMANI, 1995; TU, ZHANG, LI, 2019). Além disso, como mencionado, as EROs possuem um papel importante no prejuízo da

sensibilidade do barorreflexo, pois está relacionada com mudanças no padrão de excitação neuronal nas regiões de controle da PA e, consequente, elevação da descarga simpática para a periferia (BRAGA et al., 2011; 2012). Em nossos dados, observamos uma diminuição da sensibilidade do barorreflexo induzido farmacologicamente e o espontâneo nos animais do grupo 2R1C, o que também é bem descrito na literatura para este modelo de hipertensão renovascular (BRAGA et al., 2012; CAVALCANTI et al., 2016). E, interessantemente, o borneol foi capaz de induzir uma melhora na sensibilidade do reflexo barorreceptor desses animais.

Esses efeitos benéficos do borneol sobre a atividade autonômica e sensibilidade do barorreflexo podem estar relacionados aos seus efeitos anti-hipertensivos e vasorrelaxantes. Todavia, também tem sido atribuído ao borneol um papel antioxidante no modelo de hipertensão L-NAME (KUMAR et al., 2010), embora outros estudos não tenham demonstrado a capacidade antioxidante dessa molécula (HORVATHOVA et al., 2014). Corroborando com este último estudo, investigamos o efeito antioxidante do borneol na hipertensão renovascular e o composto não promoveu redução do estresse oxidativo sérico. No nosso ensaio, utilizamos a técnica de reação ao TBA, o qual reage com um indicador do estresse oxidativo formando um complexo vermelho (KUMAR et al., 2010; CAVALCANTI et al., 2016). A peroxidação lipídica é um processo bioquímico na qual as EROs catalisam a degradação oxidativa dos lipídeos de membrana celular, durante a hipertensão essa reação é intensificada pela alta concentração sistêmica de EROs (SHARMA et al., 2016). Essa reação tem como um de seus produtos finais o MDA, composto que serve como biomarcador do nível de estresse oxidativo ao reagir com o TBA (CAVALCANTI et al., 2016). Em nossos achados, os animais 2R1C apresentaram uma maior concentração de MDA, indicando estar sobre maior estresse oxidativo, enquanto o tratamento durante 14 dias com o borneol não conseguiu diminuir o estresse oxidativo. Desse modo, descartamos que o borneol tenha um efeito antioxidante e que isso esteja relacionado aos outros efeitos do borneol na pressão arterial, atividade simpática e sensibilidade do barorreflexo. Acreditamos que o próprio efeito anti-hipertensivo do borneol, ocasionado pela capacidade vasorrelaxante mencionada na literatura, esteja por trás da redução da atividade simpática e melhora da sensibilidade do barorreflexo.

Vale ressaltar que o borneol, devido a sua baixa massa molecular e lipossolubilidade, é capaz de atravessar e alterar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, sendo utilizado para entrega de outras substâncias no SNC (ZHANG et al., 2017; HOU et al., 2017; ZHENG

et al., 2018; WU et al., 2018; XIONG et al., 2013; WANG et al., 2014). Os estudos de Liang et al., 1993 e Li et al., 2012 mostram que o borneol administrado oralmente rapidamente acessa o SNC podendo estar na mesma concentração encontrada no sangue em cerca de cinco minutos e atingindo sua concentração máxima em uma hora. Essas características sugerem uma possível atuação do borneol a nível central, logo podendo exercer seus efeitos diretamente em núcleos importantes para a modulação da PA. Para tanto, estudos futuros são necessários a fim de averiguar essa hipótese.

Os produtos naturais tem ganhado cada vez mais destaque no tratamento de diversas doenças, pois incluem uma grande variedade de substâncias com efeitos interessantes (MAGALHÃES et al., 1998; BASTO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010; CAMARGO et al., 2018). Com o borneol não é diferente, nossos resultados atribuem a ele alguns desses efeitos sobre a hipertensão renovascular, alimentando seu potencial como ferramenta para combater a hipertensão arterial e demais desordens cardiovasculares, havendo, por isso, um estímulo para a síntese química deste composto. Contudo, outras abordagens experimentais ainda precisam ser exploradas visando ampliar o conhecimento acerca dos mecanismos responsáveis pelos efeitos do borneol observados neste trabalho.

