

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITO DO CINAMALDEÍDO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE
LESÕES ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGAS
OVARIECTOMIZADAS *KNOCKOUT* PARA RECEPTORES DE LDL
(LDLr^{-/-})**

FLÁVIA DE SOUZA ANDRADE MORAES

VILA VELHA
AGOSTO / 2017

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITO DO CINAMALDEÍDO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE
LESÕES ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGAS
OVARIECTOMIZADAS *KNOCKOUT* PARA RECEPTORES DE LDL
(LDLr^{-/-})**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

FLÁVIA DE SOUZA ANDRADE MORAES

VILA VELHA
AGOSTO / 2017

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M828e Moraes, Flávia de Souza Andrade.
Efeito do cinamaldeído sobre o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongas ovariectomizadas knockout para receptores de LDL(LDLr^{-/-}). / Flávia de Souza Andrade Moraes – 2017.
45 f.: il.

Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.
Coorientadora: Ewelyne Miranda de Lima.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2017.
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Doenças - Cardiovasculares. I. Andrade, Tadeu Uggere de. II. Lima, Ewelyne Miranda de. III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 615

FLÁVIA DE SOUZA ANDRADE MORAES

**EFEITO DO CINAMALDEÍDO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE LESÕES
ATEROSCLERÓTICAS EM CAMUNDONGAS OVARIETOMIZADAS *KNOCKOUT*
PARA RECEPTORES DE LDL (LDLr^{-/-})**

Dissertação apresentada à Universidade
Vila Velha, como pré-requisito do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 17 de agosto de 2017,


Banca Examinadora:



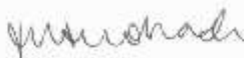
Prof. Dr. Andrews Marques do Nascimento – UVV



Prof. Dr. Denise Coutinho Endringer – UVV



Prof. Dr. Ewelyne Miranda de Lima – UVV
Coorientadora



Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade – UVV
Orientador

Dedico este trabalho ao meu marido, Humberto, aos meus filhos, Gabriel e Vinícius. A existência deles faz com que tudo tenha sentido. Ao Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade, por toda dedicação e confiança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me permitir sentir a sua forte presença em minha vida, por operar verdadeiros milagres nos momentos de imensa angústia, cuidar da minha família, meu bem maior, iluminar o meu caminho e guiar os meus passos.

Agradeço aos meus amados, Humberto, meu marido, Gabriel e Vinícius, meus filhos, por serem tão maravilhosos comigo e preencherem a minha vida com o mais nobre dos sentimentos: o amor. O apoio, carinho e compreensão que recebo são fundamentais para que eu consiga sempre seguir em frente.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade, meu orientador, por ser minha fonte inesgotável de incentivo, por enxergar em mim um potencial que eu nunca, em toda minha vida, pude acreditar ter, por me apresentar o mundo da pesquisa científica, pelo qual me encantei, e por me permitir a oportunidade de recomeçar.

À Prof^a Dr^a Ewelyne Miranda de Lima, minha coorientadora, que me recebeu de braços abertos e me ensinou a dar os primeiros passos nesta nova jornada. Sou grata por todo ensinamento científico e também pela amizade e companheirismo.

À Prof^a. Dr^a. Girlandia Alexandre Brasil, pelos ensinamentos passados com tamanha dedicação e talento, por toda ajuda na construção desse trabalho e pela paciência e compreensão, essenciais para que tudo acontecesse em seu devido tempo.

À Prof^a. Dr^a. Denise Coutinho Endringer, fonte de inspiração, pelo incentivo e pelos ensinamentos passados com grande maestria, por trabalhar com entusiasmo para permitir que o sonho de todos nós alunos se concretize e estar sempre vibrante com nossas conquistas.

À Cíntia, minha amiga de longa data, por ter sido a primeira pessoa a acreditar que eu poderia encarar este grande desafio, por acompanhar minha trajetória e sempre estar perto de mim e da minha família.

Aos queridos alunos de iniciação científica, Dionísio, Ávila, Cris, Bia, Larissa, Átyla, Lauro, Raylton, Silvio e Vítor, pela imensa ajuda que foi imprescindível para a

conclusão deste trabalho. Além, é claro, da maravilhosa convivência e momentos de grande alegria que passamos juntos.

Aos queridos companheiros, alunos de doutorado e mestrado que estiveram junto comigo no laboratório dividindo tarefas e compartilhando conhecimento, experiência e também as angústias, os medos, as alegrias e as conquistas. Manuela, Mirian, Raiana, Johnny, Layla, Silvia, Karla, Thays, Paola e Placielle, obrigada por me ajudarem a construir esse projeto e por engrandecerem esta história.

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Vila Velha (PPGCF-UVV) por contribuírem com conhecimento e incentivo, à Profª. Ieda Kalil e ao Prof. Dr. Andrews Marques do Nascimento por ensinar e ajudar com as técnicas necessárias para execução do experimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo, fundamental para que eu pudesse ingressar no mestrado e concretizar esse trabalho. À Universidade Vila Velha (UVV) por contribuir com a estrutura, pessoal e demais investimentos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pelo financiamento de projetos e incentivos que permitem o prosseguimento dos estudos científicos.

Ao meu sogro Humberto e minha sogra Maria José, exemplos de integridade e dignidade. Sempre estiveram ao meu lado me apoiando e oferecendo, além de todo amor e carinho, a segurança necessária.

À querida Marusa, que me ajudou a acreditar que eu teria competência para cumprir este desafio e por ajudar a organizar minhas ideias.

À minha avó, minha mãe (*in memoriam*), irmãos, tios e tias, primos e primas, cunhados, sobrinho, por fazerem parte da minha história.

À todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** O tratamento com cinamaldeído em camundongos LDLr^{-/-} previne o aumento da deposição lipídica induzida pela ovariectomia.....22
- Figura 2.** O tratamento com cinamaldeído em camundongos LDLr^{-/-} reduz a oxidação de produtos proteicos em células hepáticas.....23
- Figura 3.** O tratamento com cinamaldeído em camundongos LDLr^{-/-} reduz a peroxidação lipídica em células hepáticas.....24
- 4.** Efeito do tratamento com cinamaldeído em camundongos LDLr^{-/-} sobre a atividade da enzima superóxido dismutase em células hepáticas.....25
- Figura 5.** Efeito do tratamento com cinamaldeído em camundongos LDLr^{-/-} sobre a atividade da enzima catalase em células hepáticas.....25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil lipídico dos animais experimentais após tratamento crônico com cinamaldeído com ou sem ovariectomia.....23

Tabela 2 : Resultado da determinação do ciclo estral das camundongas LDLr^(-/-)26

LISTA DE ABREVIATURAS

- AOPP: Produtos Protéicos de Oxidação Avançada
- CAT: Catalase
- CEUA: Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais
- CMC: Carboximetilcelulose
- CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CT: Colesterol Total
- DCV: Doenças Cardiovasculares
- DNT: Doenças Não Transmissíveis
- EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- EVA: *Ethylene Vinyl Acetate* (acetato-vinilo de etileno)
- HDL: Lipoproteína de alta densidade
- LDL: Lipoproteína de baixa densidade
- VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa
- LDLr: Receptor para LDL
- LDLox: Lipoproteína de baixa densidade oxidada
- LH: hormônio Luteinizante
- MDA: Malondialdeído
- MTC: Medicina Tradicional Chinesa
- Nrf2: Fator Nuclear Eritróide 2 - fator relacionado 2
- PVDF: Polivinidileno
- SOD: Superoxidodismutase
- TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
- VLDL: Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. Animais experimentais	16
2.2. Grupos experimentais	16
2.3. Ovariectomia	16
2.4. Tratamento	17
2.5. Determinação da fase do ciclo estral	17
2.6. Coleta de sangue, perfusão e retirada dos órgãos e tecidos	17
2.7. Preparação “ <i>en face</i> ”	18
2.8. Análise da deposição lipídica vascular	18
2.9. Dosagens bioquímicas	18
2.10. Determinação de Proteínas Totais – Bradford	19
2.11. Avaliação dos produtos protéicos de oxidação avançada (AOPP - <i>Advanced Oxidation Products Protein</i>).....	19
2.12. Determinação da peroxidação lipídica pelo ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>).	20
2.13. Ensaio da superóxido dismutase (SOD).....	20
2.14. Ensaio da Catalase (CAT).....	20
2.15. Análise Estatística	21
2.16. Aspectos Éticos	21
3. RESULTADOS	22
3.1. Análise da deposição lipídica na aorta	22
3.2. Perfil lipídico	22

3.3 Produtos protéicos de oxidação avançada - (AOPP)	23
3.4. Determinação da peroxidação lipídica por TBARS	24
3.5. Atividade das enzimas SOD e CAT	24
3.6. Massa corporal e ganho ponderal do fígado	26
3.7. Avaliação do ciclo estral	26
4. DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS	33
7. ANEXOS	

RESUMO

MORAES, Flávia de Souza Andrade, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, agosto de 2017. **Efeito do cinamaldeído sobre o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongas ovariectomizadas knockout para receptores de LDL(LDLr^{-/-})**. Orientador: Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade e Coorientadora Prof^a. Dr^a. Ewelyne Miranda de Lima.

