

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**EVELINE COSTEIRA BÁLSAMO**

**EFEITO HIPOLIPEMIANTE DO EXTRATO DE CANELA (*Cinnamomum zeylanicum*) EM UM MODELO DE HIPERCOLESTEROLEMIA EM CAMUNDONGOS**

**Itaqui  
2017**

**EVELINE COSTEIRA BÁLSAMO**

**EFEITO HIPOLIPEMIANTE DO EXTRATO DE CANELA (*Cinnamomum zeylanicum*) EM UM MODELO DE HIPERCOLESTEROLEMIA EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Cattelan Souza

**Itaqui  
2017**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

B196e Bálamo, Eveline Costeira  
Efeito hipolipemiante do extrato de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) em um modelo de hipercolesterolemia em camundongos / Eveline Costeira Bálamo.  
18 p.  
  
Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade Federal do Pampa, NUTRIÇÃO, 2017.  
"Orientação: Leandro Cattelan Souza".  
  
1. Fitoterápicos. 2. Hipercolesterolemia. 3. Estresse oxidativo. 4. Neuroinflamação. 5. Extrato de Canela. I. Título.

**EVELINE COSTEIRA BÁLSAMO**

**LIPID-LOWERING EFFECT OF CINNAMON EXTRACT (*Cinnamomum zeylanicum*) IN A MODEL OF HYPERCHOLESTEROLEMIA IN MICE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Faculdade de Nutrição da Universidade Federal do Pampa como requisito básico para a conclusão do curso de Nutrição.

Trabalho de conclusão defendido em: 27 de novembro de 2017.  
Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Leandro Cattelan Souza  
Banca  
Curso de Nutrição – UNIPAMPA

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Marina Prigol  
Banca  
Curso de Nutrição – UNIPAMPA

---

Prof. Me. Marcelo Gomes de Gomes  
Banca  
Nutricionista – PPG Bioquímica UNIPAMPA

## AGRADECIMENTOS

Agradecer é admitir que houve um minuto em que se precisou de alguém.

Agradecemos primeiramente a Deus, o criador, por nos iluminar e dar forças para seguirmos em frente.

Aos meus pais Jones e Eleuza, por todo amor que me ofereceram me proporcionando o que houvesse de melhor dentro de suas possibilidades, pela dedicação de uma vida inteira, quando muitas vezes abriram mão de seus sonhos para que eu realizasse os meus.

Agradeço a minha irmã Aline que mesmo longe sempre torceu pela minha vitória.

As minhas amigas de caminhada que a Nutrição me presenteou Bianca e Nathalie, por sempre alegrarem minhas manhãs, pelos momentos maravilhosos e penosos que pudemos dividir nessa longa jornada e por todas as palavras de incentivo que me ajudaram durante esses quatro anos.

Agradeço imensamente a Prof. Dr<sup>a</sup> Silvana Peterini Boeira pela dedicação e sabedoria a qual orientou para construção e delineamento deste trabalho, também pela paciência que dedicou, sempre com entusiasmo e motivação.

Ao Prof. Dr. Cristiano Jesse que acompanhou esta caminhada, sempre mostrando a melhor forma de realização do trabalho, pelos ensinamentos importantes nas orientações técnicas, e, sobretudo, pela atenção e amizade que sempre dedicou.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leandro Cattelan Souza, por me acolher em um momento de dificuldade sempre com paciência e disponibilidade, auxiliando com seu conhecimento e contribuindo com suas orientações e sugestões para a finalização deste estudo.

Por fim agradeço a todos que de alguma forma contribuíram na minha trajetória.

*A experiência é o nome que damos aos nossos erros.*  
(Oscar Wilde)

## RESUMO

A hipercolesterolemia, caracterizada por altos níveis de colesterol, principalmente da fração LDL, constitui o principal fator de risco para a aterosclerose e é um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito terapêutico do extrato de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) em um modelo de hipercolesterolemia em camundongos. Para isso, foram utilizados camundongos C57BJ6 jovens (90 dias de idade) machos selvagens e hipercolesterolêmicos (com deleção gênica do receptor de LDL) que receberam durante 30 dias o extrato de canela (CE) ou veículo. Após o tratamento com CE, foram analisados os parâmetros bioquímicos no sangue (triglicerídeos, colesterol total, LDL-C, HDL-C e LDL oxidada) e marcadores de estresse oxidativo (TRAP, TAR, GSH E ROS) e inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6 e IL-10) no hipocampo dos camundongos. Os resultados do presente estudo mostraram que o CE reverteu o aumento dos níveis de triglicerídeos, colesterol total, LDL-C e LDL oxidada e a diminuição dos níveis de HDL, provocados pela ausência do receptor de LDL. Também foi observado que o CE protegeu totalmente contra a diminuição dos níveis de TRAP, TAR e GSH e a produção de ROS no hipocampo. Por fim, o tratamento com CE foi capaz de diminuir o aumento das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6) e aumentar os níveis da citocina anti-inflamatória (IL-10) no hipocampo dos animais hipercolesterolêmicos. Em conclusão, nós sugerimos que o extrato de *Cinnamomun zeylanicum* apresenta importantes efeitos hipolipemiantes, podendo ser utilizado de forma preventiva ou adjuvante na terapia das dislipidemias.

Palavras-chave: Fitoterápico, Doença de Alzheimer, colesterol, estresse oxidativo, inflamação.