Considerações finais

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do que foi apresentado é possível afirmar que o borneol, administrado oralmente durante 14 dias, exerce ação anti-hipertensiva no modelo de hipertensão renovascular (2R1C) sem promover alterações na frequência cardíaca. Ainda, o borneol diminuiu a hiperatividade simpática e promoveu uma melhora na sensibilidade do barorreflexo. Estes efeitos podem estar relacionados com a atividade vasorrelaxante atribuída a este composto em estudos disponíveis na literatura. Adicionalmente, não foi observada nenhuma alteração significativa do tratamento oral com o borneol nos animais SHAM, sugerindo que este monoterpeno exerce seus efeitos apenas diante do quadro patológico.

Os resultados obtidos ampliam o nosso conhecimento sobre o papel do borneol no sistema cardiovascular e justifica o seu potencial na busca de alternativas terapêuticas para o tratamento da hipertensão arterial. São, portanto, necessárias mais pesquisas destinadas ao aprofundamento dos mecanismos pelos quais o borneol promove os efeitos demonstrados. Mais precisamente, avaliando seu papel frente a desregulação neuronal ocasionada pela hipertensão em regiões como o eixo SFO-PVN-RVLM, bem como seu efeito sobre correntes de íons em células neuronais. Além disso avaliar se seus efeitos demonstrados em ensaios com animais também se refletem em humanos hipertensos.

REFERÊNCIAS

- ACCORSI-MENDONÇA, D; SILVA, M. P.; SOUZA, G. M. P. R.; LIMA-SILVEIRA, L.; KARLEN-AMARANTE, M.; AMORIM, M. R.; ALMADO, C. E. L.; MORAES, D. J. A.; MACHADO, B. H. Pacemaking Property of RVLM Presynaptic Neurons. **Frontiers in Physiology**. v. 7, p. 1-9. 2016.
- ALMEIDA, J. R.; SOUZA, G. R.; SILVA, J. C.; SARAIVA, S. R.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. G.; QUINTANS, J. S.; BARRETO, R. S.; BONJARDIM, L. R.; CAVALCANTI, S. C.; QUINTANS JÚNIOR, L. J. Borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, reduces nociceptive behavior and inflammatory response in mice. **Scientific World Journal. Hindawi Publishing Corporation**. p. 1-5, 2013.
- ALVES, N. F. B., PORPINO S. K. P., MONTEIRO M. M. O., GOMES E. R. M., BRAGA V. A. Coconut oil supplementation and physical exercise improves baroreflex sensitivity and oxidative stress in hypertensive rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** v. 400, p. 393–400, 2015.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION. High blood pressure redefined for first time in 14 years: 130 is the new high (2017). Disponível: <http://newsroom.heart.org/news/high-blood-pressure-redefined-for-first-time-in-14-years-130-is-the-new-high?utm_campaign=science-news-1718&utm_source=science-news&utm_medium=phd-link&utm_content=phd11-13-17_hn-gl>. Acessado em: 17 de março de 2019.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION. High blood pressure redefined for first time in 14 years: 130 is the new high (2017). Disponível: <http://newsroom.heart.org/news/high-blood-pressure-redefined-for-first-time-in-14-years-130-is-the-new-high?utm_campaign=science-news-1718&utm_source=science-news&utm_medium=phd-link&utm_content=phd11-13-17_hn-gl>. Acessado em: 12 de junho de 2020.
- ANJOS, P. J. C.; LIMA, A. O.; CUNHA, P. S.; SOUSA, D. P.; ONOFRE, S. C.; RIBEIRO, T. P.; MEDEIROS, I. A.; ANTONIOLLA, Â. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTOS, M. R. V. Cardiovascular effects induced by linalool in normotensive and hypertensive rats. **Journal of Biosciences**, v. 68, p. 0181, 2013.
- AYDIN, Y.; KUTLAY, O.; ARI, S.; DUMAN, S.; et al. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. **Planta Med**, v. 73, p. 1365-1371, 2007.
- BADER M. Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: targets for pharmacological therapy. **Annu. Rev. Toxicol.**, 50, 439-465, 2010.
- BASTOS, J. F.; MOREIRA, I. J.; RIBEIRO, T. P.; MEDEIROS, I. A.; ANTONIOLLI, A. R.; DE SOUSA, D. P.; SANTOS, M. R. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 106, p. 331-337, 2010.
- BIANCARD, V. C.; STERN, J. E. Compromised blood-brain barrier permeability: novel mechanism, by which circulating angiotensin II signals to sympathoexcitatory centers during hypertension. **J. Physiol.**, v. 594, p. 1591-1600, 2016.
- BIANCARDI, V. C.; SON, S. J.; AHMADI, S.; FILOSA, J. A.; STERN, J. E. Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. **Hypertension**. v. 63, p. 572–579, 2014.