O cinamaldeído tem demonstrado propriedades antioxidantes, anti-hiperlipidêmicas, imunomoduladoras e anti-inflamatórias, as quais podem produzir efeito benéfico contra o desenvolvimento da aterosclerose em mulheres pós-menopausa. O presente estudo investigou a ação do cinamaldeído sobre o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongas LDLr^{-/-} ovariectomizadas e o efeito produzido sobre o perfil lipídico e marcadores de estresse oxidativo. As camundongas foram separadas em quatro grupos experimentais (n=10 para cada grupo): submetidas à cirurgia fictícia, tratadas com veículo (S); submetidas à cirurgia fictícia, tratadas com cinamaldeído (SC); ovariectomizadas, tratadas com veículo (O) e ovariectomizadas, tratadas com cinamaldeído (OC). O tratamento foi iniciado 21 dias após a ovariectomia e após oito semanas de tratamento, foram iniciados os experimentos. A avaliação da deposição lipídica foi realizada em aortas preparadas pelo método *en face* e coradas com *oil red*. O perfil lipídico foi analisado em amostras de sangue e a análise dos marcadores de estresse oxidativo (AOPP, TBARS, SOD e CAT) foi realizada em tecido hepático. O grupo ovariectomizado e tratado com cinamaldeído apresentou redução na área de deposição lipídica comparado ao grupo ovariectomizado e tratado com veículo (S: 1,000±0,058; SC: 1,018±0,036; O: 1,737±0,127; OC: 1,260±0,085 % da área total). O tratamento com cinamaldeído promoveu redução nos valores de triglicérides plasmáticos nos animais com cirurgia fictícia (S: 121,0±4,8; SC: 32,9±10,3; p<0,05). Entretanto, o mesmo não foi observado nos animais ovariectomizados. O cinamaldeído reduziu os níveis de oxidação de proteínas no fígado dos grupos com cirurgia fictícia e ovariectomizado (S: 65,8±5,2; SC: 44,9±2,4; O: 57,3±6,6; OC: 43,5±3,1 mM cloramina T/mg proteína; p<0,05 dos animais tratados em relação aos respectivos controles). Além disso, reduziu os níveis de peroxidação lipídica hepática no grupo ovariectomizado (S: 10,6 ± 0,5; SC: 13,4 ± 2,1; O: 11,4 ± 1,1; OC: 8,2 ± 0,7 nmol MDA/mg proteína; p<0,05 dos animais tratados em relação aos respectivos controles). A avaliação da atividade das enzimas antioxidantes no fígado não encontrou diferença entre os grupos (SOD - S: 2 ± 1; SC: 5,5 ± 1; O: 5,8 ± 2; OC: 3,3 ± 0,5 atividade da SOD/mg proteína e CAT - S: 2,17 ± 0,5; SC: 1,7 ± 1,4; O: 1,4 ± 0,9; OC: 1,5 ± 0,8 ΔE/min/mg proteína). Conclui-se que administração crônica de cinamaldeído é capaz de reduzir o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em aortas de camundongas LDL^{-/-} ovariectomizadas, independente da ação sobre os níveis lipídicos, e esse efeito pode ser justificado, em parte, por sua atividade antioxidante.

Palavras chaves: doença cardiovascular, aterosclerose, ovariectomia, antioxidante, *en face*.

ABSTRACT

MORAES, Flávia de Souza Andrade, M.Sc, University Vila Velha – ES, August 2017. **Effect of cinnamaldehyde on the development of atherosclerotic lesions in ovariectomized LDL receptor *knockout* (LDLr^{-/-}) female mice.** Advisor: Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade and Co-advisor: Prof. Dr. Ewelyne Miranda de Lima.

Cinnamaldehyde has shown antioxidant, antihyperlipidemic, immunomodulating and anti-inflammatory properties, which can produce beneficial effects against the development of atherosclerosis in postmenopausal women. The presented study has investigated the action of cinnamaldehyde on the development of atherosclerotic lesions in ovariectomized LDLr^{-/-} female mice and the effect produced on the lipid profile and the markers of oxidative stress. The mice have been divided in four experimental groups (n=10 in each group): the ones subjected to fictitious surgery, then treated with vehicle (S); the ones subjected to fictitious surgery, then treated with cinnamaldehyde (SC); ovariectomized ones treated with vehicle (O) and ovariectomized ones treated with cinnamaldehyde (OC). Treatment started 21 days after the ovariectomy, and after eight weeks of treatment, the experiments began. The appraisal of the lipid deposition was made in aortas prepared with the en face method and oil red stained. The lipid profile was analyzed in blood samples and the analysis of the markers of oxidative stress (AOPP, TBARS, SOD and CAT) was made on hepatic tissue. The group that was ovariectomized and treated with cinnamaldehyde presented reduction of the area of lipid deposition when compared to the ovariectomized ones that were treated with vehicle (S: 1,000±0,058; SC: 1,018±0,036; O: 1,737±0,127; OC: 1,260±0,085 % of the total area). The treatment with cinnamaldehyde has promoted decrease in the plasma triglyceride levels of the animals that underwent fictitious surgery (S: 121,0±4,8; SC: 32,9±10,3, p<0.05), however, such effect wasn't observed in the ovariectomized animals. Cinnamaldehyde has decreased the levels of protein oxidation in the livers of the ovariectomized mice submitted to fictitious surgery (S: 65,8±5,2; SC: 44,9±2,4; O: 57,3±6,6; OC: 43,5±3,1 mM chloramine T/mg protein; p<0.05 of the treated animals in relation to respective controls). Besides, decreased in the hepatic lipid peroxidation in the ovariectomized group (S: 10,6 ± 0,5; SC: 13,4 ± 2,1; O: 11,4 ± 1,1; OC: 8,2 ± 0,7 nmol MDA/mg protein; p<0.05 of the treated animals in relation to respective controls). The evaluation of the activity of the antioxidant enzymes in the liver found no difference between the groups (SOD - S: 2± 1; SC: 5,5 ± 1; O: 5,8 ± 2; OC: 3,3 ± 0,5 activity of SOD / mg protein and CAT - S: 2,17 ± 0,5; SC: 1,7 ± 1,4; O: 1,4 ± 0,9; OC: 1,5 ± 0,8 ΔE/min/mg protein). It is concluded that the chronic administration of cinnamaldehyde is capable of reducing the development of atherosclerotic lesions in aortas of ovariectomized LDL^{-/-} female mice, apart from its action on the lipid levels, and this effect can be explained, in part, by its antioxidant activity.

Keywords: cardiovascular disease, atherosclerosis, ovariectomy, antioxidant, *en face*.

1. INTRODUÇÃO

As doenças não transmissíveis (DNT), representadas pelas doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias crônicas e diabetes (Mpofu *et al.*, 2016; Hajhosseini *et al.*, 2016), são as principais causas de mortalidade em todo o mundo (WHO, 2016). A Organização Mundial da Saúde (OMS) ressalta que mais de três quartos das mortes consideradas prematuras (abaixo dos 70 anos de idade) foram causadas pelas DNT, com destaque para as doenças cardiovasculares (DCV), que ficaram em primeiro lugar em relação ao número de mortes, quando comparadas as demais (WHO, 2016). As DCV, tais como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca isquêmica, que ocorrem subsequentes à aterosclerose, lideram os casos de morte no mundo ocidental (Wang e Bennett, 2012).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e sua progressão ocorre ao longo de décadas. Instala-se primeiramente na íntima arterial, restrita a uma pequena área entre o endotélio e as células do músculo liso subjacente e envolve a retenção de lipídios, tipos celulares e matriz extracelular (Moore e Tabas, 2011). A evolução da doença leva à formação do núcleo necrótico, composto pelo acúmulo de células apoptóticas, detritos e cristais de colesterol, recoberto por uma camada fibrosa (Weber e Noels, 2011). As complicações relacionadas à aterosclerose podem ser causadas pela placa aterosclerótica, que limita o fluxo sanguíneo, ou pela ruptura da placa, que expõe o material pró-trombótico para o sangue, provocando a oclusão trombótica da artéria (Hansson e Libby, 2006).

Estudos demonstram que fatores como hipertensão, diabetes, níveis elevados de colesterol total e colesterol LDL sanguíneos e tabagismo, já estão bem estabelecidos como risco para o desenvolvimento da aterosclerose (Wang e Bennett, 2012). Além disso, outras doenças, tais como a doença renal crônica, a obesidade e a síndrome metabólica, bem como diversidade étnica e sexo também podem contribuir para progressão da doença (Munnur *et al.*, 2016). Segundo Munnur *et al.* (2016) as mulheres levam mais tempo para desenvolver aterosclerose e esse fato pode influenciar em diferenças nos fatores de risco existentes entre homens e mulheres. A doença arterial coronariana nas mulheres é adiada por dez a quinze anos, em comparação aos homens (Burke *et al.*, 2001). Acredita-se que esse atraso pode ser causado, em parte, pelo efeito protetor do estrogênio sobre a

aterosclerose, estabelecendo uma menor prevalência dos fatores de risco tradicionais em mulheres mais jovens (Brochier e Arwidson, 1998). As mulheres antes da menopausa apresentam risco menor de desenvolvimento de DCV, quando comparadas com mulheres pós-menopausa, ou mesmo quando comparadas aos homens (Kassi *et al.*, 2015). Estudos observacionais indicam que as mulheres na pós-menopausa que optam por usar terapia de reposição hormonal, apresentam uma taxa significativamente menor de DCV (Grodstein *et al.*, 2000). Em contrapartida, a pesquisa “Women’s Health Initiative – WHI” (Iniciativa para Saúde da Mulher) demonstrou aumento de eventos cardiovasculares associados ao tratamento de reposição hormonal (Manson, 2003). Segundo Bowling *et al.* (2012) os efeitos pró-inflamatórios e vasotóxicos observados nas mulheres em idade pós-menopausa, que fazem uso da terapia de reposição hormonal, ocorrem devido as alterações nas vias de sinalização do estradiol com o envelhecimento. Outro importante fator que deve ser considerado com o uso da terapia de reposição hormonal é o aumento do risco de desenvolvimento de tumores malignos hormônio dependentes (Gompel e Santen, 2012; Justenhoven *et al.*, 2012). Assim, apesar da relação entre risco de DCV e deficiência de estrogênio, a reposição hormonal para mulheres na pós-menopausa ainda não é considerada como a melhor alternativa (Oliveira *et al.*, 2014). Dessa forma, verifica-se a necessidade de continuar a busca por novas terapias que atuem como protetoras cardiovasculares em mulheres pós-menopausa, de modo a evitar os possíveis problemas associados à terapia de reposição hormonal.