## ABSTRACT

Hypercholesterolemia, characterized by high levels of cholesterol, especially the LDL fraction, is the main risk factor for atherosclerosis and is an important risk factor for the development of Alzheimer's disease. The objective of this study was to verify the therapeutic effect of cinnamon extract (*Cinnamomum zeylanicum*) in a model of hypercholesterolemia in mice. Young male (90 days old) C57BJ6 wild-type and hypercholesterolemic mice (Knockout for LDL receptors) received cinnamon extract (EC) or vehicle during 30 days. After EC treatment, were analyzed the biochemical parameters (triglycerides, total cholesterol, LDL-C, HDL-C and oxidized LDL) in the blood and markers of oxidative stress (TRAP, TAR, GSH and ROS) and inflammation (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6 and IL-10) in the hippocampus of mice. The results of the present study showed that EC reversed the increase in the levels of triglyceride, total cholesterol, LDL-C and oxidized LDL and the decrease in HDL levels, caused by the absence of the LDL receptor. It has also been observed that CE totally protected against the decrease of TRAP, TAR and GSH levels and the production of ROS in the hippocampus. Finally, EC treatment was able to reduce the increase of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) and to increase the levels of the anti-inflammatory cytokine (IL-10) in the hippocampus of hypercholesterolemic animals. In conclusion, we suggest that *Cinnamomum zeylanicum* extract has important lipid-lowering effects and may be used preventively or adjunctively in the treatment of dyslipidemias.

Key words: Herbal medicine, cholesterol, Alzheimer's disease, oxidative stress, inflammation



**Este trabalho está na forma de artigo científico seguindo as normas da  
revista**

Revista de nutrição/ Brazilian Journal of Nutrition

Efeito hipolipemiante do extrato de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) em um  
modelo de hipercolesterolemia em camundongos

Categoria

Bioquímica nutricional

Autores:

Eveline Costeira Bálsamo, Leandro Cattelan Souza<sup>1</sup>

1. Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às  
Moléculas Bioativas, Universidade Federal do Pampa, Itaqui, CEP 97650-000,  
RS, Brasil.

Correspondência pode ser enviada para:

Leandro Cattelan Souza

Número de telefone: 55 3432-1853

E-mail: leandrocattelan@hotmail.com

## **Sumário**

1. Introdução.....	1
2. Materiais e Métodos.....	3
2.1 Animais .....	3
2.2 Drogas e Reagentes .....	3
2.3 Delineamento Experimental .....	3
2.4 Preparação dos tecidos .....	4
2.5 Parâmetros Bioquímicos .....	5
2.6 Parâmetros de estresse oxidativo.....	5
2.6.1 Potencial Antioxidante total (TRAP) .....	5
2.6.2 Reatividade antioxidante total (TAR).....	5
2.6.3 Níveis de ROS .....	6
2.6.4 Glutathiona (GSH) .....	6
2.7 Parâmetros inflamatórios .....	7
2.8 Análise Estatística.....	7
3. Resultados.....	7
4. Discussão .....	11
5. Conclusão.....	14

## 1. Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV), como o acidente vascular cerebral e o infarto do miocárdio, representam hoje a maior causa de morte em países ocidentais [1]. Originam-se principalmente de complicações da aterosclerose, uma síndrome caracterizada pelo acúmulo de lipídeos e células inflamatórias nas paredes internas de artérias e arteríolas, ocasionando a redução da perfusão sanguínea de órgãos vitais [2]. Embora a hipercolesterolemia tenha sido tradicionalmente considerada uma das principais causas da aterogênese, tem sido amplamente demonstrado que a inflamação e o estresse oxidativo também desempenham papéis fundamentais tanto na progressão da aterosclerose quanto na formação de placas vulneráveis [3-5].

O consumo excessivo de calorias e de gorduras saturadas está associado ao aumento da gordura visceral, a qual tem sido implicada com as alterações relacionadas à síndrome metabólica, como a desregulação no metabolismo dos lipídios e da glicose. Nesse contexto, o tecido adiposo visceral é capaz de induzir um estado inflamatório crônico de baixo grau [6]. Quando ocorre uma saturação da estocagem de triglicerídeos nos adipócitos, ocorre liberação sistêmica de ácidos graxos livres e de citocinas inflamatórias, podendo prejudicar os tecidos periféricos como músculo esquelético, fígado, coração e pâncreas, fenômeno designado como lipotoxicidade, o qual é um importante mecanismo para o surgimento da resistência à insulina [6,].

Os camundongos com deleção gênica para os receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL<sup>r/-</sup>) são um modelo de hipercolesterolemia familiar humana. Estes animais apresentam hipercolesterolemia, caracterizada pelo aumento dos níveis de LDL-colesterol, mesmo quando submetidos a uma dieta padrão, podendo desenvolver lesões ateroscleróticas a longo prazo. Devido à ausência dos receptores de LDL, o LDL permanece mais tempo livre na circulação, ocasionando um aumento dos níveis de colesterol no sangue para o dobro do normal [7]. Esses animais *knockouts* vêm sendo bastante utilizados para o estudo dos mecanismos biológicos subjacentes às doenças cardiovasculares, assim como para o estudo de substâncias com potenciais efeitos terapêuticos. Nesse sentido, a busca por medicamentos que possam atuar na prevenção e no tratamento de fatores associados a

hipercolesterolemia é um desafio para a indústria farmacêutica e órgãos de saúde governamentais [8].

Mesmo com o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permanecem como forma alternativa de tratamento em várias partes do mundo, observando-se nas últimas décadas a valorização do emprego de preparações à base de plantas para fins terapêuticos [9]. Dentre as plantas, que tem sido alvo de diversos estudos farmacológicos, a *Cinnamomum zeylanicum* desponta como detentora de um potencial terapêutico. É popularmente conhecida como canela e é uma das especiarias mais conhecidas e usadas na gastronomia portuguesa e em outras partes do mundo, para dar sabor, aroma e cor a alimentos e bebidas [10]. Além das suas características organolépticas, os polifenóis encontrados na canela podem levar a melhorias nos componentes da síndrome metabólica (SM) e diminuição do risco de fatores associados com diabetes e doenças cardiovasculares. Estudos em animais e humanos, envolvendo indivíduos com a SM, Diabetes Mellitus (DM) tipo 2 e síndrome dos ovários policísticos, demonstram efeitos benéficos utilizando canela e extratos aquosos de canela, no que se refere a parâmetros bioquímicos como glicose, insulina, lipídios e antioxidantes, assim como, podem ocorrer efeitos na massa corporal magra e resposta inflamatória [11].

Evidências epidemiológicas e experimentais suportam a associação entre alterações no metabolismo do colesterol e o aparecimento de prejuízos cognitivos, bem como de demência. Muitos dos fatores de risco vasculares clássicos, incluindo hipertensão, DM, e em particular a hipercolesterolemia, também são considerados fatores de risco para doenças neurodegenerativas, principalmente a doença de Alzheimer [12]. Todavia, os mecanismos moleculares pelos quais os níveis de colesterol contribuem para fisiopatologia de doenças neurodegenerativas ainda não estão totalmente elucidados. Somado a isso, até onde sabemos, não existem dados na literatura a respeito do efeito terapêutico da *Cinnamomum zeylanicum* em um modelo transgênico de camundongos hipercolesterolêmicos.

Portanto, o objetivo do presente estudo é investigar os terapêuticos do extrato de canela sobre parâmetros bioquímicos e neuroquímicos em um modelo de hipercolesterolemia em camundongos.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Animais**

Foram utilizados camundongos C57BJ6 (90 dias de idade) machos selvagens e com deleção gênica para os receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDLr<sup>-/-</sup>) pesando entre 40-50g. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno sob condições controladas, com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura (22 ± 2°C). Os camundongos receberam água e dieta padrão *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de cuidados e uso de animais experimentais e a pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Pampa (Unipampa).

### **2.2 Drogas e Reagentes**

O extrato de canela (CE) foi elaborado mediante a utilização das cascas desidratadas de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e obtidas da Empresa Santos Flora Comércio de Ervas Ltda, São Paulo-SP, devidamente identificadas e embaladas. As cascas desidratadas foram moídas e na sequência foi preparado o extrato etanólico, conforme indicação da Farmacopéia Homeopática Brasileira (1997). Os reagentes para as determinações dos parâmetros bioquímicos foram obtidos da empresa Labtest Ltda (BRASIL) e os kits ELISA para as determinações de parâmetros inflamatórios foram obtidos da empresa R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA).

### **2.3 Delineamento Experimental**

Foram utilizados 36 camundongos para a realização de todos os experimentos propostos neste estudo. Os animais foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n= 6/grupo), três correspondendo aos grupos selvagem e três ao grupo LDLr<sup>-/-</sup>: (1) Grupo selvagem/controle; (2) Grupo selvagem/etanol; (3) Grupo selvagem/CE; (4) Grupo LDLr<sup>-/-</sup>/controle; (5) Grupo LDLr<sup>-/-</sup>/Etanol; (6) Grupo LDLr<sup>-/-</sup>/CE. Os camundongos receberam água pura (grupos controle), extrato etanólico de canela (grupos CE) ou veículo etanol 2% (grupo etanol) na água de beber na concentração de 4,5 ml/kg/peso corporal/dia durante 30 dias. A quantidade de CE foi baseada no estudo de Hagenlocher et al. [13] e corresponde a 0.8g da casca de *cinnamomum*/kg

peso corporal. Após 24 horas do tratamento com o extrato de canela ou veículo, todos os animais foram submetidos à eutanásia através da injeção de pentobarbital (180mg/kg, via intraperitoneal) e o sangue e o hipocampo foram removidos para as determinações bioquímicas (**Fig. 1**). O controle da ingestão do extrato assim como a preparação e a troca da mesma nas mamadeiras foi realizada de forma semanal.



**Figura 1.** Procedimentos experimentais. CE, Extrato de canela; LDL-C, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDLox, LDL oxidada; TRAP, potencial reativo antioxidante total; TAR, reatividade antioxidante total; GSH, glutathiona reduzida; ROS, espécies reativas de oxigênio; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa; IL-1 $\beta$ , interleucina-1beta; IL-6, interleucina-6; IL-10, interleucina-10.

## 2.4 Preparação dos tecidos

O hipocampo foi homogeneizado em Tris-HCl a 10Mm (pH 7.4). O homogenato foi centrifugado a 2400g por 15 minutos a 4°C e a fração sobrenadante (S<sub>1</sub>) foi usada para os ensaios neuroquímicos. As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca nos animais anestesiados, usando heparina como anticoagulante, e o plasma foi separado por centrifugação (2400g por 15 minutos).

## **2.5 Parâmetros Bioquímicos**

Os parâmetros bioquímicos colesterol total, colesterol HDL (lipoproteína de densidade alta), LDL (lipoproteína de densidade baixa), LDLox (LDL oxidada), triglicerídeos, lipídios totais e VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) foram analisados espectrofotometricamente através de Kits de diagnóstico padronizados (Labtest®).

## **2.6 Parâmetros de estresse oxidativo**

### **2.6.1 Potencial Antioxidante total (TRAP)**

A medida da capacidade antioxidante total (TRAP) do tecido hipocampal foi realizada segundo o método de Lissi et al. [14]. Esta determinação é dada pela medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pelos radicais peroxila gerados através da decomposição térmica do 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP) à temperatura ambiente. Para a preparação das soluções de uso (ABAP 10 mM, luminol 4 mM e Trolox 80 µM) foi utilizado tampão glicina 0,1 M, pH 8,6. A solução de ABAP foi utilizada como formadora de radicais livres, a de luminol como amplificadora do sinal de quimiluminescência e a de Trolox (vitamina E hidrossolúvel) como padrão antioxidante. Os tubos utilizados para o ensaio permaneciam vazios no escuro por pelo menos 30 minutos. Para a contagem basal (120 segundos), foram adicionados 4 ml de solução de ABAP 10 mM ao vial. A seguir, 10 µl da solução de luminol foram acrescentados e lidos por mais 120 segundos. Essa medida foi considerada o valor inicial. Foram colocados, então, 10 µl da solução de Trolox 80 µM, o qual diminuiu essa luminescência por determinado tempo até os valores iniciais. Para a medida das amostras, adicionou-se 10 µl de homogeneizado previamente incubado com o referido ácido nas concentrações testadas. O tempo necessário para que a luminescência retornasse ao valor inicial foi considerado o tempo de indução. O tempo indução é diretamente proporcional à capacidade antioxidante do tecido comparado com o tempo de indução do Trolox. Os resultados foram expressos em nmol de Trolox/mg de proteína.

### **2.6.2 Reatividade antioxidante total (TAR)**

A TAR no hipocampo foi determinada através da medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pelo 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano)

(ABAP) à temperatura ambiente [15]. Para a preparação das soluções de uso (ABAP 10 mM, luminol 4 mM e Trolox 80 µM) foi utilizado tampão glicina 0,1 M, pH 8,6. A solução de ABAP foi utilizada como formadora de radicais livres, a de luminol como amplificadora do sinal de quimiluminescência e a de Trolox (vitamina E hidrossolúvel) como padrão antioxidante. Inicialmente, a quimiluminescência basal é medida em cintilador através da adição de 4 ml de ABAP 2,0 mM em um tubo no escuro. 15 µl de luminol foram então adicionados ao vial e a quimiluminescência foi medida. Este foi considerado o valor inicial. 10 µl de Trolox 10-100 µM (curva de calibração) ou amostra foram então adicionados e a quimiluminescência foi medida durante 60 seg. O Trolox ou a amostra reduz a quimiluminescência inicial e essa rápida redução na intensidade gerada pelo luminol é considerada uma medida da TAR. A medida da TAR foi expressa como nmol de Trolox/mg de proteína.

### **2.6.3 Níveis de ROS**

Para estimar a produção de ROS no hipocampo, o S<sub>1</sub> foi diluído (1:10) em 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) e incubado com 10 µl de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCHF-DA, 1 mM) à temperatura ambiente durante 30 min. Os níveis de RS foram determinados por um método espectrofluorimétrico, utilizando o ensaio DCHF-DA [16]. O DCHF-DA é um composto não-fluorescente que facilmente atravessa a membrana celular e, na presença de RS, é rapidamente oxidado até diclorofluoresceína (DCF), um derivado fluorescente. A emissão da intensidade da fluorescência de DCF foi registrada a 520 nm (com excitação de 480 nm) 30 minutos após a adição de DCHF-DA ao meio. Os níveis ROS foram expressos como unidades arbitrárias (AU).

### **2.6.4 Glutathiona (GSH)**

Os níveis de GSH no hipocampo foram determinados fluorometricamente segundo Hissin e Hilf [17] utilizando oftalaldeído (OPA) como fluoróforo. Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas em HClO<sub>4</sub> 0,1 M. Os homogeneizados foram centrifugados a 3100 g durante 10 min e os sobrenadantes foram separados para a medição de GSH. S<sub>1</sub> (100 µl) foi incubado com 100 µl de OPA (0,1% em metanol) e 1,8 ml de tampão de fosfato 0,1 M (pH 8,0) durante 15 minutos à temperatura ambiente em escuro. A fluorescência foi medida usando um espectrofotômetro de fluorescência ao comprimento de onda de excitação de 350 nm e ao comprimento de onda de



emissão de 420 nm. Os níveis de GSH foram expressos como nmol/g de tecido.

## 2.7 Parâmetros inflamatórios

Os níveis do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) foram analisados no hipocampo através de kits ELISA Rat Cytokine DuoSet de R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (intervalo de proteína 31.25-2000pg). O nível de citocina foi estimado por interpolação a partir de uma curva padrão por medidas colorimétricas a 450nm (comprimento de onda de correção 540nm) em um leitor de placas ELISA (Berthold Technologies-Apollo 8-LB 912, KG, Alemanha). Os resultados foram expressos em pg/mg de tecido.

## 2.8 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados em média e erro padrão da média. As comparações entre os grupos foram analisadas por meio de ANOVA de uma via, seguida do teste de *post hoc* de Newman-Keuls. Um valor de  $p < 0.05$  foi considerado significativo. Todos os testes foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

## 3. Resultados

### 3.1 Efeito do tratamento com CE sobre os parâmetros bioquímicos dos camundongos LDL<sup>-/-</sup>.

Os resultados da análise estatística mostraram que os camundongos LDL<sup>-/-</sup> dos grupos controle e veículo apresentaram níveis significativamente aumentados de triglicerídeos no sangue, quando comparados aos seus congêneres selvagens. Por outro lado, o tratamento com CE foi capaz de reduzir parcialmente os níveis plasmáticos de triglicerídeos nos camundongos transgênicos (**Fig. 2A**).

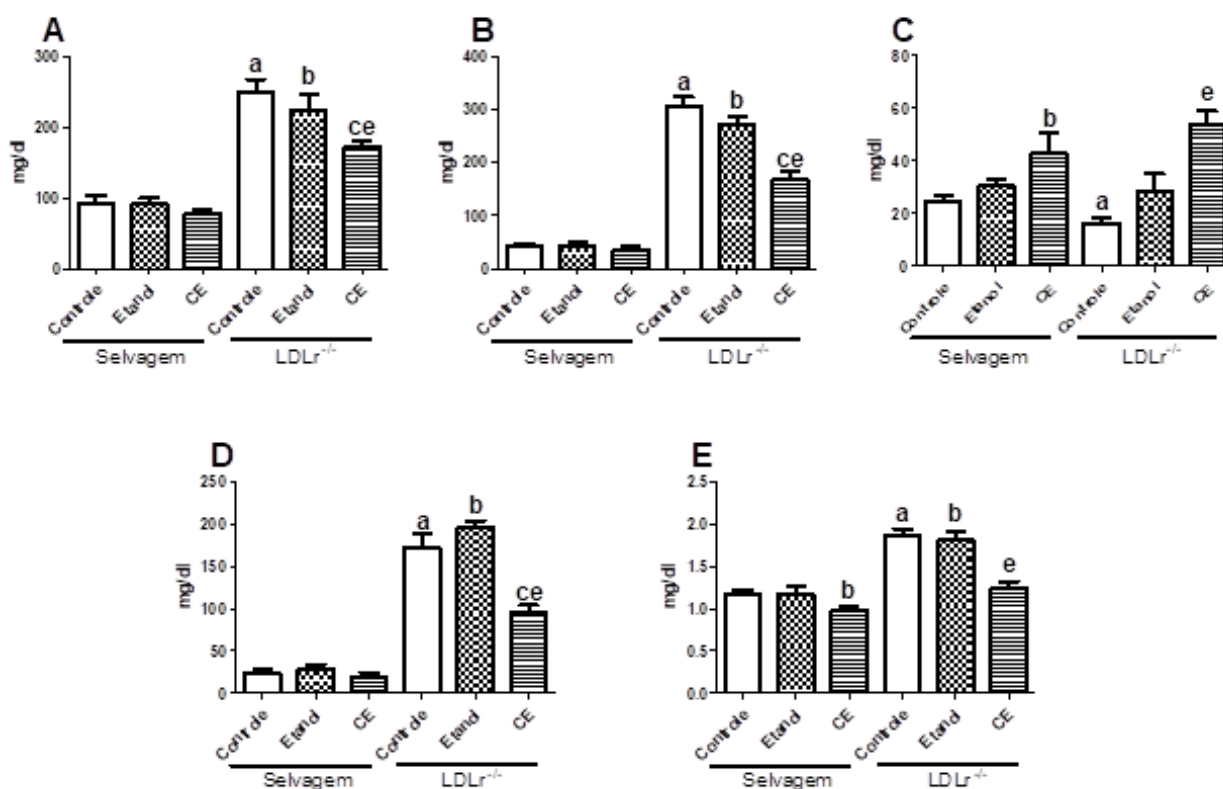
De modo similar, a deleção dos receptores de LDL nos camundongos controle e veículo causaram um aumento nos níveis séricos de colesterol total, em comparação aos grupos selvagens. Em contraste, o tratamento com CE amenizou esse aumento do colesterol total induzido pela deficiência do receptor de LDL (**Fig.2B**).

A ausência dos receptores de LDL causou uma diminuição severa do HDL sérico ( $p < 0,001$ ), quando comparados aos seus pares selvagens. O tratamento com CE impediu a diminuição do HDL nos camundongos LDLR<sup>-/-</sup>, mantendo-os acima dos níveis do grupo selvagem controle. Além disso, foi possível observar que o tratamento com CE aumentou significativamente os níveis de HDL no grupo selvagem, quando comparado aos grupos selvagens veículo e controle (Fig.2C).

Como esperado, a análise estatística demonstrou que os camundongos LDLR<sup>-/-</sup> nos grupos controle e veículo apresentaram valores significativamente aumentados de LDL no sangue. Em contraste, o tratamento com CE atenuou o aumento dos níveis de LDL nos animais hipercolesterolêmicos (Fig.2D).

Ao analisar os níveis de LDL oxidada nos animais LDLR<sup>-/-</sup> controle e veículo foi possível observar um aumento expressivo deste biomarcador. Notavelmente, o tratamento com CE revelou uma proteção total nos camundongos LDLR<sup>-/-</sup>, com os valores de LDL oxidada sendo mantidos aos níveis do grupo controle selvagem nestes animais (Fig.2E).

Não foram observadas reduções na ingestão de água e alimentos em todos os grupos durante o curso do experimento (dados não mostrados).

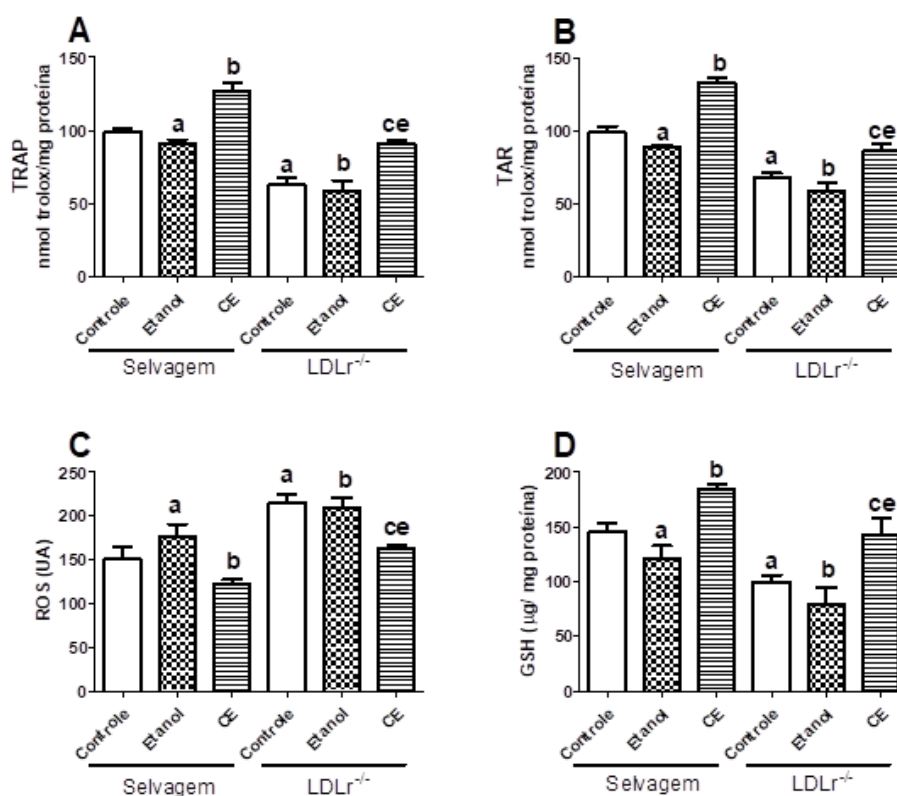


**Fig. 2.** Efeito do tratamento com CE sobre os níveis de (A) triglicerídeos, (B) colesterol total, (C) colesterol HDL, (D) colesterol LDL e (E) LDL oxidada no

plasma de camundongos selvagens e LDLr<sup>-/-</sup>. Os dados são expressos em média e erro padrão da média (n=6 por grupo). a: p<0.05 quando comparado com o grupo controle selvagem; b: p<0.05 quando comparado com o grupo controle etanol; c: quando comparado com o grupo controle LDLr<sup>-/-</sup>; e: quando comparado com o grupo etanol LDLr<sup>-/-</sup> (Anova de uma via seguida do teste de comparações múltiplas *post hoc* de Newman-Keuls).

### **3.2 Efeito do tratamento com CE sobre os parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo dos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.**

O efeito da hipercolesterolemia sobre os parâmetros de estresse oxidativo é mostrado na **figura 3**. Os animais LDLr<sup>-/-</sup> dos grupos controle e veículo apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de TRAP e TAR no hipocampo, quando comparados aos grupos selvagens. Por outro lado, o tratamento com CE protegeu totalmente contra a diminuição nos níveis hipocâmpais de TRAP e TAR nos animais hipercolesterolêmicos (**Fig.3A e 3B**, respectivamente). Quando comparado aos animais selvagens, a ausência dos receptores de LDL causou um aumento na produção de ROS no hipocampo dos camundongos. O tratamento com canela, por sua vez, inibiu a geração de RS no hipocampo dos camundongos hipercolesterolêmicos (**Fig.3C**). Os resultados da análise estatística revelaram que os camundongos LDLr<sup>-/-</sup> dos grupos controle e veículo apresentaram níveis depletados de GSH no hipocampo, quando comparados aos seus congêneres selvagens. Por outro lado, o tratamento com CE foi capaz de proteger totalmente os níveis de GSH no hipocampo dos camundongos transgênicos, mantendo os níveis próximos aos valores encontrados no grupo selvagem controle (**Fig. 3D**).

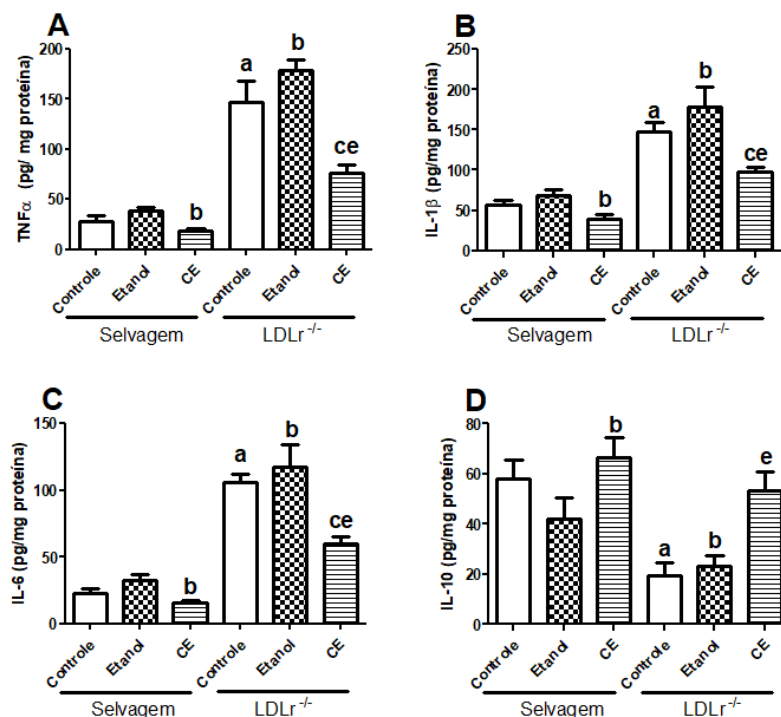


**Fig. 3.** Efeito do tratamento com CE sobre os níveis de (A) TRAP, (B) TAR, (C) ROS e (D) GSH no hipocampo de camundongos selvagens e LDLr<sup>-/-</sup>. Os dados são expressos em média e erro padrão da média (n=6 por grupo). a: p<0.05 quando comparado com o grupo controle selvagem; b: p<0.05 quando comparado com o grupo controle etanol; c: quando comparado com o grupo controle LDLr<sup>-/-</sup>; e: quando comparado com o grupo etanol LDLr<sup>-/-</sup> (Anova de uma via seguida do teste de comparações múltiplas *post hoc* de Newman-Keuls).

### 3.3 Efeito do tratamento com CE sobre a neuroinflamação nos camundongos LDLr<sup>-/-</sup>.

O efeito da hipercolesterolemia sobre a neuroinflamação é mostrado na figura 4. Os animais LDLr<sup>-/-</sup> dos grupos controle e veículo apresentaram níveis marcadamente aumentados das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-6 no hipocampo, quando comparados aos seus pares selvagens. Em contraste, o tratamento com CE inibiu o aumento das citocinas pró-inflamatórias provocado pela deleção do receptor de LDL. Além disso, o extrato de canela causou uma diminuição dos níveis destas citocinas pró-inflamatórias no hipocampo dos camundongos selvagens, evidenciando seu efeito anti-inflamatório (**Fig. 4A, 4B e 4C**, respectivamente). Adicionalmente, os animais hipercolesterolêmicos

mostraram uma diminuição expressiva da citocina anti-inflamatória IL-10. O tratamento com canela, por sua vez, aboliu a diminuição da IL-10 no hipocampo dos camundongos hipercolesterolêmicos. Sustentando o seu efeito antioxidante, o extrato de canela causou um aumento dos níveis de IL-10 no hipocampo dos camundongos selvagens, (**Fig. 4D**).



**Fig. 4.** Efeito do tratamento com CE sobre os níveis de (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-1 $\beta$ , (C) IL-6 e (D) IL-10 no hipocampo de camundongos selvagens e LDLr<sup>-/-</sup>. Os dados são expressos em média e erro padrão da média (n=6 por grupo). a: p<0.05 quando comparado com o grupo controle selvagem; b: p<0.05 quando comparado com o grupo controle etanol; c: quando comparado com o grupo controle LDLr<sup>-/-</sup>; e: quando comparado com o grupo etanol LDLr<sup>-/-</sup> (Anova de uma via seguida do teste de comparações múltiplas post hoc de Newman-Keuls).

#### 4. Discussão

A aterosclerose é uma doença inflamatória que se caracteriza pela formação de placas no interior das artérias, provocando o seu espessamento e perda de elasticidade. Estas placas resultam da acumulação de lipídios e de colesterol. Quando há formação de aterosclerose, o sangue é impedido de circular normalmente, levando ao desenvolvimento de isquemia do miocárdio. O desenvolvimento de aterosclerose causa o aparecimento de patologias

cardiovasculares que podem levar à morte, como é exemplo o enfarte e/ou o ataque cardíaco. A aterosclerose representa uma das principais causas de morte por doença cardiovascular [18,19]. O desenvolvimento desta patologia decorre de concentrações elevadas de colesterol total, triglicerídeos, de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e de lipoproteínas de alta densidade (HDL). As LDL são oxidadas através da ação dos radicais livres ou por enzimas que medeiam a sua oxidação. Depois de alteradas, as LDL ligam-se às paredes das artérias, formando placas de gordura, e iniciando assim o processo inflamatório [18,19].

O presente estudo demonstrou que os animais LDLr (-/-) apresentaram níveis aumentados de TG, CT, LDL E LDLox e níveis diminuídos de colesterol HDL. O extrato de canela (CE) reverteu estas alterações nos parâmetros bioquímicos causados pela ausência do receptor de LDL. Esses resultados são relevantes, pois comprovam que nossos dados estão em linha com descobertas anteriores em que um estudo demonstrou que o tratamento, por um período de trinta dias, em animais, com o extrato aquoso de canela apresenta atividade frente ao DM. Uma vez que influencia na concentração de glicose, diminui o consumo de alimentos e reduz os níveis de colesterol [20,21]. De forma semelhante em outro estudo foi evidenciado o efeito anti-hipertensivo duradouro da administração do extrato da canela (5, 10 e 20 mg/Kg) em modelo com ratos, além de diminuir significativamente os níveis de triglicérides, colesterol total, LDL-colesterol e aumento do HDL-colesterol no plasma [22]. Em um estudo de revisão sobre plantas medicinais que podem ser usadas como alimentos funcionais foram reportados que o consumo de algumas espécies de canela pode ter efeitos benéficos na prevenção e manejo de doenças cardiovasculares, hipertensão e diabetes devido a suas propriedades antioxidantes [23].

Atualmente existe um grande interesse nos estudos dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo [24]. Radicais livres e demais espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas tóxicas e podem causar danos ao DNA, membranas e morte celular em casos extremos [25]. Nesse contexto, o estresse oxidativo está relacionado aos mecanismos patogênicos da aterosclerose e das doenças neurodegenerativas.

No presente estudo, foi avaliado o potencial antioxidante do CE por meio das técnicas TRAP, que mede o tempo que a amostra ou o padrão mantém o sequestro do radical livre, e o índice TAR, que reflete a capacidade e rapidez de uma substância ou de uma mistura delas em participar do processo de transferência de elétrons aos radicais derivados do luminol ou seja, mede a capacidade em reagir frente a uma situação de aumento de radicais livres [26]. Nesse particular, o presente estudo mostrou que o CE reverteu a diminuição dos níveis de TAR e TRAP no hipocampo dos animais hipercolesterolêmicos, corroborando estudos prévios que mostraram que o extrato da Canela possui mecanismos de defesa contra os danos celulares provocados pelos radicais livres de maneira a manter o equilíbrio celular [27,28,29].

Dentre os sistemas de defesa antioxidante dos mamíferos o GSH (glutathiona), um tripeptídeo de baixo peso molecular, composta por glutamato, cisteína e glicina, é considerado o principal antioxidante endógeno não-enzimático. Dentre as suas funções antioxidantes, o GSH atua como quelante de radicais livres e espécies reativas de oxigênio [30]. No presente estudo, nós demonstramos que o CE foi capaz de reverter a depleção do GSH no hipocampo dos animais hipercolesterolêmicos. Um provável mecanismo para o efeito antioxidante da canela é a presença do cinamaldeído (um ácido aromático naturalmente encontrado no óleo de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), que é capaz de elevar os níveis de glutathiona [31]. Além disso, Ranjbar et al. [32] concluíram que o extrato de canela possui significativa atividade antioxidante em seres humanos. Sendo assim, a Canela, a qual é utilizada como um agente aromatizante em alimentos ou chá, pode atuar como um potente antioxidante, podendo ser utilizada em indivíduos que têm doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Apesar do impacto que as doenças cardiovasculares possuem, estas podem ser controladas através da adoção de hábitos de vida saudável, assim como corrigir alguns fatores de risco associados às mesmas, tais como: hipercolesterolemia, hipertensão arterial e estresse oxidativo [33].

Foi sugerido que a hipercolesterolemia pode induzir alterações na barreira hematoencefálica, causando um extravasamento de componentes séricos para dentro do cérebro através da parede dos pequenos vasos cerebrais, permitindo um recrutamento de células imune inflamatórias da circulação sanguínea [12]. Estes efeitos deletérios podem estar relacionados

com a neuroinflamação e os danos oxidativos em estruturas cerebrais em resposta à hipercolesterolemia, aumentando o risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer. No presente estudo, nós verificamos que os animais LDLr<sup>-/-</sup> apresentavam níveis marcadamente elevados das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, bem como níveis diminuídos da citocina anti-inflamatória IL-10 no hipocampo. Estes resultados corroboram dados anteriores em que a fração polifenólica da canela apresentou atividade anti-inflamatória e antiartrítica com elevada redução nos níveis de TNF- $\alpha$  em roedores [34]. Também foi reportado que o consumo diário de proantocianidinas, um composto fenólico que constitui as folhas da canela, contribui para a prevenção da inflamação de baixo-grau, tanto sistêmica como local, no tecido adiposo, bem como, no músculo e fígado, o que pode permitir melhorar a resistência à insulina induzida pela obesidade [35]. Em conjunto com a literatura, os nossos resultados demonstram que o CE inibiu a neuroinflamação causada pela hipercolesterolemia, revertendo as alterações nos níveis das citocinas.

## 5. Conclusão

O extrato de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) apresentou efeitos protetores contra os efeitos deletérios da hipercolesterolemia. Destacamos aqui seus efeitos hipolipemiante, antioxidante e anti-inflamatório. Por fim, nós sugerimos que o extrato de *cinnamomun zeylanicum*, apresenta importantes efeitos hipolipemiantes podendo ser utilizado de forma preventiva ou adjuvante na terapia das dislipidemias.

## 6. Referências

- [1] Santos R.D, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). Arquivo Brasileiro de Cardiologia 2012; 99:1-28.
- [2] Clayton BD, Stok YN. Farmacologia na prática de enfermagem. 13<sup>o</sup>ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- [3] Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340:115-126.



- [4] Kunsch C, Medford, RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999; 85:753-766.
- [5] Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2011;3:204-212.
- [6] Garbarino J, Sturley S. L. Saturated with fat: new perspectives on lipotoxicity. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2009; 110:116-112.
- [7] Merat S, Fruebis J, Sutphin M, Silvestre M, Reaven PD. Effect of aging on aortic expression of the vascular cell adhesion molecule-1 and atherosclerosis in murine models of atherosclerosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2000.
- [8] Seok SH, Park JH, Cho SA, Choi SA. Cholesterol lowering effect of SG-GN3, the extract of salted and fermented small shrimps, *Acetes japonicus*, in Triton WR-1339 or high cholesterol-diet induced hypercholesterolemic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2004;91:231-235.
- [9] Rossato BM et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. *Texto & context enfermagem*, 2012: 21:2.
- [10] Arora DS, Kaur J. Antimicrobial activity of spices. *Internat J Antimicrobial Agent*. 1999; 12:257-262.
- [11] Anderson, A. A. Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity. *Proceedings of the Nutrition Society* 2008; 48:53-67.
- [12] Oliveira J, et al. Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Neuroscience* 2011. 97:99-106.

- [13] Hagenlocher Y, Hösel A, Bischoff SC, Lorentz A. Cinnamon extract reduces symptoms, inflammatory mediators and mast cell markers in murine IL-10(-/-) colitis. *J Nutr Biochem*. 2016;30:85-92.
- [14] Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, Del Castillo MD. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med*. 1995;18:153-158.
- [15] Lissi E, Pascual C, Del Castillo MD.. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic Res Commun*. 1992; 17:299-311.
- [16] Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin J, Mankhetkorn S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 20,70-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiat Phys Chem* 2005; 72:323–331.
- [17] Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem* 1976;74:214-226.
- [18] Reed, JC. *Flavonoids, Atherosclerosis and Cardiovascular Health*. University of Wisconsin-Madison, Department of Animal Sciences 2002; 301:316-342.
- [19] Rasmussen SE, Frederiksen H, Krogholm KS, Poulsen L. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease 2005; 42:159-174.
- [20] ranasinghe P, et al. "Efficacy and safety of 'true'cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as a pharmaceutical agent in diabetes: a systematic review and meta-analysis." *Diabetic medicine* 2012;29:1480-1492.

- [21] Akilen R, Tsiami A, Robinson N. Efficacy and safety of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) as a pharmaceutical agent in diabetes: a systematic review and meta-analysis *Diabet. Med.* 2013;3:505-506.
- [22] Nyadjeu P, et al. Acute and chronic antihypertensive effects of *Cinnamomum zeylanicum* stem bark methanol extract in L-NAME-induced hypertensive rats. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:27.
- [23] Rahmatullah M, et al. A survey of medicinal plants in two areas of Dinajpur district, Bangladesh including plants which can be used as functional foods. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 2009;3:862-876.
- [24] Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 2006;29:113-123.
- [25] Diplock AT, et al. "Functional food science and defence against reactive oxidative species." *British journal of nutrition* 1998;77:112-80.
- [26] Desmarchelier C, Coussio J, Ciccio G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("marcela"). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1998;1163:1170-1131.
- [27] Fang Y, Yang S, Wu, Guoyao. *Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition*. Elsevier Science Inc 2002; 872:879-818.
- [28] Weseler AR, Bast AALT. *Oxidative Stress and Vascular Function: Implications for Pharmacologic Treatments*. Maastricht University Medical Centre. Department of Pharmacology and Toxicology 2010; 154:161-112.
- [29] Valko M, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007; 39:44-84.

[30] Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* 2007;244:82-46.

[31] El-sayed EL-S.M.; Abd el Raouf OM, Fawzy HM, Manie, MF. Comparative study of the possible protective effects of cinnamic Acid and cinnamaldehyde on Cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Biochem Mol toxicol* 2013;508:14-27.

[32] Ranjbar, A. et al. Antioxidative stress potential of *Cinnamomum zeylanicum* in humans: A comparative cross-sectional clinical study. 2006;3:113-117.

[33] Kruger MJ, Davies N, Myburgh KH, Lecour S. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Research International* 2014;41:52-59.

[34] Rathi, B et al. Ameliorative effects of a polyphenolic fraction of *Cinnamomum zeylanicum* L. bark in animal models of inflammation and arthritis. *Scientia Pharmaceutica* 2013;567:589-581.

[35] Terra X, Pallarés V, Ardèvol A, Bladé, C, Fernández-Larrea J, Pujadas G, Blay M. Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2011;22:380-387.