BOOGAARD, P. J; GOYAK, K. O; BILES, R. W; STEE, L. L. P; MILLER, M. S; MILLER, M. J. Comparative toxicokinetics of low-viscosity mineral oil in Fischer 344 rats, Sprague-Dawley rats, and humans – Implications for an acceptable daily intake (ADI). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 63, p. 69–77, 2012.

BOTELHO-ONO, M. S; PINA, H. V; SOUSA, K. H. F; NUNES, F. C; MEDEIROS, I. A; BRAGA, V. A. Acute superoxide scavenging restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Auton.Neurosci.**, v.159, p. 38–44, 2011.

BRAGA, V. A. Depressed Baroreflex Sensitivity in Hypertensive Rats: A Role for Reactive Oxygen Species. **J. Hypertens.**, v.1, e103, 2012.

BRAGA, V. A; MEDEIROS, I. A; RIBEIRO, T. P; FRANÇA-SILVA, M. S; BOTELHO-ONO, M. S; GUIMARÃES, D. D. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research on line**, v. 44, p. 871-876, 2011.

CAMARGO, S. B; SIMÕESA, L.O; MEDEIROSA, C. F. A; JESUSA, A. J; FREGONEZE, J. B; EVANGELISTA, A; VILLARREAL, C. F; ARAÚJO, A. A. S; QUINTANS-JÚNIOR, L. J; SILVA, D. F. Antihypertensive potential of linalool and linalool complexed with β -cyclodextrin: Effects of subchronic treatment on blood pressure and vascular reactivity. **Biochemical Pharmacology**. v. 151, p. 38-46, 2018.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial; Cardiovascular reflexes and arterial hypertension. **Rev. bras. hipertens**, v. 8, n. 1, p. 30–40, mar. 2001.

CAMPOS, R. R. Oxidative stress in the brain and arterial hypertension. **Hypertension Research**, 32, p.1047-1048; 2009.

CARVALHO-GALVÃO, A, GUIMARÃES, D. D, ALVES, J. L. B, BRAGA, V. A. Central inhibition of tumor necrosis factor alpha reduces hypertension by attenuating oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla in renovascular hypertensive rats. **Frontiers in Physiology**. v. 10, p. 1-10. 2019.

CARVALHO-GALVÃO, A; OGUNLADE, B; XU, J; SILVA-ALVES, C. R. A; MENDES-JÚNIOR, L. G; GUIMARÃES, D. D; CRUZ, J. C; QUEIROZ, T. M; BALARINI, C. M; BRAGA, V. A; FILIPEANU, C. M; LAZARTIGUES, E; FRANÇA-SILVA, M. S. Central administration of TRV027 improves baroreflex sensitivity and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. **Clinical Science**. v. 132, p. 1513–1527. 2018.

CAVALCANTI, C. O., ALVES, R. R., DE OLIVEIRA, A. L., CRUZ, J. C., DE FRANÇA-SILVA, M. S., BRAGA, V. A., et al. Inhibition of PDE5 restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Front. Physiol.** 7, 15. 2016.

CERUTTI, C; GUSTIN, MP; PAULTRE, CZ; LO, M; JULIEN, C; VINCENT M, et al. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. **Am J Physiol.** 1991 Oct;261(4 Pt 2):H1292-9.

CHOBANIAN, A. V. *et al.* Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, p. 1206–1252, 2003.

CHOPRA, S; BABY, C; JACOB, J. J. Neuro-endocrine regulation of blood pressure. **India Journal of Endocrinology and Metabolism.** v. 15, n. Suppl4. p. S281-S288. 2011.

CORRÊA *et al.*, Alterações Autonômicas na Insuficiência Cardíaca: benefícios do exercício físico. **Rev. SOCERJ.** 21(2):106-111, 2008.

DONAUGHEY, T. L. O; RESTA, T. C; WAKER, B. R. Laboratory demonstration of baroreflex control of heart rate in conscious rats. **Advances in Physiology Education Published.** v. 26, n. 4, p. 309-316, 2002.

DUSSE, L. M. S; VIEIRA, L. M; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

ELMARAkBÝ, A.A., LOOMIS, E.D., POLLOCK, J.S., POLLOCK, D.M. NADPH Oxidase Inhibition Attenuates Oxidative Stress but Not Hypertension Produced by Chronic ET-1. **Hypertension**, 45(2), p. 283-287. 2005.