A Medicina Tradicional Chinesa (MTC) tem sido utilizada durante séculos para tratamento de doenças cardíacas e atrai o interesse dos países ocidentais, por ser uma fonte de terapias alternativas ou complementares, com resultados eficazes, baixo custo e relativa ausência de efeitos secundários (Liu *et al.*, 2014). Dentre os produtos medicinais utilizados pela MTC, a *Cinnamomum cassia*, mais conhecida como canela da China, é empregada para proteger ou tratar muitas doenças, bem como para manter a saúde e o bem estar (Rad *et al.*, 2015). Estudos realizados com a *C. cassia* têm abordado seus efeitos antioxidantes (Lin *et al.*, 2003), anticancerígenos (Ka *et al.*, 2003), antimicrobiano (Lee e Ahn, 1998), antidiabéticos (Verspohl, 2005) e anti-inflamatórios (Lee, 2002). Estudo realizado por Song e colaboradores (2013) demonstrou que a canela da China é capaz de reduzir lesões e melhorar a função cardíaca em animais experimentais, por meio dos efeitos

antioxidantes, anti-inflamatórios e aumento dos níveis de óxido nítrico (Song *et al.*, 2013). Kang *et al.* (2014) comprovaram em estudo *in vitro*, que o extrato aquoso da canela da China foi capaz de interferir com a diferenciação de monócitos e com a atividade sequestrante de macrófagos, indicando o seu potencial na prevenção do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas.

O principal componente bioativo do óleo da casca da *C. cassia* é o Cinamaldeído (Ka *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2011), o qual tem sido reportado devido ao seu potencial antioxidante (Lee *et al.*, 2004), antibacteriano (Ferro *et al.*, 2016), anti-inflamatório (Liao *et al.*, 2012) e anticancerígeno (Long *et al.*, 2015). Adicionalmente, outros trabalhos demonstram que o cinamaldeído possui potencial terapêutico contra isquemia e hipertrofia cardíaca (Song *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015) e infarto do miocárdio (Li *et al.*, 2012), sendo capaz de reduzir lesões e melhorar a função cardíacas em animais experimentais, por meio dos efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios (Li *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015) e aumento dos níveis de óxido nítrico (Song *et al.*, 2013). Outro importante estudo foi realizado por Kang e colaboradores (2014) que comprovaram por meio de pesquisa *in vitro*, que o extrato aquoso da canela da China é capaz de interferir com a diferenciação de monócitos e com a atividade sequestrante de macrófagos, sugerindo uma contribuição para prevenção do desenvolvimento das células espumosas.

Os camundongos *knockout* para os receptores de LDL (LDLr^{-/-}) têm se mostrado uma excelente opção para estudos sobre a aterosclerose (Zadelaar *et al.*, 2007). Esses animais são importantes ferramentas que auxiliam com a melhor compreensão sobre os mecanismos moleculares envolvidos na formação e progressão da doença (Getz e Reardon, 2012; Veseli *et al.*, 2017) e, ainda, permitem avaliar e quantificar as lesões ateroscleróticas formadas (Getz e Reardon, 2012).

Portanto, a hipótese do presente estudo é que o cinamaldeído pode ser capaz de prevenir o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em animais experimentais. Dessa forma, o objetivo do trabalho consiste em avaliar o efeito do tratamento crônico com cinamaldeído, sobre o desenvolvimento da aterosclerose em camundongas *knockout* para receptor de colesterol LDL (LDL^{-/-}) ovariectomizadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais experimentais

Foram utilizadas camundongas *knockout* para receptor de colesterol LDL ($LDLr^{-/-}$), com peso entre 20-25 g e com oito semanas de idade. Esses animais foram fornecidos pelo Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas – UVV. Os mesmos foram mantidos em mini-isoladores, alojados em *Rack IVC (Individually Ventilated Caging)* ©Alesco, com controle de umidade e temperatura, ciclo claro-escuro de 12h e acesso à água e comida *ad libitum* com ração padrão (ração Probiotério, Moin ho Primor, S.A.).

2.2. Grupos experimentais

As camundongas foram separadas em quatro grupos experimentais (n=10 para cada grupo):

Camundongas $LDLr^{-/-}$:

- ✓ Submetidas à cirurgia fictícia e tratadas com veículo: (S)
- ✓ Submetidas à cirurgia fictícia e tratadas com cinamaldeído: (SC)
- ✓ Ovariectomizadas e tratadas com veículo: (O)
- ✓ Ovariectomizadas e tratadas com cinamaldeído: (OC)

Os animais tiveram a massa corporal inicial (MI) e final (MF) medidas e a razão entre elas (MF/MI) foi utilizado como parâmetro de ganho de peso. O ganho ponderal do fígado foi realizado por meio da razão entre a massa do fígado e o comprimento da tíbia (Xu *et al.*, 2009).

2.3. Ovariectomia

A ovariectomia bilateral (Marsh *et al.*, 1999) foi realizada sob anestesia, utilizando o anestésico cloridrato de cetamina (Syntec, São Paulo, BR) (11,5 mg/100g peso) e o relaxante muscular cloridrato xilazina (Syntec, São Paulo, BR) (0,1 mg/100g peso) por via intraperitoneal (i.p.) no quadrante inferior esquerdo do abdômen.

A técnica consistiu em uma incisão de 1,0 a 1,5 cm entre a última costela e a coxa, a 1,0 cm da linha mediana, seguida de uma incisão na camada muscular, abertura da cavidade peritoneal para posterior ligadura das trompas uterinas e remoção dos ovários. O procedimento foi realizado bilateralmente. Após a retirada dos ovários foi realizada sutura da musculatura e da pele com fio de nylon 3,0 monofilamentado.

Nos grupos submetidos à de cirurgia fictícia (*Sham*), foi realizada uma incisão na parede abdominal, sob o mesmo procedimento anestésico, mas não tiveram os ovários retirados.

2.4. Tratamento

Os tratamentos foram iniciados 21 dias após o procedimento cirúrgico (ovariectomia e cirurgia fictícia) (Medeiros *et al.* 2012) e mantidos durante o período de oito semanas (modificado de Yang *et al.*, 2015).

As camundongas tratadas com cinamaldeído receberam a substância (20mg/kg de peso corporal/dia) diluída em solução 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) e água, por via oral (gavagem) (Anand *et al.*, 2010; El-Bassosy *et al.*, 2011; Li *et al.*; 2012; Subash-Babu *et al.*, 2014).

As camundongas tratadas com veículo receberam, diariamente, uma solução aquosa de CMC a 0,5%, por gavagem.

2.5. Determinação da fase do ciclo estral

A determinação da fase estral das camundongas foi realizada por meio da análise microscópica do esfregaço vaginal a fresco, observando os três tipos celulares: células arredondadas nucleadas, células maduras cornificadas e leucócitos (Vilela *et al.*, 2007; Byers *et al.*, 2012). O ciclo estral completo é compreendido por quatro fases: proestro - com o predomínio de células arredondadas, com núcleos maiores, as quais podem estar dispersas ou agrupadas; estro – marcada pela diminuição da proliferação do epitélio vaginal, apresentando esfregaço vaginal constituído predominantemente de células maduras cornificadas; metaestro – presença de leucócitos, poucas células cornificadas e algumas células arredondadas e diestro – com esfregaço constituído praticamente por leucócitos (Byers *et al.*, 2012). O fluido vaginal foi coletado por meio de micro pipetas plásticas 20µL de solução salina (NaCl 0,9%), transferido para lâminas de vidro, misturado com uma gota de lugol e sobreposto com lamínula para posterior observação em microscópio ótico com lente objetivas de 10x e 40x de aumento. Este procedimento foi realizado diariamente, durante 7 a 10 dias, entre oito e dez horas da manhã (Becker *et al.*, 2005).

2.6. Coleta de sangue, perfusão e retirada dos órgãos e tecidos

Após oito semanas de tratamento as camundongas foram anestesiadas com cloridrato de cetamina (Syntec, São Paulo, BR) (11,5 mg/100g massa corporal) e o

relaxante muscular cloridrato xilazina (Syntec, São Paulo, BR) (0,1 mg/100g massa corporal) i.p. e as amostras de sangue foram coletadas por meio de punção cardíaca, com seringa de 1 mL e agulha de insulina. As amostras foram transferidas para tubos com anticoagulante EDTA, em seguida o plasma, foi separado e armazenado a -80°C.

Ao final da coleta de sangue, o animal foi perfundido com tampão fosfato (PBS - *phosphate buffered saline*) (pH 7,4) para total retirada do sangue remanescente.

Após a perfusão foi iniciada a retirada dos órgãos e tibia, necessários para execução das análises.

2.7. Preparação “*en face*”

A aorta foi dissecada livremente desde o ponto inicial da aorta ascendente até a bifurcação ilíaca e armazenada em solução de PBS-formol 10% à 15°C. A completa retirada da camada adventícia foi cuidadosamente realizada. O corte inicial foi realizado na curvatura aórtica menor e estendido até a bifurcação ilíaca. O segundo corte foi feito simetricamente ao longo da curvatura maior até o nível da artéria subclávia. Após o corte, as aortas foram presas em superfície de etil vinil acetato (EVA) com pinos de aço para manter sempre o tecido na sua posição plana e horizontal (Daughert e Rateri; 2005).

2.8. Análise da deposição lipídica vascular

As amostras previamente submetidas à preparação *en face* foram destinadas para a observação de deposição lipídica, por meio de coloração com o marcador de lipídeos *oil red* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA (Paigen *et al.*, 1987). Todas as amostras foram submersas em solução alcoólica com *oil red* por dez minutos e em seguida lavadas em uma cuba com água até retirar todo o excesso do corante vermelho. A análise da deposição lipídica foi realizada por meio da intensidade e extensão da coloração vermelha cujas imagens foram adquiridas usando uma câmera digital de alta resolução e posteriormente digitalizadas para análise morfométrica pelo software Image J (domínio público – National Institute of Health, USA).

2.9. Dosagens bioquímicas

As dosagens de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos foram realizadas em amostras do plasma sanguíneo, utilizando *kits* comerciais (*kit*: Triglicerídios Lote: 19

Validade: 31/07/2017; colesterol total, Lote: 38 Validade: 31/03/2018; colesterol HDL Lote: 91 Validade: 31/08/2018; BIOCLIN, Rio de Janeiro, Brasil), seguindo as instruções do fabricante, por meio do ensaio colorimétrico.

A determinação do colesterol LDL será realizada por meio da equação de Friedewald (Friedewald, 1972): $LDL = \text{Colesterol Total} - HDL - (\text{Triglicerídeos}/5)$.

2.10. Determinação de Proteínas Totais – Bradford

A determinação das proteínas totais foi realizada por espectrofotometria em leitora de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Readers, Molecular Devices, California, EUA). O ensaio foi realizado utilizando 5µL das amostras obtidas a partir do homogenato celular, preparado com 200mg do fígado, e 250 µL do reagente de Bradford. O branco foi preparado com 5µL de água deionizada e 200µL do reagente de Bradford. A concentração das proteínas totais foi calculada com base numa curva padrão 10% a 80% de albumina. Os resultados foram expressos em mg/mL de proteína. Nessa medida, as amostras foram diluídas em 1:50 (Bradford, 1976).

2.11. Avaliação dos produtos protéicos de oxidação avançada (AOPP - *Advanced Oxidation Products Protein*)

A determinação dos AOPP foi realizada por colorimetria em aparelho leitor de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Readers, Molecular Devices, California, EUA). Para tanto, foram utilizadas amostras obtidas a partir do homogenato celular, preparado com 200mg do fígado, diluídas na proporção de 1:5 em PBS. Em seguida foram adicionados 10 µL de KI (1,16 M) e 20 µL de ácido acético. O branco foi preparado com 200µL de PBS, 20µL de ácido acético e 10µL de KI. As amostras e o branco foram levados ao agitador magnético (Fisatom, São Paulo, BR) por 6 minutos. A absorbância da reação foi imediatamente lida em 340 nm. O conteúdo de AOPP foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 µM realizada com equivalentes de cloramina T nas concentrações de 5, 10, 30, 60, 75 e 100µM. Os resultados foram expressos em µmol de equivalentes de cloramina T/L/mg proteína. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Nessa medida, as amostras foram diluídas em 1:30 (Witko-Sarsat *et al.*, 1996).

2.12. Determinação da peroxidação lipídica pelo ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS - *Thiobarbituric acid reactive substances*).

O ensaio foi realizado utilizando 250µL da amostra (obtida a partir do homogenato celular preparado com 200mg do fígado) e 500µL da solução reagente contendo ácido tricloroacético 15% - ácido tiobarbitúrico 0,375% - HCl 0,25N (TCA15%-TBA 0,375%-HCl 0,25N). O branco foi preparado com 250µl de água deionizada e 500µl da solução de TCA15%-TBA 0,375%-HCl 0,25N. Em seguida, as amostras e o branco foram levados ao banho maria a 90°C por 15 minutos. A determinação dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico foi realizada por colorimetria em 532nm, por meio de aparelho leitor de microplacas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Readers, Molecular Devices, California, EUA). O resultado final foi expresso em nmol de malondialdeído/mg de proteínas, tendo como referência a curva de calibração com o malonaldeído (MDA). A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) (Rodrigues *et al.*, 2010).

2.13. Ensaio da superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizada em amostra do fígado pelo método de Misra e Fradovich (1972). O meio de reação foi composto de 1,0 mL de tampão de carbonato (0,2 M, pH 10,2), KCl 0,8 mL (0,015 M), 0,1 mL de homogenato de fígado e água de modo a atingir o volume final de 3,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL de epinefrina (0,025 M). A alteração na absorbância foi registrada por meio de aparelho espectrofotômetro (T80+ UV/VIS Spectrometer, Pg Instruments Ltd, Reino Unido), no comprimento de onda de 480nm, em intervalos de 15 segundos, durante um minuto e a 25 °C de temperatura. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A atividade da enzima é definida como a quantidade de enzima que provoca 50% de inibição da auto-oxidação de epinefrina. Os resultados foram expressos como Unidade de SOD/mg de proteína.

2.14. Ensaio da Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada na amostra do fígado, de acordo com o descrito por Aebi (1984) com modificações. Resumidamente, numa cubeta de quartzo foram adicionados 3 mL de tampão fosfato (0,050 M, pH 7,4) e 60 uL da amostra. A reação se inicia pela ação de 40 uL de H₂O₂ (0,066 M em tampão de fosfato). As absorbâncias em 240 nm foram registradas por meio de aparelho

espectrofotômetro (T80+ UV/VIS Spectrometer, Pg Instruments Ltd, Reino Unido) a cada 15 segundos, pelo intervalo de 1 minuto. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que consome metade do peróxido de oxigênio H_2O_2 em um minuto a 25 °C. Os resultados foram expressos como coeficiente de extinção do peróxido por minuto ($\Delta E \cdot \text{min}/\text{mg}$ proteína).

2.15. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média, \pm o erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA). A significância da diferença entre as médias foi determinada por teste *post-hoc* de Tukey, ajustado para múltiplas comparações, com significância aceita acima de 5% ($p < 0,05$).

2.16. Aspectos Éticos

Os procedimentos foram realizados respeitando os princípios éticos na experimentação animal de acordo com CONCEA (BRASIL, 2014) e aprovados pela Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal da Universidade Vila Velha (CEUA-UVV, 397/2016).

3. RESULTADOS

3.1. Análise da deposição lipídica na aorta

A área de lesão aterosclerótica foi avaliada na aorta dos animais e apresentou redução significativa após o tratamento com cinamaldeído no grupo ovariectomizado (S: $1,000 \pm 0,058$; SC: $1,018 \pm 0,036$; O: $1,737 \pm 0,127$; OC: $1,260 \pm 0,085$ % da área total) (Figura1).

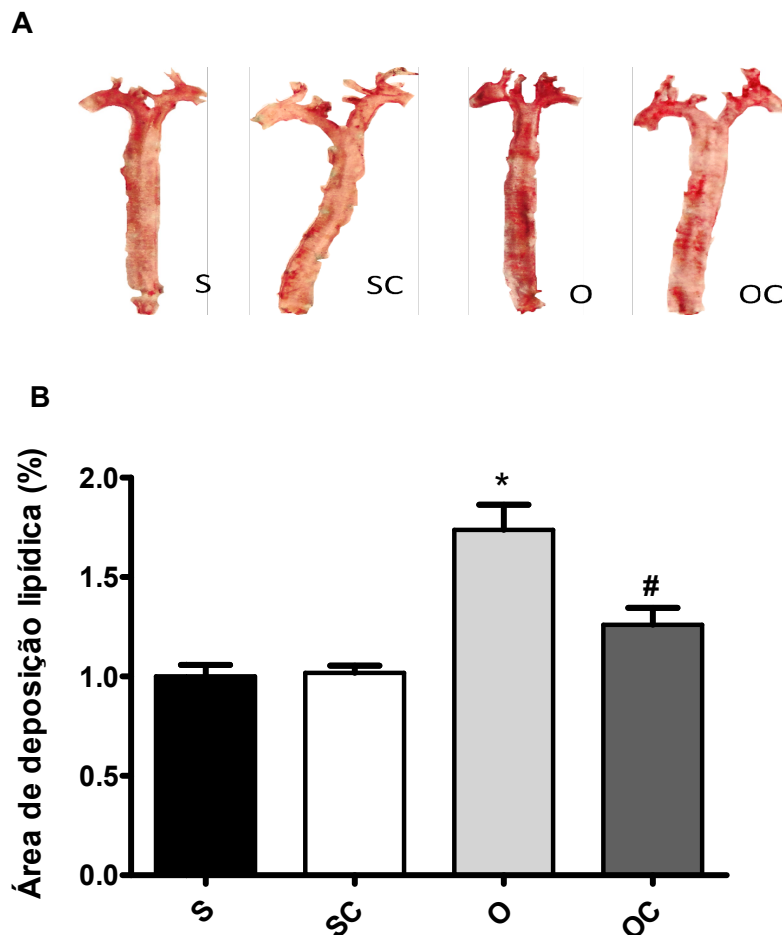


Figura 1. O tratamento com cinamaldeído em camundongos LDLr^{-/-} previne o aumento da deposição lipídica induzida pela ovariectomia. (A) Imagem representativa das aortas preparadas pelo método *en face* e lesões ateroscleróticas coradas com *oil red*. (B) Gráfico quantitativo da área de deposição lipídica. S, cirurgia fictícia tratadas com veículo; SC, cirurgia fictícia tratadas com cinamaldeído; O, ovariectomizadas tratadas com veículo e OC, ovariectomizadas tratadas com cinamaldeído. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs. S e SC e # $p < 0,05$ vs. O.

3.2. Perfil lipídico

Foi observado que o tratamento com cinamaldeído promoveu redução nos valores de triglicérides plasmáticos nos animais do grupo *Sham*. Entretanto, o mesmo não foi observado nos animais ovariectomizados. Como esperado, o mesmo padrão foi

observado para o VLDL colesterol. Não houve diferença no colesterol total, HDL e LDL entre os diferentes grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1: Perfil lipídico dos animais experimentais após tratamento crônico com cinamaldeído com ou sem ovariectomia.

	S	SC	O	OC
Colesterol Total	199,0±15	160,1±21,6	180,4±14,1	165,8±21,6
HDL	29,0±5,1	25,0±1,4	26,9±3,4	21,7±2,5
LDL	170,0±16,1	135,1±20,9	153,5±12,0	144,1±20,6
VLDL	24,20±0,95	6,57±2,07 *	18,12±1,53	16,29±2,68
Triglicérides	121,0±4,8;	32,9±10,3 *	90,6±7,6;	81,4±13,4

Resultados expressos como média ± E.P.M. *p<0,05 vs. S.

3.3 Produtos protéicos de oxidação avançada - (AOPP).

No tecido hepático foi verificada a oxidação de produtos protéicos, que indicam o grau de estresse oxidativo no tecido em questão. Pode-se observar a redução na quantidade de produtos formados após o tratamento nos animais do grupo SC e OC (S: 65,8±5,2; SC: 44,9±2,4; O: 57,3±6,6; OC: 43,5±3,1 mM cloramina T/mg proteína; p<0.05 em relação ao grupo S) (Figura 2).

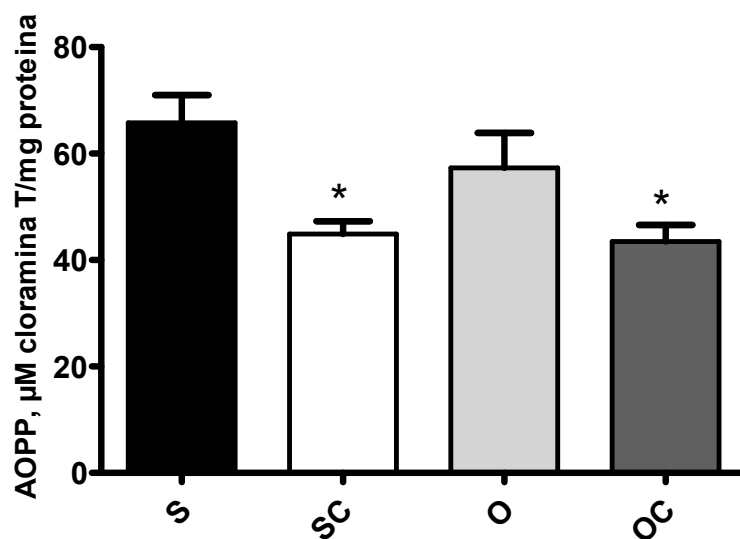


Figura 2. O tratamento com cinamaldeído em camundongos $LDLr^{-/-}$ reduz a oxidação de produtos proteicos em células hepáticas. S, cirurgia fictícia tratadas com veículo; SC,

cirurgia fictícia tratadas com cinamaldeído; O, ovariectomizadas tratadas com veículo e OC, ovariectomizadas tratadas com cinamaldeído. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,0$ vs. S

3.4. Determinação da peroxidação lipídica por TBARS

Foi observado que o tratamento com cinamaldeído reduziu os níveis de peroxidação lipídica no grupo OC (S: $10,6 \pm 0,5$; SC: $13,4 \pm 2,1$; O: $11,4 \pm 1,1$; OC: $8,2 \pm 0,7$ nmol MDA/mg proteína; $p < 0,05$) (Figura 3).

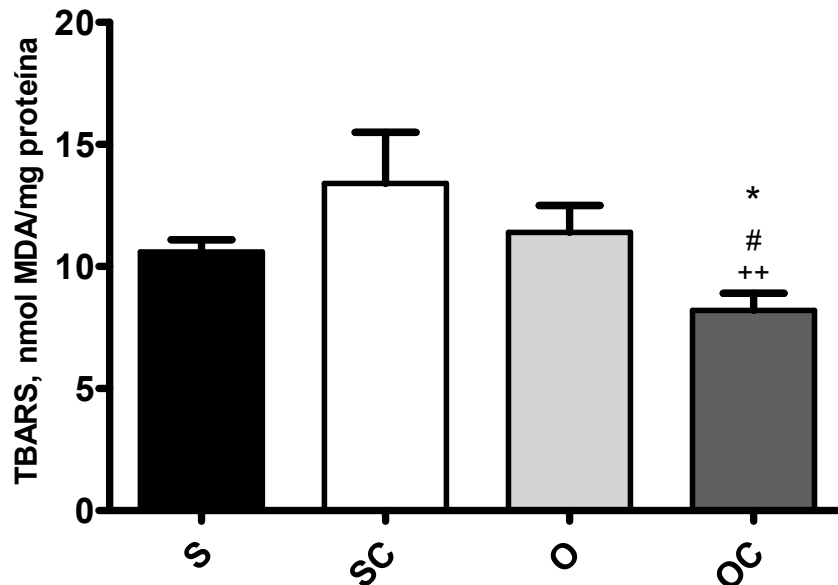


Figura 3. O tratamento com cinamaldeído em camundongos $LDLr^{-/-}$ reduz a peroxidação lipídica em células hepáticas. S, cirurgia fictícia tratadas com veículo; SC, cirurgia fictícia tratadas com cinamaldeído; O, ovariectomizadas tratadas com veículo e OC, ovariectomizadas tratadas com cinamaldeído. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ vs. O, # $p < 0,05$ vs. S e ++ $p < 0,05$ vs. SC.

3.5. Atividade das enzimas SOD e CAT

Foram avaliadas as atividades das enzimas SOD (Figura 4) e CAT (Figura 5). Não houve diferença da atividade dessas enzimas entre os grupos experimentais. SOD (S: 2 ± 1 ; SC: $5,5 \pm 1$; O: $5,8 \pm 2$; OC: $3,3 \pm 0,5$ Unidade de SOD/mg proteína) CAT (S: $2,17 \pm 0,5$; SC: $1,7 \pm 1,4$; O: $1,4 \pm 0,9$; OC: $1,5 \pm 0,8$ $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ proteína).

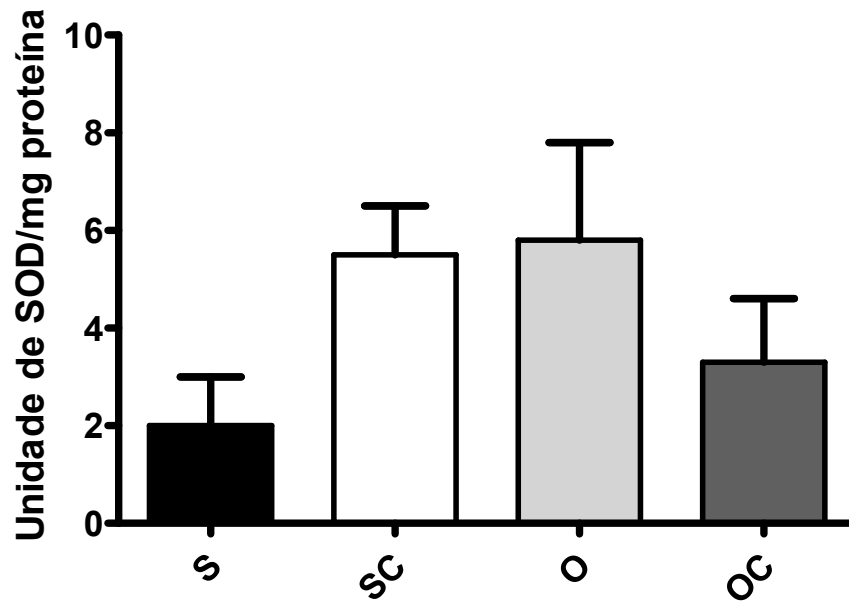


Figura 4. Efeito do tratamento com cinamaldeído em camundongas $LDLR^{-/-}$ sobre a atividade da enzima superóxido dismutase em células hepáticas. S, cirurgia fictícia tratadas com veículo; SC, cirurgia fictícia tratadas com cinamaldeído; O, ovariectomizadas tratadas com veículo e OC, ovariectomizadas tratadas com cinamaldeído. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M

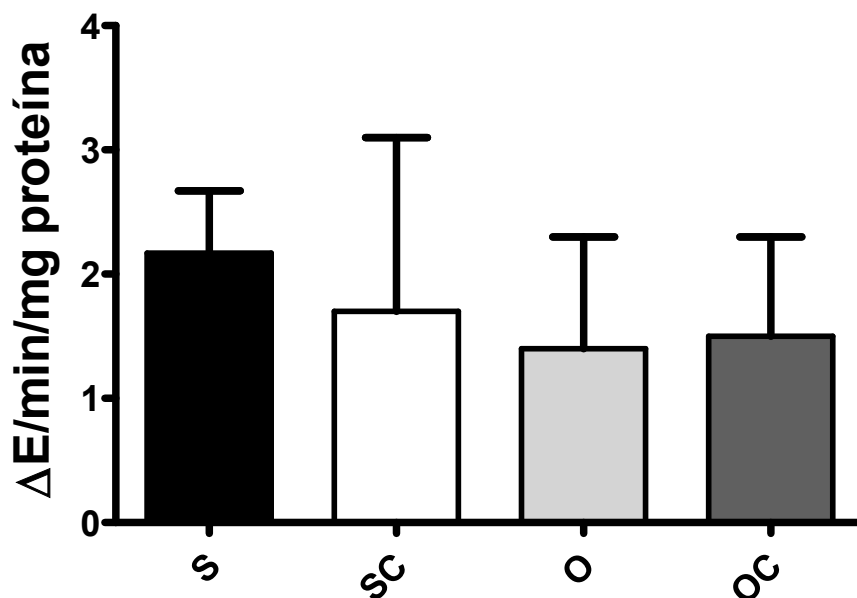


Figura 5. Efeito do tratamento com cinamaldeído em camundongas $LDLR^{-/-}$ sobre a atividade da enzima catalase em células hepáticas. S, cirurgia fictícia tratadas com veículo; SC, cirurgia fictícia tratadas com cinamaldeído; O, ovariectomizadas tratadas com veículo e OC, ovariectomizadas tratadas com cinamaldeído. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M.

3.6. Massa corporal e ganho ponderal do fígado

A massa corporal dos animais foi avaliada no início e após o final do tratamento. Após a eutanásia foi avaliado, ainda, o ganho ponderal do fígado. Foi possível observar que não há diferença na razão entre massa corporal inicial e final dos animais nos diferentes grupos (S: $1,025 \pm 0,007$; SC: $1,022 \pm 0,021$; O: $1,040 \pm 0,017$; OC: $1,067 \pm 0,015$ g/g), de modo semelhante não houve diferença na razão entre a massa do fígado e o comprimento da tibia (S: $0,068 \pm 0,001$; SC: $0,058 \pm 0,010$ O: $0,062 \pm 0,006$; OC: $0,058 \pm 0,004$ mg/g).

3.7. Avaliação do ciclo estral

A determinação do ciclo estral constatou que as camundongas ovariectomizadas se mantiveram nos estágios diestro e metaestro, não atingindo as demais fases do ciclo. Foi verificado, ainda, que as camundongas do grupo *sham* estavam ciclando normalmente, pois, apesar de a avaliação citológica não ter identificado a fase proestro, a maioria das camundongas *sham* passaram pela fase estro, que ocorre logo após a fase proestro.

Tabela 2 : Resultado da determinação do ciclo estral das camundongas LDLr^{-/-}.

Fase Estral	S	SC	O	OC
Diestro	----	25%	83,3%	85,7%
Metaestro	25%	----	16,7%	14,30%
Estro	75%	75%	----	----
Proestro	----	----	----	----

S, cirurgia fictícia tratadas com veículo; SC, cirurgia fictícia tratadas com cinamaldeído; O, ovariectomizadas tratadas com veículo e OC, ovariectomizadas tratadas com cinamaldeído

4. DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi o efeito do cinamaldeído sobre a deposição lipídica na aorta das camundongas LDLr^{-/-} ovariectomizadas. Os dados mostraram que a ovariectomia induziu a deposição lipídica nas aortas das camundongas LDLr^{-/-}, sem uso de dieta aterogênica, e o tratamento com cinamaldeído foi capaz de prevenir o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, independente de alteração do perfil lipídico.