GOLDBLATT, H; LYNCH, J; HANZAL, R. F; SUMMERSVILLE, W. W. Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J Exp Med**, v.59, p.347-378, 1934.

GUIMARÃES, D. D; CARVALHO, C. C; BRAGA, V. A. Scavenging of NADPH oxidase-derived superoxide anions improves depressed baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.39, p. 373–378, 2012.

HARRISON, D. G; GONGORA, M. C. Oxidative stress and hypertension. **Med Clin North Am**, v. 93(3), p. 621 – 35, 2009.

HORVATHOVA, E; NAVAROVA, J; GALOVA, E; SEVCOVICOVA, A; CHODAKOVA, L; SNAHNICANOVA, Z; MELUSOVA, M; KOZICS, K; SLAMENOVA, D. Assessment of antioxidant, chelating, and dna-protective effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, p. 6632–6639. 2014.

HORVATHOVÁ, E; SLAMENOVÁ, D; LAMENOVÁ, D; MARSALKOVÁ, L; SRAMKOVA, M; WSÓLOVÁ, L. Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. **Food Chem Toxicol**, v. 47, p. 318–23, 2009.

HOU, T; LI, X; PENG, C. Borneol enhances the antidepressant effects of asiaticoside by promoting its distribution into the brain. **Neurosci Lett.** v. 12, p. 646:56-61. 2017.

IRIGOYEN, M. C. et al. Controle cardiovascular: regulação reflexa do sistema nervoso simpático. **Rev Brás Hipertens**, v. 8, p. 55-62, 2001.

KIMANI, J. K. Elastin and mechanoreceptor mechanisms with special reference to the mammalian carotid sinus. **Ciba Found Symp.** v. 192, p. 215–230, 1995.

KLOET, A. D; LIU, M; RODRÍGUEZ, V; KRAUSE, E.G; SUMNERS, C. Role of neurons and glia in the CNS actions of the renin-angiotensin systemin cardiovascular control. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 309, p. 444–458, 2015.

- KRAUHS, J. M. Structure of rat aortic baroreceptors and their relationship to connective tissue. **J Neurocytol.** v. 8, p. 401–414, 1979.
- KRIEGER, E. M. Neurogenic hypertension in the rat. **Circulation Research**, v.15, p. 511-521, 1964.
- KUMAR, M. S.; KUMAR, S; RAJA, B. Antihypertensive and antioxidant potential of borneol-A natural terpene in L-NAME – Induced hypertensive rats. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 1(3), p. 271 – 279, 2010.
- LERMAN, L. O; CHADE, A. R; SICA, V; NAPOLI, C. Animals models of hypertension: an overview. **J Lab Clin Med**, v. 146, p.160-173, 2005.
- LI, P.L., CHAO, Y.M., CHAN, S.H.H., CHAN, J.Y.H. Potentiation of baroreceptor reflex response by heat shock protein 70 in nucleus tractus solitarii confers cardiovascular protection during heatstroke. **Circulation**. 103, p. 2114-2119. 2001.
- LI, W. R; CHEN, R. Y; YANG, L; HUANG, T. L; XU, Q. W; MI, S. Q; WANG, R. Y. Pharmacokinetics of natural borneol after oral administration in mice brain and its effect on excitation ratio. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**. v. 37(1), p. 39-44, 2012.
- LI, X. C. ZHANG, J. ZHUO, J. L. The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases. **Pharmacol Res**. p. 21 – 38, 2017.
- LIANG, M. R; LIU, Q. D; HUANG, T. L; et al. The pharmacokinetic characteristics of borneol in serum and brain tissue of rats (Chinese). **Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol**. v. 4, p. 38–41, 1993.
- MAGALHÃES, P. J. C.; CRIDDLE, D. N.; TAVARES, R. A.; MELO, E. M.; MOTA, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of Croton nepetaefolius and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 172-177,1998.
- MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of Renovascular Hypertension. **Hypertension**, v. 17, p. 707-719, 1991.
- NOUBIAP, J. J; NANSEEU, J. R; NYAGA, U. F; SIME, P. S; FRANCIS, I; BIGNA, J. J. Global prevalence of resistant hypertension: a meta-analysis of data from 32 million patients. **Heart**. v. 105, p. 98–105. 2019.
- PEIXOTO-NEVES, D; SILVA-ALVES, K. S; GOMES, M. D; LIMA, F. C; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P.J. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 24, p. 341–50, 2010.
- RAVID, U; PUTIEVSKY, E; KATZIR, I. Stereochemical analysis of borneol in essential oils using permethylated fl-cyclodextrin as a chiral stationary phase. **Flavour Fragr J**, v. 11, p. 191–5, 1996.
- RIBEIRO, T. P.; PORTO, D. L.; MENEZES, C. P.; ANTUNES, A. A.; SILVA, D. F.; DE SOUSA, D. P.; NAKAO, L. S.; BRAGA, V. A.; MEDEIROS, I. A. Unravelling the cardiovascular effects induced by α -terpineol: A role for the nitric oxide-cGMP pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, p. 811- 816, 2010.