Os animais foram alimentados com dieta padrão a fim de eliminar possíveis alterações fisiológicas e metabólicas, que poderiam ser induzidas pela dieta com alto teor de gordura (Hartvigsen *et al.*, 2007). O uso da dieta rica em gordura pode produzir processo inflamatório crônico e, dessa forma, interferir nos resultados da intervenção principal que se estuda (Teupser *et al.*, 2003; Hartvigsen *et al.*, 2007; Warden e Fisler, 2008; Almeida-Suhett *et al.*, 2017).

A ovariectomia induziu a deposição lipídica na aorta das camundongas. Esse achado pode ser explicado pelo fato de que a deficiência dos hormônios ovarianos atua como fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose (Liu *et al.*, 2016) e reforçado pelos estudos que apontam que o período pós-menopausa está relacionado com o maior desenvolvimento de doenças cardiovasculares em mulheres (Bowling *et al.*, 2012; Kassi *et al.*, 2015; Munnur *et al.*, 2016). A ovariectomia em animais tem sido utilizada para mimetizar as alterações fisiológicas e metabólicas provocadas pela deficiência do estrogênio (Choi *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2014; Lamas *et al.*, 2017). Estudos demonstram a influência dos hormônios ovarianos sobre alterações que estão diretamente envolvidas no processo de desenvolvimento da aterosclerose, tais como a inibição da proliferação das células do músculo liso vascular (Pare *et al.*, 2002), disfunção endotelial e estresse oxidativo (Lamas *et al.*, 2015).

O tratamento com cinamaldeído foi capaz de prevenir o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas do grupo ovariectomizado mantendo-o em nível semelhante ao encontrado no grupo controle (*Sham* tratado com veículo). Vários estudos abordam a capacidade do cinamaldeído em melhorar condições envolvidas no processo de desenvolvimento da aterosclerose (Raffai *et al.*, 2014; Subash-Babu *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2017). Entretanto, não é do conhecimento dos autores deste trabalho a existência de estudos anteriores que tenham demonstrado efeito do cinamaldeído

sobre a prevenção de desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Recente estudo realizado por Guo *et al.*, (2017) avaliou a influência do cinamaldeído sobre a aorta torácica e artéria mesentérica de camundongo modelo para resistência a insulina e verificou que houve melhoria da função vascular. Essa melhoria foi atribuída, em parte, à propriedade antioxidante do cinamaldeído, que foi demonstrada por meio da diminuição dos níveis de superóxido e aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) do tecido vascular (Guo *et al.*, 2017).

Os grupos experimentais que passaram pela cirurgia fictícia (*Sham* tratado com veículo e *Sham* tratado com cinamaldeído), não apresentaram diferença no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas. Barcat *et al.* (2006) mostraram que as lesões ateroscleróticas em camundongos LDLr^{-/-} ficaram evidentes no animais com idade acima de 20 semanas. Considerando que os animais do presente estudo estavam com 19 semanas de idade na data do experimento, o trabalho de Barcat *et al.* (2006) corrobora o fato de não ter sido possível diferença da deposição lipídica na aorta dos grupos com cirurgia fictícia.

A avaliação do perfil lipídico mostrou que a ovariectomia não alterou os níveis de colesterol total e frações, bem como de triglicerídeos. Entretanto, o tratamento com cinamaldeído foi capaz de reduzir os níveis de triglicerídeos do grupo *Sham*. A redução dos níveis dos triglicerídeos foi consistente com estudos anteriores (Li *et al.*, 2012; Zuo *et al.*, 2017). No entanto, os mesmos estudos também apontam mudanças nos demais perfis lipídicos, o que não foi observado no presente estudo. Possivelmente, os diferentes resultados alcançados sejam decorrentes dos diferentes modelos de animais utilizados nas pesquisas. Li e colaboradores (2012) realizaram o estudo em camundongos modelo de resistência a insulina e obesidade e Zuo e colaboradores (2017) utilizaram o camundongo C57BL/6J alimentados com dieta rica em gordura.

Um possível mecanismo, e que foi investigado no presente trabalho, para a prevenção da deposição lipídica, seria o efeito do cinamaldeído sobre o estresse oxidativo. O desequilíbrio entre a formação das espécies reativas de oxigênio (ERO's) e a defesa antioxidante está intimamente ligado ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Munzel *et al.*, 2010; Peluso *et al.*, 2012). A aterogênese se inicia a partir da disfunção endotelial produzida, em parte, pelo aumento das ERO's (Ross, 1993; Harrison, 1997; Strehlow *et al.*, 2003), as quais são capazes de atacar

e modificar diferentes componentes das células, incluindo lipídios e proteínas (Harrison et al., 2003). O aumento da atividade das enzimas antioxidantes funciona como uma das estratégias do mecanismo de defesa do organismo para inibir o aumento da produção das ERO's e combater os efeitos deletérios do estresse oxidativo (Formigari et al., 2007). Entre as enzimas antioxidantes mais importantes estão a SOD que converte superóxido em peróxido de hidrogênio, glutathione peroxidase (GPx) e CAT que são responsáveis pela conversão de peróxido de hidrogênio em água (Formigari et al., 2007).

Os ensaios para verificar os níveis dos marcadores de estresse oxidativo foram realizados em amostras do fígado. Evidências apontam que as células hepáticas correspondem ao principal alvo de ação das ERO's (Sánchez-Valle et al., 2012). Foi verificado que o cinamaldeído reduziu os níveis de oxidação de proteínas e lipídios no fígado. Esses resultados são consistentes com o estudo realizado por Subash-Babu et al. (2014), que teve como objetivo avaliar a propriedade antioxidante do cinamaldeído e sua possível proteção às células β -pancreáticas em modelo experimental de diabetes. Esse estudo demonstrou que o cinamaldeído foi capaz de aumentar a liberação de insulina, provavelmente devido a sua capacidade de ação contra a produção de radicais livres. Dentre os resultados obtidos, houve diminuição dos níveis dos produtos de peroxidação lipídica, sugerindo que o efeito antidiabético do cinamaldeído foi causado pelo seu desempenho antioxidante (Subash-Babu et al., 2014). Outro estudo que sustenta os resultados obtidos no presente experimento foi realizado por Wang e colaboradores (2015), que concluiu que o cinamaldeído foi capaz de prevenir a disfunção endotelial induzida por altas concentrações de glicose. O tratamento com o cinamaldeído foi capaz de prevenir a geração de ERO's e preservar os níveis de NO em aortas (Wang et al., 2015).

Em relação ao braço antioxidante do sistema, o mesmo foi avaliado por meio da atividade das enzimas SOD e CAT e mostrou que não houve diferença entre os grupos. Resultado semelhante foi verificado no estudo realizado por Gowder e Devaraj (2006) que avaliou o efeito antioxidante do cinamaldeído em ratos. No referido estudo, foi observado que a atividade das enzimas antioxidantes se manteve estável quando os animais receberam menores doses de cinamaldeído (2,14; 6,96 e 22,62 mg/kg de peso corporal/dia) e foram tratados por um período de 60 dias. O aumento da atividade antioxidante das enzimas somente ocorreu com a maior dose do cinamaldeído avaliada (73,5 mg/kg de peso corporal/dia) e após 90

dias de tratamento. Portanto, a falta de diferença nas atividades enzimáticas observada neste trabalho pode, simplesmente, refletir a dose e o tempo de tratamento utilizados. Entretanto, levando-se em consideração que o estresse oxidativo se dá por meio do desequilíbrio entre os fatores pró e antioxidantes, nos animais OC em que houve redução da oxidação protéica e lipídica, ou seja, redução de fatores pró-oxidação, o mesmo nível de atividade enzimática antioxidante, representa um ambiente favorável para a redução do estresse oxidativo e, portanto, com menor efeito sobre os processos de oxidação que determinam ou favorecem a deposição lipídica na aterosclerose, justificando a prevenção desse quadro nesses animais.

O efeito da deficiência dos hormônios ovarianos sobre a massa corporal e a relação desse efeito com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares têm sido frequentemente estudados (Romero-Aleshire *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2017). Diante desse fato, foi avaliado o efeito do cinamaldeído sobre a massa corporal e sobre o ganho ponderal do fígado. Entretanto, não houve diferença entre os valores obtidos. Conforme abordado por Marchon e colaboradores (2015), é possível que a ovariectomia não produza aumento da massa corporal. A pesquisa citada verificou que a ovariectomia induziu aumento do percentual de gordura visceral em camundongos, sem que ocorresse aumento da massa corporal (Marchon *et al.*, 2015).

A determinação do ciclo estral das camundongas foi realizada para confirmar a ovariectomia e avaliar a atividade ovariana das camundongas submetidas à cirurgia fictícia. Os achados mostraram que somente os animais que não tiveram o ovário retirado passaram pela fase estro do ciclo, indicando que os animais estavam sob influência dos hormônios ovarianos. Nessa fase ocorre a queda dos níveis de estradiol, coincidindo com a ovulação e formação do corpo lúteo. Foi verificado, ainda, que 100% das camundongas ovariectomizadas se encontravam nas fases marcadas por níveis baixos de estradiol (metaestro e diestro). Várias alterações ocorrem nos tecidos do aparelho reprodutor das fêmeas durante o ciclo estral (Bronson *et al.*, 1966), conferindo características específicas a cada fase e permitindo que sejam identificadas por meio da análise da citologia vaginal.

Sumariando, os resultados do presente trabalho demonstram que: 1) o cinamaldeído previne a deposição lipídica em modelo de aterosclerose experimental com redução

dos níveis de estrogênio em fêmeas e sem dieta hipercalórica; 2) tal efeito se deve, pelo menos em parte, por ação antioxidante com redução da oxidação lipídica e protéica hepática e manutenção da atividade de enzimas antioxidantes; 3) o efeito sobre a deposição lipídica não está relacionado com o perfil lipídico.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que a administração crônica de cinamaldeído é capaz de reduzir o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em aortas de camundongas LDL^{-/-} com deficiência de estrogênio devido à ovariectomia e sem uso da dieta aterogênica. Tal efeito se deve, pelo menos em parte, pela ação antioxidante demonstrada por meio de redução da oxidação lipídica e protéica hepática, bem como manutenção da atividade de enzimas antioxidantes. O efeito sobre o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas no presente trabalho não está relacionado com o perfil lipídico. Os resultados sugerem que o cinamaldeído possui promissor potencial contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares isquêmicas em mulheres pós-menopausa. No entanto, mais investigações são necessárias para melhor elucidar as vias de ação e os efeitos produzidos pelo cinamaldeído.

6. REFERÊNCIAS

- Aebi H. 1984. Catalase: In *Methods in Enzymol* (Packer L ed.). Academic Press: Orlando, FL, 125–126. PMID:6727660.
- Almeida-Suhett CP, Scott JM, Graham A, Chen Y, Deuster PA. 2017. Control diet in a high-fat diet study in mice: Regular chow and purified low-fat diet have similar effects on phenotypic, metabolic, and behavioral outcomes. *Nutr Neurosci*. 19:1-10. doi: 10.1080/1028415X.2017.1349359.PMID: 28721750.
- Anand P, Murali KY, Tandon V, Murthy PS, Chandra R. 2010. Insulinotropic effect of cinnamaldehyde on transcriptional regulation of pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and GLUT4 translocation in experimental diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 186,72–81. doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.044. PMID: 20363216.
- Barcat D, Amadio A, Palos-Pinto A, Daret D, Benlian P, Darmon M, Bérard AM. 2006. Combined hyperlipidemia/hyperalphalipoproteinemia associated with premature spontaneous atherosclerosis in mice lacking hepatic lipase and low density lipoprotein receptor. *Atherosclerosis*. 188(2):347-55. PMID: 16384559.
- Becker JB, Arnold AP, Berkley KJ, Blaustein JD, Eckel LA, Hampson E, Herman JP, Marts S, Sadee W, Steiner M, Taylor J, Young E. 2005. *Strategies and Methods for Research on Sex Differences in Brain and Behavior*. *Endocrinology*, 146(4),1650–1673. PMID: 15618360.
- Bowling M, Oparil S, Hage F, Hilgers R, Xing D. 2012. *Sex Hormones and Vascular Function*. *Sex Hormones*. Prof. Raghvendra Dubey (Ed.), InTech, ISBN: 978-953-307-856-4.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54. PMID: 942051.
- BRASIL. 2014. Conselho Nacional de Cuidado na Experimentação Animal - CONCEA. Regula a vinculação de centros públicos ou privados que realizam procedimentos em animais vivos em atividades de ensino, extensão, capacitação, treinamento, transferência de tecnologia, ou quaisquer outras com finalidade didática, ao sistema legal que regula o funcionamento do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Resolução Normativa nº 19 Do

Concea, de 25 de novembro de 2014. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de set.2014. Seção 1. Nº 185, p. 9, 2014.

Brochier ML, Arwidson P. 1998. Coronary heart disease risk factors in women. *European Heart*, 19, A45-A52. Review. PubMed PMID: 9519343.

Bronson FH, Dagg CP, Snell GD. 1966. Reproduction. In *Biology of the laboratory mouse* (ed. Green EL). Dover, New York. www.informatics.jax.org/greenbook/index.shtml

Burke AP, Farb A, Malcom G, Virmani R. 2011. Effect of menopause on plaque morphologic characteristics in coronary atherosclerosis. *American Heart Journal*,141(2), S58-S62. PubMed PMID: 11174360.

Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. 2012. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE*, 7(4), e35538. PMID: 22514749; PMCID: PMC3325956.

Choi BG, Vilahur G, Cardoso L, Fritton JC, Ibanez B, Zafar MU, Yadegar D, Speidl WS, Schaffler MB, Fuster V, Badimon JJ. 2008. Ovariectomy increases vascular calcification via the OPG/RANKL cytokine signalling pathway. *Eur J Clin Invest*. 38(4):211-7. PMID: 18279396; PMCID: PMC4811027.

Daugherty A, Rateri DL. 2005. Development of experimental designs for atherosclerosis studies in mice. *Methods*. 36(2):129-38. PMID: 15893934.

El-Bassossy HM, Fahmy A, Badawy D. 2011. Cinnamaldehyde protects from the hypertension associated with diabetes. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 3007–3012. PubMed PMID:21840367.

Ferro TA, Araújo JM, Dos Santos Pinto BL, Dos Santos JS, Souza EB, da Silva BL, Colares VL, Novais TM, Filho CM, Struve C, Calixto JB, Monteiro-Neto V, da Silva LC, Fernandes ES. 2016. Cinnamaldehyde Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence Factors and Protects against Infection in a *Galleria mellonella* Model. *Front Microbiol* 21;7:2052. doi: 10.3389/fmicb.2016.02052. eCollection 2016.PMID: 28066373; PMCID: PMC5174152.

Formigari A, Irato P, Santon A.2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*.146(4):443-59. PMID: 17716951.

Getz GS, Reardon CA. 2012. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(5):1104-15. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.237693. PMID: 22383700; PMCID: PMC3331926.

Gompel A, Santen RJ. 2012. Hormone therapy and breast cancer risk 10 years after the WHI. *Climacteric*,15, 241-249. doi: 10.3109/13697137.2012.666456. PMID: 22612610.

Gowder SJ, Devaraj H. 2006. Effect of the food flavour cinnamaldehyde on the antioxidant status of rat kidney. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 99(5):379-82. PMID: 17076691.

Grodstein F, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. 2000. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Annals of Internal Medicine*, 133(12): 933-941. PMID: 11119394

Guo X, Sun W, Huang L, Wu L, Hou Y, Qin L, Liu T. 2017. Effect of Cinnamaldehyde on Glucose Metabolism and Vessel Function. *Med Sci Monit.* 2017 Aug 9 [revised 2017 Aug 1];23:3844-3853. doi: 10.12659/MSM.906027. PMID: 28790298; PMCID: PMC5562185.

Hajhosseini M, Kazemi T, Faradmalb J. 2016. Multistate Models for Survival Analysis of Cardiovascular Disease Process. *Revista Espanola de Cardiologia*, 69 (7), 714-715. doi: 10.1016/j.rec.2016.04.009

Hansson GK, Libby P. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature*, 6, 508-519. Epub 2006 Jun 16. Review. PubMed PMID: 16778830

Harrison DG. 1997. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 20:II-7–II-11. PMID: 9422847.

Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. 2003. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol.*91(3A):7A-11A. PMID: 12645638.

Hartvigsen K, Binder CJ, Hansen LF, Rafia A, Juliano J, Hökkö S, Steinberg D, Palinski W, Witztum JL, Li AC. 2007. A diet-induced hypercholesterolemic murine

model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*27(4):878-85. PMID: 17255537.

Huang TC, Chung YL, Wu ML, Chuang SM. 2011. Cinnamaldehyde Enhances Nrf2 Nuclear Translocation to Upregulate Phase II Detoxifying Enzyme Expression in HepG2 Cells. *Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5164-5171. doi: 10.1021/jf200579h. PMID: 21469739.

Justenhoven C, Obazee O, Brauch H. 2012. The pharmacogenomics of sex hormone metabolism: breast cancer risk in menopausal hormone therapy. *Pharmacogenomics*,13(6), 659–675. doi:10.2217/pgs.11.144. PMID: 22515609

Ka H, Park HJ, Jung HJ, Jong-Won Choi JW, Cho KS, Ha J, Lee KT. 2003. Cinnamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediated mitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Cancer Letters*, 196, 143–152. PMID: 12860272

Kang H, Park SH, Yun JM, Nam TG, Kim YE, Kim DO, Kim YJ. 2014. Effect of cinnamon water extract on monocyte-to macrophage differentiation and scavenger receptor activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 90. doi: 10.1186/1472-6882-14-90. PMID: 24602512; PMCID: PMC3973967.

Kassi E, Spilioti E, Nasiri-Ansari N, Adamopoulos C, Moutsatsou P, Papapanagiotou A, Siasos G, Tousoulis D, Papavassiliou AG. 2015. Vascular Inflammation and Atherosclerosis: The Role of Estrogen Receptors. *Curr Med Chem.*;22(22):2651-65. Review. PubMed PMID: 26051413.

Kim MH, Kim EJ, Choi YY, Hong J, Yang WM. 2017. *Lycium chinense* Improves Post-Menopausal Obesity via Regulation of PPAR- γ and Estrogen Receptor- α/β Expressions. *Am J Chin Med.* 2017;45(2):269-282. doi: 10.1142/S0192415X17500173. PMID: 28231739.

Lamas AZ, Caliman IF, Dalpiaz PL, de Melo AF Jr, Abreu GR, Lemos EM, Gouvea SA, Bissoli NS. 2015. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats. *Life Sci.*124:101-9. doi: 10.1016/j.lfs.2015.01.004. PMID: 25623855

Lee HS, Ahn YJ. 1998. Growth-Inhibiting Effects of Cinnamomum cassia Bark-Derived Materials on Human Intestinal Bacteria. *J. Agric. FoodChem.*, 46, 8-12. PMID: 10554188

Lee HS. 2002. Inhibitory Activity of Cinnamomum cassia Bark-Derived Component against Rat Lens Aldose Reductase. *J Pharm PharmaceutSci*, 5(3), 226-230. PMID: 12553890.

Lee S, Han JM, Kim H, Kim E, Jeong TS, Lee WS, Cho KH. 2004. Synthesis of cinnamic acid derivatives and their inhibitory effectson LDL-oxidation, acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1and -2 activity, and decrease of HDL-particle size. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 4677–4681. PMID:15324887.

Li H, Xie YH, Yang Q, Wang SW, Zhang BL, Wang JB, CaoW, Bi LL, Sun JY, Miao S, Hu J, Zhou XX, Qiu PC. 2012. Cardioprotective Effect of Paeonol and Danshensu Combination on Isoproterenol-Induced Myocardial Injury in Rats. *PLos One*, 7(11), e48872.doi:10.1371/journal.pone.0048872. PMID:23139821; PMCID: PMC3490947.

Liao JC, Deng JS, Chiu CS, Hou WC,Huang SS, Shie PH, Huang GJ. 2012. Anti-Inflammatory Activities of Cinnamomum cassia Constituents In Vitro and In Vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012:429320. doi:10.1155/2012/429320.PMID: 22536283; PMCID: PMC3318905.

Lin CC, Wu SJ, Chang CH, Ng LT. 2003. Antioxidant Activity of Cinnamomum cassia. *Phytother. Res.*,17, 726–730.PMID: 12916067.

Liu J, Peter K, Shi D, Zhang L, Dong G, Zhang D, Breiteneder H, Jakowitsch J, Ma Y. 2014. Traditional Formula, Modern Application: Chinese Medicine Formula Sini Tang Improves Early Ventricular Remodeling and Cardiac Function after Myocardial Infarction in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014:141938. doi: 10.1155/2014/141938. PMID: 24971143; PMCID: PMC4058176.

Liu M, Zhang W, Li X, Han J, Chen Y, Duan Y. 2016. Impact of age and sex on thedevelopment of atherosclerosis and expression of the related genes in apo Edeficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 469(3):456-62. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.064. PMID: 26592663.

Long M, Tao S, Rojo de la Vega M, Jiang T, Wen Q, Park SL, Zhang DD, Wondrak GT. 2015. Nrf2-dependent suppression of azoxymethane/dextran sulfate sodium-

induced colon carcinogenesis by the cinnamon-derived dietary factor cinnamaldehyde. *Cancer Prev Res (Phila)* 8(5):444-54. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-359. PMID: 25712056; PMCID: PMC4417412.

Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL, Trevisan M, Black HR, Heckbert SR, Detrano R, Strickland OL, Wong ND, Crouse JR, Stein E, Cushman M; Women's Health Initiative Investigators. 2003. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 7;349(6):523-34. PMID: 12904517

Marchon C, de Marco Ornelas E, da Silva Viegas KA, Lacchini S, de Souza RR, Fonseca FL, Maifrino LB. 2015. Effects of moderate exercise on the biochemical, physiological, morphological and functional parameters of the aorta in the presence of estrogen deprivation and dyslipidemia: an experimental model. *Cell Physiol Biochem.* 35(1):397-405. doi: 10.1159/000369705. PMID: 25591780.

Marsh MM, Walker VR, Curtiss LK, Banka CL. 1999. Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. *The Journal of Lipid Research*, 40, 893-900. PMID: 10224158.

Medeiros ARS, Lamas AZ, Caliman IF, Dalpiaz PLM, Firmes LB, Abreu GR, Moysés MR, Lemos EM, Reis AM, Bissoli NS. 2012. Tibolone has anti-inflammatory effects in estrogen-deficient female rats on the natriuretic peptide system and TNF-alpha. *Regulatory Peptides*, 179, 55–60. doi:10.1016/j.regpep.2012.08.015. PMID: 22975659.

Misra HP, Fridovich I. 1972. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *Biological Chemistry*, 247 3172-3175. PMID: 4623845.

Moore KJ, Tabas I. 2011. Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Cell*, 145, 345-355. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.005

Mpofu JJ, Moura L, Farr SL, Malta DC, Iser BM, Bernal RTI, Robbins CL, Lobelo F. 2016. Associations between noncommunicable disease risk factors, race, education, and health insurance status among women of reproductive age in Brazil — 2011. *Preventive Medicine Reports*, (3), 333–337. doi: 10.1016/j.pmedr.2016.03.015.

Munnur RK, Nerlekar N, Wong DTL. 2016. Imaging of coronary atherosclerosis in various susceptible groups. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 6 (4), 382-395. doi:10.21037/cdt.2016.03.02

Münzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S. 2010. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *Eur.Heart.J*;31(22):2741-8. doi:10.1093/eurheartj/ehq396. PMID: 20974801.

Oliveira PWC, Souza GJ, Caliman IF, Lamas AZ, Medeiros ARS, Andrade TU, Abreu GR, Figueiredo SG, Bissoli NS. 2014. Metformin ameliorates ovariectomy-induced vascular dysfunction in non-diabetic Wistar rats. *Clinical Science*, 127, 265-275. doi: 10.1042/CS20130553. PubMed PMID: 24521306

Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. 1987. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*. 68(3):231-40. PMID: 3426656.

Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME. 2002. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res*.31;90(10):1087-92. PMID: 12039798.

Peluso I, Morabito G, Urban L, Ioannone F, Serafini M. 2012. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*.12(4):351-60. PMID: 23061409

Rad SK, Kanthimathi MS, Malek SNA, Lee GS, Looi CY, Wong WF. 2015. Cinnamomum cassia Suppresses Caspase-9through Stimulation of AKT1 in MCF-7 Cellsbut Not in MDA-MB-231 Cells. *PLoS ONE*,23;10(12):e0145216. doi:10.1371/journal.pone.0145216. eCollection 2015.PMID: 26700476; PMCID: PMC4689535

Raffai G, Kim B, Park S, Khang G, Lee D, Vanhoutte PM. 2014. Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde-containing micelles induce relaxation of isolated porcine coronary arteries: role of nitric oxide and calcium. *Int J Nanomedicine*.21;9:2557-66. doi: 10.2147/IJN.S56578. PMID: 24904214; PMCID: PMC4039418.

Rodrigues JK, Dib LA, Ferriani RA, Jordão Junior AA, & Navarro, PAAS. 2010. Marcadores séricos de estresse oxidativo e resultados dos procedimentos de reprodução assistida em pacientes inférteis com síndrome dos ovários policísticos e

controles.Rev.Bras.Ginecol.Obstet.32(3):11825.doi.org/10.1590/S01002032010000300004.

Romero-Aleshire MJ, Diamond-Stanic MK, Hasty AH, Hoyer PB, Brooks HL. 2009. Loss of ovarian function in the VCD mouse-model of menopause leads to insulin resistance and a rapid progression into the metabolic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 297(3):R587-92. doi: 10.1152/ajpregu.90762.2008. PMID: 19439618;PMCID: PMC2739794.

Ross R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.*N Engl J Med.* 362:801– 809. PMID: 8479518.

Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. 2012. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem.* 19(28):4850-60. PMID: 22709007.

Song F, Li H, Sun J, Wang S. 2013. Protective effects of cinnamic acid and cinnamic aldehyde on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 150,125-130. PMID: 24001892

Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G. 2003. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation.* 107(24):3059-65. PMID: 12810616.

Subash-Babu P, Alshatwi AA, Ignacimuthu S. 2014. Beneficial Antioxidative and Antiperoxidative Effect of Cinnamaldehyde Protect Streptozotocin-Induced Pancreatic b-Cells Damage in Wistar Rats. *Biomolecules Therapeutics*, 22(1), 47-54. doi: 10.4062/biomolther.2013.100.

Teupser D, Persky AD, Breslow JL. 2003. Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(10):1907-13.

Verspohl EJ, Bauer K, Neddermann E. 2005. Antidiabetic Effect of *Cinnamomum cassia* and *Cinnamomum zeylanicum* In vivo and In vitro. *Phytother. Res.*, 19, 203–206. PMID: 15934022

- Vilela MG; Santos Júnior JL; Silva JGC. 2007. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *Femina*, 35(10): 667-670.
- Wang F, Pu C, Zhou P, Wang P, Liang D, Wang Q, Hu Y, Li B, Hao X. 2015. Cinnamaldehyde Prevents Endothelial Dysfunction Induced by High Glucose by Activating Nrf2. *Cellular Physiology and Biochemistry* 36, 315-324. doi: 10.1159/000374074.
- Wang JC, Bennett M. 2012. Aging and Atherosclerosis: Mechanisms, Functional Consequences, and Potential Therapeutics for Cellular Senescence. *American Heart Association*, 111, 245-259. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.261388
- Warden CH, Fisler JS. 2008. Comparisons of diets used in animal models of high-fatfeeding. *Cell Metab.* 2008 Apr;7(4):277. doi: 10.1016/j.cmet.2008.03.014 PMID: 18396128; PMCID: PMC2394560.
- Weber C, Noels H. 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature America*, 17, 1410-1422. doi: 10.1038/nm.2538
- WHO, World Health Organization (2016). World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 70, Indicator 3.4.1: Mortality rate attributed to cardiovascular disease, cancer, diabetes or chronic respiratory disease.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* .49(5):1304-13. PMID: 8731095.
- Xu KZ, Zhu C, Kim MS, Yamahara J, Li Y. 2009. Pomegranate flower ameliorates fatty liver in an animal model of type 2 diabetes and obesity. *J Ethnopharmacol.* 22;123(2):280-7. doi: 10.1016/j.jep.2009.03.035. PMID: 19429373.
- Yang L, Wu QQ, Liu Y, Hu ZF, Bian ZY, Tang QZ. 2015. Cinnamaldehyde attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(11), 14345-14354. PMID: 26823750;PMC4713536.

Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, Wejj JVV, Hoorn JV, Princen HM, Kooistra T. 2007. Mouse Models for Atherosclerosis and Pharmaceutical Modifiers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, 1706-1721. PMID: 17541027.

Zuo J, Zhao D, Yu N, Fang X, Mu Q, Ma Y, Mo F, Wu R, Ma R, Wang L, Zhu R, Liu H, Zhang D, Gao S. 2017. Cinnamaldehyde Ameliorates Diet-Induced Obesity in Mice by Inducing Browning of White Adipose Tissue. *Cell Physiol Biochem*. 42(4):1514-1525. doi: 10.1159/000479268. PMID:28719892.

Revista: Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

7. ANEXOS



Universidade Vila Velha
Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal (CEUA-UVV)

PARECER DO RELATOR

Parecer Nº. 397-2016

Pesquisador (a) Responsável: Tadeu Uggere de Andrade
 Tipo de Pesquisa: Mestrado
 Instituição onde será desenvolvido: Universidade Vila Velha
 Situação: **Aprovado**

Ao analisar o projeto de pesquisa: "Avaliação do efeito do cinamaldeído sobre o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongas ovariectomizadas knockout para receptores LDL (LDLr^{-/-})", tendo como pesquisador(a) responsável **Prof. Tadeu Uggere de Andrade**, considero que o projeto se encontra adequado e de acordo com as exigências das Resoluções que regem esse Comitê.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **APROVADO**. Serão utilizados no projeto **60 camundongas**.

Vila Velha, 07 de dezembro de 2016.

Prof. Moacir Carretta Júnior
 Relator da CEUA-UVV

Universidade Vila Velha

Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP.: 29102-770
 E-mail: ceua@uvv.br