- SAAVEDRA, J. M., Brain angiotensin II: new developments, un- answered questions and therapeutic opportunities. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 25, p.485-512; 2005.
- SANTOS, S. E; RIBEIRO, F. P. R. A; MENEZES, P. M.N; DUARTE-FILHO, L. A. M; QUINTANS, J. S. S; QUINTANS-JUNIOR, L. J; SILVA, F. S; RIBEIRO, L. A. A. New insights on relaxant effects of (-)-borneol monoterpene in rat aortic rings. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 33, p. 148–158, 2019.
- SENA, C.M., MATAFOME, P., LOURO, T., NUNES, E., FERNANDES, R., SEIÇA, R.M. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. **British Journal of Pharmacology**, 163(2), p. 424-437. 2011.
- SHARMA, S; RUFFENACH, G; UMAR, S; MOTAYAGHENI, N; REDDY, S. T; EGHBALI, M. Role of oxidized lipids in pulmonary arterial hypertension. **Pulm Circ**. v. 6(3), p. 261-273, 2016.
- SILVA-FILHO, J. C.; OLIVEIRA, N. N. P. M.; ARCANJO, D. D. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; CAVALCANTI, S. C. H.; SANTOS, M. R. V.; OLIVEIRA, R. C. M.; OLIVEIRA, A. P. Investigation of mechanisms involved in (-)-Borneol-induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, p. 171–177, 2011.
- SIMPLICIO, J. A; Vale, G. T; GONZAGA, N. A; LEITE, L. N; HIPÓLITO, U. V; PEREIRA, C. A; TOSTES, R. C; TIRAPPELLI, C. R. Reactive oxygen species derived from NAD(P)H oxidase play a role on ethanol-induced hypertension and endothelial dysfunction in rat resistance arteries. **J Physiol Biochem**. v. 73, p. 5-16, 2016.
- SMITH, G. P; MINDELL, S; GREENBERG, D. Corn oil and mineral oil stimulate sham feeding in rats. **Physiology & Behavior**, v. 48, p. 283-287, 1990.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq Bras. Cardiol.**, v.107,n.3,supl.3, p.1-83, 2016.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2016. Taxa de morte por hipertensão arterial cresceu 13,2% na última década. Disponível em: <<http://www.sbh.org.br/geral/noticias.asp?id=486>> Acesso em 15 de agosto de 2019, às 14h41.
- SUN, M. K; HACKETT, J. T AND GUYENET, P. G. Sympathoexcitatory neurons of rostral ventro lateral medula exhibit pacemaker properties in the presence of a glutamate-receptor antagonist. **BrainRes**. v. 438, p.23–40, 1988.
- TAMBE, R; JAIN, P; PATIL, S; GHUMATKAR, P; SATHAYE, S. Antiepileptogenic effects of borneol in pentylenetetrazole-induced kindling in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**. v. 389, p. 467–475, 2016.
- TAN, X; LI, J, K; SUN, J. C; JIAO, P. J; WANG, Y, K; WU, Z. T; LIU, B; WANG, W. Z. The asymmetric dimethylarginine-mediated inhibition of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla contributes to regulation of blood pressure in hypertensive rats. **Nitric Oxide**. p. 1-10, 2017.
- TU, HUIYIN; ZHANG, DONGZE; LI, YU-LONG. Cellular and molecular mechanisms underlying arterial baroreceptor remodeling in cardiovascular diseases and diabetes. **Neurosci. Bull.** v. 35(1), p. 98–112, 2019.

VASQUES, E. C. et al. Neural reflex regulation of arterial pressure pathophysiology conditions: interplay among the barorreflex, the cardiopulmonary reflex and chemoreflex. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 30, n. 4. p. 525-532. 1997.

WANG, L. P; FENG, J. F; HU, K. L. Progress in regulation effect of aromatic refreshing traditional Chinese medicine on BBB permeability and its mechanism. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.** v. 39, p. 949–54, 2014.

WANG, L. P; FENG, J. F; HU, K. L. Progress in regulation effect of aromatic refreshing traditional Chinese medicine on BBB permeability and its mechanism (in Chinese). **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.** v. 39, p. 949–54, 2014.

WEBB e cols. Cell Migration. **Curr Biol.** v.113(19): R756-9; 2003.

WERNER, C; BAUMHÄKEL, M; TEO, KK; SCHMIEDER, R; MANN, J; UNGER, T; YUSUF, S; BÖHM, M. RAS blockade with ARB and ACE inhibitors: current perspective on rationale and patient selection. **Clin Res Cardiol.** v. 97, p. 418–431, 2008.

WEISS, J., EGLEN, R.M., GAUTAM, D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. **Nature Reviews: Drug Discovery,** 6, p. 721-733. 2007.

WORLD ORGANIZATION HEALTH. A global brief on hypertension. Silent killer, global public health crisis. **World Health Day**, 2013.

WU, J. Y; LI, Y. J; YANG, L; HU, Y. Y; HU, X. B; TANG, T. T; et al. Borneol and A-asarone as adjuvant agents for improving blood-brain barrier permeability of puerarin and tetramethylpyrazine by activating adenosine receptors. **Drug Deliv.** v. 25(1), p. 1858-1864. 2018.

XIAO-FEI, J. Preliminary study: biotransformation of borneol to camphor in mice, rats, and rabbits. **Mode Tradit Chin Med Mater Med,** v. 10, p. 27–36, 2008.

XIONG, Z. Y; XIAO, F. M; XU, X. et al. Studies on pharmacological activity of borneol (Chinese). **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.** v. 38, p.786–90, 2013.

XUE, B; THUNHORST, R. L; YU, Y; GUO, F; BELTZ, T. G; FELDER, R. B, et al. Central Renin-Angiotensin System Activation and Inflammation Induced by High-Fat Diet Sensitize Angiotensin II-Elicited Hypertension. **Hypertension.** v. 67, p. 163–70. 2016.

ZHANG, Q. L; FU, B. M; ZHANG, Z. J. Borneol, a novel agent that improves central nervous system drug delivery by enhancing blood-brain barrier permeability. **Drug Deliv.** p. 1037-1044, 2017.

ZHENG, Q; CHEN, Z. X; XU, M. B; ZHOU, X. L; HUANG, Y. Y; ZHENG, G. Q; WANG, Y. Borneol, a messenger agent, improves central nervous system drug delivery through enhancing blood-brain barrier permeability: a preclinical systematic review and meta-analysis. **Drug Deliv.** v. 25(1), p. 1617-1633. 2018.

ZHU, D. Y; JIANG, J; SHEN Y. Y; LI, J; LIN, Y. H; LUO, C. X. (+)-Borneol alleviates mechanical hyperalgesia in models of chronic inflammatory and neuropathic pain in mice. **European Journal of Pharmacology,** v. 757, p. 53–58, 2015.

ANEXO I - CERTIDÃO DO CEUA



**Universidade
Federal da
Paraíba**

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DO BORNEOL SOBRE A VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA DE RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS POR ANÁLISE ESPECTRAL", protocolada sob o CEUA nº 4169120220 (ID 00103), sob a responsabilidade de **Maria do Socorro França Falcão** - 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 05/06/2020.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECT OF BORNEOL ON VARIABILITY OF BLOOD PRESSURE AND HEART RATE IN NORMOTENSE AND HYPERTENSIVE RATS BY SPECTRAL ANALYSIS", utilizing 52 Heterogenics rats (52 males), protocol number CEUA 4169120220 (ID 00103), under the responsibility of **Maria do Socorro França Falcão** - 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 06/05/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 08/2020 a 07/2021 Área: [Ciências Farmacêuticas](#)

Origem: [Unidade de Produção Animal IPeFarM](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [52](#)

Linhagem: [Rattus Norvegicus - Wistar](#)

Peso: [170 a 250 g](#)

Local do experimento: Os procedimentos experimentais apresentados no referido projeto serão realizados no Laboratório de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial - LACONCHA do Centro de Biotecnologia da UFPB. O laboratório dispõe de todos os equipamentos e reagentes necessários para o desenvolvimento do projeto. Este projeto será realizado sob recursos próprios e faz parte de um projeto maior envolvendo o uso de probióticos no sistema cardiovascular.

João Pessoa, 16 de junho de 2020

Jailane de Souza Aquino

Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Carlos A. A. Clemente

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba