

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Thaisa de Almeida Pinheiro

Avaliação dos efeitos do resveratrol e enalapril sobre o metabolismo glicídico e lipídico de camundongos: marcadores lipogênicos do tecido adiposo branco

Montes Claros  
2017

Thaís de Almeida Pinheiro

Avaliação dos efeitos do resveratrol e enalapril sobre metabolismo glicídico e lipídico de camundongos: marcadores lipogênicos do tecido adiposo branco

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros-Unimontes, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos

Montes Claros

2017

P654a Pinheiro, Thaisa de Almeida.  
Avaliação dos efeitos do resveratrol e enalapril sobre o metabolismo glicídico e lipídico de camundongos [manuscrito] : marcadores lipogênicos do tecido adiposo branco / Thaisa de Almeida Pinheiro. – 2017.  
42 f. : il.

Bibliografia: f. 35-39.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos.

1. Lipogênese. 2. Resveratrol. 3. Enalapril. I. Santos, Sérgio Henrique Sousa. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título. IV. Título: Marcadores lipogênicos do tecido adiposo branco.

Catálogo: Biblioteca Central Professor Antônio Jorge.

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS-UNIMONTES

Reitor: João dos Reis Canela

Vice-reitor: Antônio Alvimar Souza

Pró-reitor de Pesquisa: Virgílio Mesquita Gomes

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Karen Correa Torres Lafetá de Almeida

Coordenadoria de Iniciação Científica: Afrânio Farias de Melo

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dario Alves de Oliveira

Pró-reitor de Pós-graduação: Hercílio Martelli Júnior

Coordenadoria de Pós-graduação Lato-sensu: Felipe Fróes Couto

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Maria de Fátima Rocha Maia

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenadora: Marise Fagundes Silveira

Subcoordenador: Luiz Fernando Rezende



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



MESTRANDO(A): THAISA DE ALMEIDA PINHEIRO.

TÍTULO DO TRABALHO: "Avaliação dos efeitos do resveratrol e enalapril no metabolismo glicídico e lipídico de camundongos: marcadores lipogênicos do tecido adiposo branco".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças..

LINHA DE PESQUISA: Clínica, Diagnóstico e Terapêutica das Doenças.

**BANCA (TITULARES)**

PROF. DR. SERGIO HENRIQUE SOUSA SANTOS, ORIENTADOR/PRESIDENTE

PROF. DR. IGOR VIANA BRANDI

PROF. DR. ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES

**ASSINATURAS**

**BANCA (SUPLENTES)**

PROFª. DRª. LUCINÉIA DE PINHO

PROF. DR. ALFREDO MAURÍCIO BATISTA DE PAULA

**ASSINATURAS**

APROVADA      [ ] REPROVADA

Hospital Universitário Clemente Farias – HUCF

<http://www.unimontes.br> / [ppgcs@unimontes.br](mailto:ppgcs@unimontes.br)

Telefone: (0xx38) 3224-8372 / Fax: (0xx38) 3224-8372

Av. Cula Mangabeira, 562, Santo Expedito, Montes Claros – MG, Brasil – Cep: 39401-001

Dedico esta conquista aos meus pais Geraldo Raimundo Pinheiro e Ivone de Almeida Pinheiro e ao meu irmão Thales de Almeida Pinheiro, meu principal incentivador.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Deus*, pelo dom da vida, por todas as bênçãos derramadas e por ter me dado forças para nunca desistir. A minha *Nossa Senhora, Minha Mãezinha*, por estar sempre ao meu lado, obrigada por cuidar de mim!

Aos meus queridos pais, *Ivone de Almeida Pinheiro* e *Geraldo Raimundo Pinheiro*, que sempre estão torcendo e rezando por mim. Exemplos de amor, honestidade e humildade. Amo Vocês!

Aos meus irmãos *Marla, Mardem e Thales*. Obrigada pela amizade e presença constante em minha vida. Um agradecimento especial a *Thales*, meu maior incentivador. Você é o meu maior e melhor exemplo de profissional, sem você não chegaria até aqui! A vocês, meu mais sincero amor fraterno.

Ao meu professor orientador *Sérgio*, agradeço pela dedicação e compreensão. Sua paixão pela pesquisa é estimulante aos seus orientandos e comigo não foi diferente. Obrigada pela oportunidade concedida. Receba minha gratidão.

Aos meus *familiares e amigos*, pelo incentivo e apoio de sempre. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao meu querido amigo *Rafa*, pela colaboração na realização das dosagens bioquímicas e por ser tão presente em minha vida.

Às *Faculdades Integradas Pitágoras do Norte de Minas – FIP/MOC*, pelo incentivo e oportunidade. Em especial ao Professor Antônio Prates Caldeira, por apostar em mim e a *Lucílio Alkmin, Bruno e Marcelo*, pela ajuda no cuidado com os animais. Ao aluno de iniciação científica *Emílio César*, pela colaboração, inclusive nos finais de semana e feriados.

Aos *amigos do Laboratório de Pesquisa em Saúde*, pelo aprendizado e experiências compartilhadas, em especial a *João Marcus e Débora*.

Aos *professores do PPGCS*, obrigada pelo aprendizado.

## RESUMO

A lipogênese é um processo que envolve a síntese de ácidos graxos usando a glicose como substrato primário. O resveratrol se tornou alvo de estudos mais aprofundados em virtude de sua capacidade de mimetizar os efeitos da restrição calórica. Estudos mostraram que os inibidores da ECA podem reduzir a resistência insulínica no fígado e adipócitos, controlando níveis séricos de glicose e de ácidos graxos livres. O enalapril tem sido alvo de estudos que elucidem seus mecanismos na regulação metabólica dos carboidratos e lipídeos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento oral com resveratrol e enalapril nos perfis lipídico e glicídico em camundongos alimentados com dieta normolipídica. Camundongos Swiss machos foram divididos em quatro grupos e tratados durante oito semanas com: Dieta Padrão *ad libitum* (G1), Dieta Padrão + Resveratrol (G2), Dieta Padrão + Enalapril (G3), Dieta Padrão + Resveratrol + Enalapril (G4), sendo o resveratrol administrado com o alimento e o enalapril com a água. Foram avaliados o peso corporal, perfil lipídico, parâmetros glicêmicos, área dos adipócitos e histomorfologia do tecido adiposo epididimal e peso dos tecidos adiposos epididimal, mesentérico e retroperitoneal. Os níveis de expressão de FAS, ACC, PPAR $\gamma$  e SRBP-1c foram avaliados por RT-PCR. Os principais resultados mostraram uma melhora na sensibilidade à insulina e na tolerância à glicose no grupo G2 comparado ao grupo G1. Resultados semelhantes também foram encontrados para os níveis de glicemia em jejum. A diminuição nos níveis séricos de triglicerídeos foi observada nos animais tratados com resveratrol e enalapril (G4), juntamente com diminuição do peso de tecido adiposo epididimal. Observou-se uma diminuição na expressão de mRNA de FAS, ACC e PPAR $\gamma$  nos animais do grupo G4 em comparação com o grupo G1. Em conclusão, observou-se que a associação entre resveratrol e enalapril melhorou os perfis glicídico e lipídico, modulando a expressão de alguns genes da lipogênese.



Palavras-chave: Lipogênese. Resveratrol. Enalapril

## ABSTRACT

Lipogenesis is a process that involves the synthesis of fatty acids using glucose as primary substrate. Resveratrol has become the target of further studies due to its ability to mimic the calorie restriction effects. Studies have shown that the ACE inhibitors may reduce insulin resistance in the liver and adipocytes by controlling serum glucose and free fatty acids levels. Enalapril has also been the target of studies aimed to elucidate its mechanisms in the metabolic regulation of carbohydrates and lipids. The objective of the present study was to evaluate the effects of oral treatment with resveratrol and enalapril on lipid and glucose profile in mice fed normolipid diet. Male Swiss mice were divided into four groups and treated for eight weeks: Standard diet + *ad libitum* (G1), Standard diet + Resveratrol (G2), Standard diet + Enalapril (G3), Standard diet + Resveratrol + Enalapril (G4), being the resveratrol administered with food and enalapril water. Body weight, lipid profile, glycemic parameters, adipocyte area and histomorphology of epididymal adipose tissue and weight of epididymal, mesenteric and retroperitoneal adipose tissues weight were assessed. The FAS, ACC, PPAR $\gamma$  and SRBP-1c mRNA expression levels were assessed by RT-PCR. The main results evidenced insulin sensitivity and glucose tolerance improvements in the group G2 as compared to G1. Similar results were also found for the fasting glucose levels. Decreased serum triglycerides levels were observed in animals treated with resveratrol and enalapril (G4), along with a decrease in the epididymal adipose tissue weight. A decrease in the FAS, ACC and PPAR $\gamma$  mRNA expression levels in the G4 animals as compared to G1 group. In conclusion, it was observed that the association between resveratrol and enalapril improved the glycaemic and lipid profile and the expression of a few lipogenic genes.

Keywords: Lipogenesis. Resveratrol. Enalapril.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
AGT	Angiotensinogênio
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FAS	Sintetase de ácido graxo
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
IECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
NO	Óxido nítrico
PPAR	Receptor ativado por proliferador peroxissoma
SRA	Sistema renina angiotensina
SRBP-1	Proteína de ligação de elemento de esterol-1
TA	Tecido adiposo
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido adiposo marrom
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	12
1.1 Tecido Adiposo .....	12
1.2 Lipogênese .....	13
1.3 Sistema Renina e Angiotensina (SRA).....	15
1.3.1 Interação do Sistema Renina Angiotensina com o Metabolismo.....	17
1.4 Resveratrol .....	19
1.5 Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECA).....	20
1.5.1 Enalapril .....	21
2 OBJETIVOS .....	22
2.1 Objetivo Geral .....	22
2.2 Objetivos Específicos .....	22
3 PRODUTOS .....	23
3.1 Artigo: EFFECTS OF RESVERATROL AND ACE INHIBITOR ENALAPRIL ON GLUCOSE AND LIPID PROFILES IN MICE .....	24
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
REFERÊNCIAS .....	35
ANEXO .....	40
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Experimentação e Bem Estar Animal ...	40

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Tecido Adiposo

O tecido adiposo (TA) é considerado o principal tecido responsável pelo reservatório energético do organismo, ele é constituído de células denominadas adipócitos, especializadas em armazenar lipídeos na forma de triacilglicerol (TAG). Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídeos na forma de TAG em seu citoplasma, sem que isto seja nocivo à sua integridade funcional. Tais células possuem enzimas e proteínas reguladoras essenciais para sintetizar ácidos graxos (lipogênese) e estocá-los na forma de TAG em períodos onde a oferta de energia é abundante e para mobilizá-los (lipólise) em situações de déficit calórico (1). O TA é responsável pela secreção de vários hormônios e fatores relacionados à regulação de funções fisiológicas, como resposta imunológica, ingestão alimentar e gasto energético, reprodução, crescimento vascular e esquelético e sensibilidade à insulina (2, 3).

O TA é categorizado em dois tipos que apresentam propriedades funcionais distintas nos mamíferos, o tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM) (4). O TAB oferece proteção mecânica contra choques e traumatismos externos, atua no fornecimento e armazenamento de energia, além de permitir um adequado deslizamento entre vísceras e feixes musculares. Ele constitui depósitos localizados em várias regiões do organismo e atua na regulação metabólica, sendo, portanto, considerado um órgão central do controle metabólico. Nas células adiposas brancas, o TAG é armazenado em uma única e grande gota lipídica que ocupa em torno de 90% do citoplasma (5). O TAM, responsável pelo processo de termogênese, é constituído por adipócitos marrons que estocam TAG em várias e pequenas gotículas lipídicas localizadas no citoplasma, assim ele é capaz de catabolizar grande quantidades de ácidos graxos rapidamente (6).

O TAB apresenta funções mais abrangentes, secreta múltiplos peptídeos bioativos que, além de influenciarem a função adipocitária afetam também várias vias metabólicas por meio da circulação sanguínea, assim, embora cada adipócito produza uma pequena quantidade de substâncias, todos os adipócitos em conjunto produzem uma quantidade significativa para causar um grande impacto nas funções corporais (7, 8).

O entendimento da função biológica e endócrina do TA, tornou-se alvo de pesquisas, considerando que tal tecido seja um importante alvo terapêutico na prevenção e tratamento de desordens metabólicas (9, 10).

## 1.2 Lipogênese

A lipogênese é o processo através do qual os ácidos graxos são sintetizados a partir do metabolismo dos carboidratos, usando a glicose como substrato primário. O principal órgão lipogênico é o fígado e esse processo ocorre principalmente no período pós-prandial no citoplasma das células, necessitando, portanto, de excesso de carboidratos para ocorrer (11, 12). Vários genes, citocinas e proteínas estão relacionados ao processo de lipogênese. Dentre os principais genes associados ao metabolismo lipídico estão a sintetase de ácido gordo (FAS), a acetil-CoA carboxilase (ACC), o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ) e a proteína de ligação de elemento regulador de esterol-1c (SRBP-1c), dentre as quais se destaca o PPAR (13, 14).

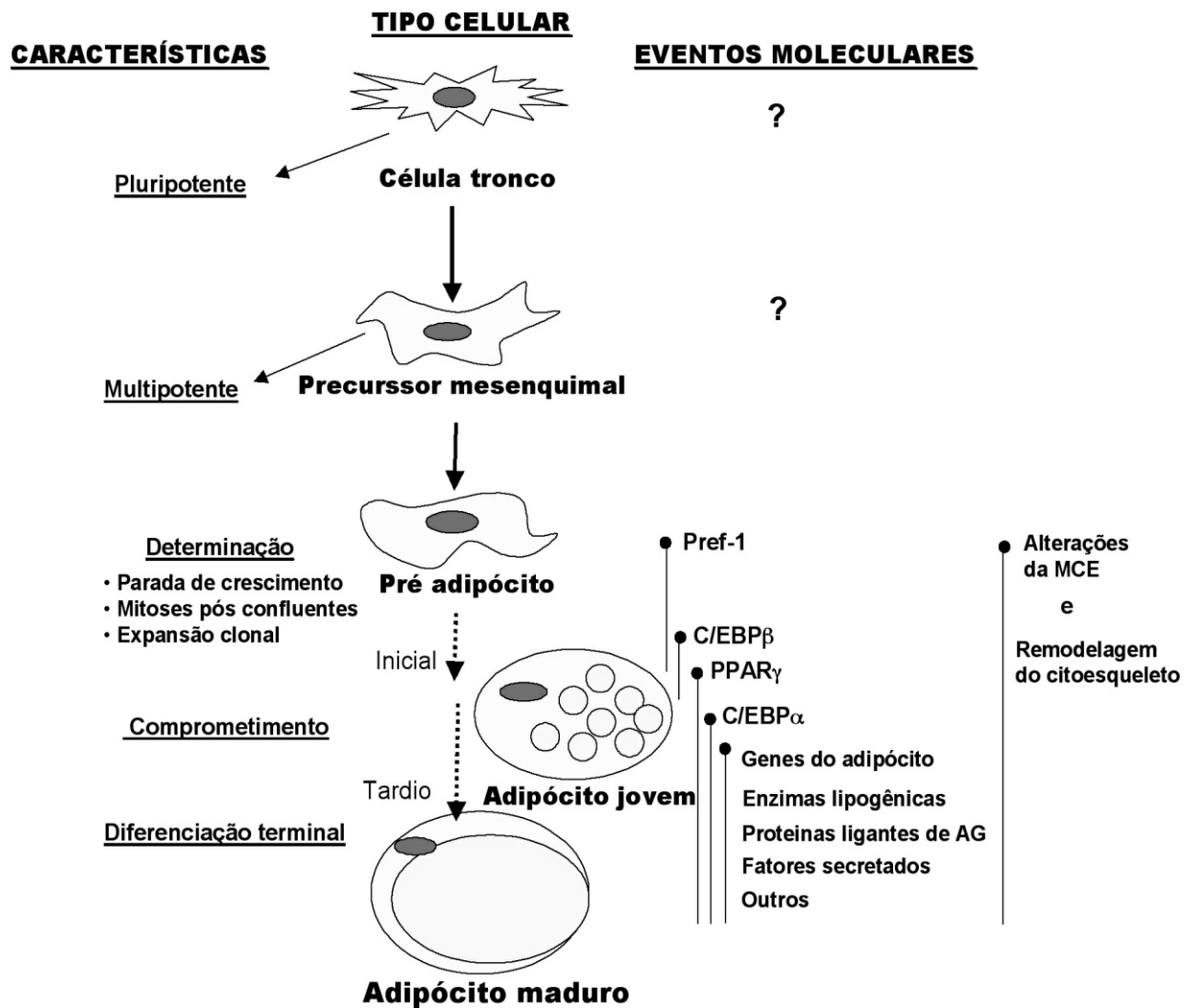
São descritas três isoformas de PPAR: PPAR $\gamma$ , PPAR $\alpha$  e PPAR $\beta$  (também chamado de PPAR $\delta$ ). A isoforma mais abundante no fígado é o PPAR $\alpha$ , já o PPAR $\beta$  é expresso em altos níveis no músculo cardíaco, esquelético e tecido adiposo branco, porém recebe menor atenção que os outros PPARs pela falta de um ligante seletivo (15).

O PPAR $\gamma$  apresenta importante papel na regulação da diferenciação do adipócito e atua como um dos principais sinalizadores endócrino de anormalidade do TA. Ele participa de muitos processos biológicos, no quais se incluem adipogênese, inflamação, aterogênese, homeostase de glicose e metabolismo lipídico. O PPAR $\gamma$  é altamente expresso no tecido adiposo e estimula a transcrição de vários genes específicos do adipócitos, promovendo a transcrição de proteínas lipogênicas indutoras do armazenamento de gordura, acarretando aumento da proporção de células submetidas ao processo de diferenciação que também sofre influência da ação de SRBP-1c. Portanto, o PPAR $\gamma$  é um potente estimulante da cascata de diferenciação celular do adipócito e atua induzindo a diferenciação de fibroblastos em adipócitos (16, 17).

Os pré-adipócitos são linhagens celulares derivadas de células-tronco embrionárias multipotentes de origem mesodérmica, as quais podem se diferenciar em adipócitos, condrócitos, osteoblastos e miócitos. Assim, a diferenciação do pré-adipócito em adipócito é

um processo altamente controlado (Figura 1). Vários fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o PPAR $\gamma$ , o SREBP-1c e as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (CCAAT/enhancer binding protein – C/EBPs) desempenham um papel central na cascata transcripcional que ocorre durante a adipogênese (18).

**Figura 01** – Processo de diferenciação do adipócito.



PPAR- $\gamma$ = receptor  $\gamma$  ativado por proliferadores de peroxissomas; C/EBP= proteína amplificadora ligante ao CCAAT; Pref-1= fator pré-adipócito 1; MEC= matriz extracelular; AG= ácido graxo.

**Fonte:** Adaptado de Alaniz *et al.* (05).

A família de SREBP se constitui de dois membros: o SREBP-1 e o SREBP-2, sendo que existem duas isoformas do SREBP-1 (SRBP-1a e SRBP-1c). O SREBP-2 tem como principal papel controlar a biossíntese de colesterol. Os SREBPs 1a e 1c são controlados

independentemente por regiões regulatórias que parecem responder diferentemente a fatores orgânicos e metabólicos específicos e juntamente com o receptor ativado por PPAR $\gamma$  são fatores de transcrição importantes que controlam tanto o metabolismo lipídico quanto a diferenciação de adipócitos. Os SREBPs participam da ativação direta da expressão de aproximadamente 30 genes que estão relacionados à síntese e captação de ácido graxo, triglicérides, colesterol e fosfolípidos (19, 20). Entre os principais genes, que têm sua expressão ativada pelo SREBP-1c, estão o ACC e o FAS (21).

A ACC é encontrada sob duas formas em roedores e humanos: ACC $\alpha$  (também conhecida como ACC1, 265kDa) e ACC $\beta$  (também conhecida como ACC2, 275 kDa). A ACC $\alpha$  é expressa principalmente no tecido adiposo e no fígado e a ACC $\beta$  é expressa no músculo esquelético, coração e em menor quantidade no fígado. O FAS é outra importante enzima lipogênica que sofre atuação do SREBP-1c, sendo ela responsável pela síntese de ácidos graxos e a catálise da reação da conversão de acetil-CoA e malonil-CoA em ácido graxo, resultando no processo de lipogênese (22).

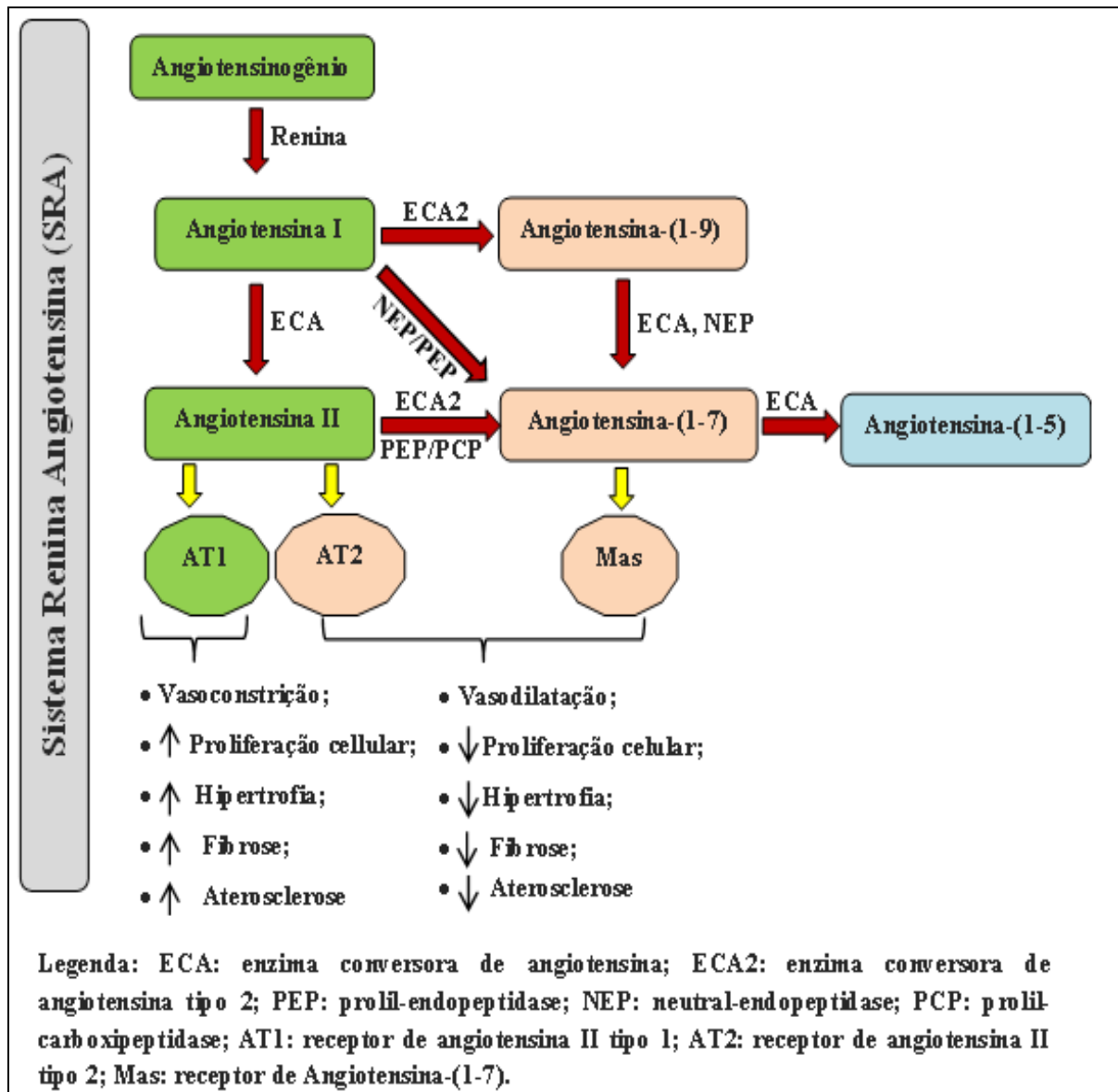
A via glicolítica leva à formação de piruvato, este é transportado para o interior da mitocôndria e transformado em acetil-CoA, a qual sofre ação da ACC e se transforma em malonil-CoA que entra em uma complexa via de ácidos graxos catalisada pela FAS, completando a síntese de TAG (5).

### 1.3 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

O sistema renina-angiotensina se constitui de uma coordenada cascata hormonal circulante iniciada pela liberação da enzima renina, sintetizada pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais. A renina é liberada por exocitose agindo enzimaticamente sobre o angiotensinogênio (AGT), produzido pelo fígado, hidrolisando-o em um decapeptídeo, a angiotensina I (Ang I). Este peptídeo é catabolizado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em um octapeptídeo com relevantes ações biológicas, a Ang II, que age através de seus receptores específicos AT1 e AT2. A Ang II também pode ser formada por outras vias independentes da renina, pela ação de catepsinas e quimases. Outro importante componente desse sistema é o heptapeptídeo Ang-(1-7) que, agindo via receptor Mas, promove geralmente ações antagônicas às geradas pela Ang II. Ele pode ser produzido a partir da Ang II ou da Ang I através da ação da ECA 2, PEP e NEP (Figura 02) (23).



**Figura 02** – Cascata de formação dos principais componentes do Sistema Renina Angiotensina.



**Fonte:** Adaptado de Santos *et al.* (23).

A Ang II é um dos mais potentes vasoconstritores conhecidos e é considerada o principal componente biologicamente ativo do SRA, exercendo seus efeitos via dois receptores distintos, AT1 e AT2, sendo que os mais conhecidos efeitos fisiológicos e patológicos da Ang II são mediados via receptores AT1, pela associação de múltiplas interações com cascatas de transdução de sinal que comandam diversas ações biológicas (24).

Dentre as principais ações via AT1, a Ang II induz vasoconstrição vascular (preferencialmente renal, cerebral e coronariana); a retenção renal de sódio (via liberação de

aldosterona); retenção renal de água (via liberação de vasopressina); supressão da renina (por “feedback” negativo); hipertrofia de músculo liso e cardiomiócitos; estimulação de fibrose no miocárdio e vascular; efeito inotrópico positivo (contração de cardiomiócitos); ativação do sistema nervoso simpático (SNS); estimulação da secreção endotelial e estimulação da formação de espécies reativas de oxigênio (24). O receptor AT<sub>2</sub>, na maioria das vezes, exerce efeitos opostos às ações mediadas pelo receptor AT<sub>1</sub>. Os principais efeitos de sua ativação são o antiproliferativo, a inibição do crescimento celular; diferenciação celular; reparação tecidual; apoptose; vasodilatação; desenvolvimento dos rins e trato urinário e proteção contra isquemia cardíaca (25).

Sabe-se que doenças como hipertensão, hiperlipidemia, diabetes e aterosclerose estão correlacionadas com a disfunção vascular e mudanças estruturais, incluindo disfunção endotelial, alteração da contratilidade e remodelamento vascular; alterações que podem ser geradas por aumento da atividade da Ang II nos vasos (26). Os eventos celulares relacionados com esse processo envolvem mudanças no músculo vascular liso com relação ao crescimento, apoptose, migração celular, inflamação e fibrose. Dentre os vários fatores que influenciam as mudanças celulares, a Ang II aparece como um dos mais importantes (23, 24).

### 1.3.1 Interação do Sistema Renina Angiotensina com o Metabolismo

Estudos sugerem que a Ang II teria um papel potencial significativo na termogênese induzida pelo frio (27). Além disso, ratos obesos *fa/fa* apresentam atividade reduzida da renina plasmática e menor densidade dos receptores AT<sub>1</sub> no tecido adiposo, que se associam a modesta resposta do peptídeo quanto à liberação de norepinefrina, quando comparados aos animais controle (28).

Vários componentes do SRA foram descritos no tecido adiposo (29). Estudos realizados nos últimos anos mostraram que o SRA modula de forma importante o metabolismo e a função endócrina nesse tecido. No quadro de síndrome metabólica já foram descritos aumento da atividade da renina plasmática, maior nível plasmático de angiotensinogênio, maior atividade da ECA e maior nível plasmático de aldosterona (30). Os níveis de mRNA de AGT são 60% maiores no tecido adiposo do que no fígado, que é considerado principal fonte de AGT (31). Além disso, a expressão de AGT é mais elevada em adipócitos viscerais do que em adipócitos

subcutâneos, tanto em ratos como em humanos (32). Os adipócitos de ratos e de humanos apresentam os dois subtipos de receptores angiotensinérgicos, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, embora ainda não estejam claras as funções específicas desencadeadas por esses receptores nessas células. Os sítios de afinidade entre o receptor AT<sub>1</sub> e a angiotensina II têm cinética semelhante aos de outros órgãos alvo do peptídeo, sendo a densidade desse receptor no tecido adiposo semelhante à do coração (33). Estudos utilizando cultura de células adiposas mostraram que o AGT e a Ang II participam da regulação e diferenciação do fenótipo do adipócito. É provável que o aumento no conteúdo de triglicerídeos e da atividade de duas enzimas, a sintetase de ácidos graxos e a glicerol-3-fosfato desidrogenase, sejam mediadas pela Ang II, mostrando que esse peptídeo controla a adiposidade pela regulação da síntese e armazenamento de lipídios (32).

É interessante observar que em cultura de células adiposas, a Ang II é um fator adipogênico, enquanto no animal vivo, atua como importante redutor do peso e da massa adiposa. Sabe-se que existe uma correlação significativa entre a pressão arterial, o índice de massa corporal, e os níveis do AGT plasmático em indivíduos normotensos e magros (30). Aproximadamente 20% da variação do AGT plasmático é determinada pelos níveis plasmáticos da leptina, que serve como um indicador da massa de tecido adiposo, sugerindo que esse tecido contribua para os níveis de AGT plasmático (34).

Estudos experimentais sugerem que o SRA do tecido adiposo, regulado por fatores hormonais e nutricionais, é influenciado pelo grau de obesidade, pelo fato de que a Ang II pode modular o fluxo sanguíneo, por fatores de crescimento e pelo metabolismo local. Assim, a ativação do SRA pode determinar efeitos deletérios locais e sistêmicos em obesos e pode contribuir assim para o surgimento da hipertensão arterial sistêmica (HAS) e outras doenças. A resistência à insulina por sua vez, está associada com o aumento da liberação de ácidos graxos livres que são convertidos no fígado em triglicerídeos e secretados em partículas lipoprotéicas de muita baixa densidade (VLDL) (32, 34).

A resistência à insulina induz uma redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) em modelos experimentais e em indivíduos saudáveis. Indivíduos insulino-resistentes apresentam resposta vasodilatadora endotélio-dependente prejudicada e a disfunção endotelial pode ser também detectada em indivíduos saudáveis com primeiro grau de parentesco com os indivíduos diabéticos do tipo 2. Portanto, a disfunção endotelial é um elo comum entre a

HAS, diabetes melito e a síndrome metabólica (35).

Os estudos na literatura sugerem que a Ang II, via receptor AT<sub>1</sub>, pode modular as ações da insulina. Assim, a ativação do SRA induz o aparecimento de resistência às ações metabólicas da insulina, provocando hiperglicemia e elevação dos níveis de colesterol (VLDL), triglicérides, e potencializando o efeito proliferativo da insulina. Além disso, a hiperglicemia e a hiperinsulinemia ativam o SRA através do aumento da expressão de AGT, Ang II e receptores AT<sub>1</sub>, que podem assim induzir aparecimento do quadro de hipertensão arterial, disfunção cardiovascular e renal (36). Dessa forma, substâncias produzidas pelo tecido adiposo podem interagir com o SRA reforçando suas ações, participando então das alterações cardiovasculares e renais associadas à obesidade e à síndrome metabólica (37).

#### 1.4 Resveratrol

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) um polifenol presente em diversas plantas, foi associado a inúmeras propriedades fisiológicas benéficas à saúde humana (38, 39). Ele está presente em quantidade apreciável em uma variedade de frutos comestíveis incluindo nozes, frutos, e pele de uva (e derivados do vinho tinto). De um ponto de vista botânico, resveratrol atua como fitoalexinas, que é um composto tóxico produzido por uma planta em resposta a um ataque de parasitas, ou sob condições de stress (40).

O resveratrol é um composto fenólico, pertencente ao grupo dos flavonóides, encontrado em cerca de setenta espécies vegetais, em particular, presente abundantemente em uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*), tanto na forma *cis* (*cis*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), como *trans* (*trans*-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), com sua síntese ocorrendo principalmente nas cascas dos frutos (39, 41).

As ações do resveratrol podem ser explicadas pela sua ampla propriedade biológica de ativação e inibição de inúmeros alvos moleculares (40). O resveratrol apresenta atividade anti-tumoral, anti-inflamatório, anti-oxidante, cardioprotetor e neuroprotetor, além de atuar positivamente na expectativa de vida de vários seres vivos. No entanto, recentemente, o resveratrol se tornou alvo de estudos mais aprofundados em virtude de sua capacidade de mimetizar os efeitos da restrição calórica (41). Tais efeitos biológicos são orquestrados por

diversos mecanismos moleculares de ação do resveratrol no metabolismo celular, sobretudo por ativação das sirtuínas (42), que o torna potencial agente na prevenção e tratamento da síndrome metabólica e obesidade.

Os efeitos celulares do resveratrol são pouco conhecidos. Algumas das propriedades fisiológicas do resveratrol, parecem estar relacionadas à ativação da SIRT 1, produzindo, particularmente efeitos metabólicos sobre o organismo animal. Há evidências de que o resveratrol reduz o acúmulo de gordura em camundongos através de SIRT 1, melhora a homeostase da glicose em mamíferos, aumenta a massa e função mitocondrial (43, 44).

O resveratrol aumenta o efeito lipolítico da adrenalina no tecido adiposo (45), estimula a absorção de glicose pelas células da musculatura esquelética, melhora a sensibilidade insulínica (46), inibe a diferenciação e proliferação de preadipócitos (47) e impede a liberação plasmática de ácidos graxos pelos adipócitos (48).

Estudos mostram que o resveratrol exerce efeitos benéficos em animais que consumiram uma dieta rica em gordura (49, 50). Em alguns estudos, a administração crônica do resveratrol foi associada à redução no índice de massa visceral, mas muitas vezes não foi capaz de reduzir o ganho de peso corporal. Em outros estudos, foi observado ainda que a administração do resveratrol melhorou os parâmetros lipídicos, tais como triglicérides, graxos livres ácidos e de colesterol total, quando comparados com animais sem uso do resveratrol. Estudos sugerem que tais associações podem ser desencadeadas pelo aumento na expressão das sirtuínas pelo resveratrol (51, 52). Assim, o uso do resveratrol na prevenção e tratamento da obesidade é algo promissor e que deve ser desvendado com estudos que elucidem tais mecanismos (49, 50).

### 1.5 Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (IECA)

Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) são um grupo de medicamentos largamente utilizados como anti-hipertensivos, nas terapias da insuficiência cardíaca e da nefropatia diabética (53). Os IECA se ligam ao mesmo local da enzima conversora de angiotensina (ECA) na angiotensina I, e assim impedem sua ação vasoconstritora (54). Os receptores da ECA contêm íon zinco e os inibidores contêm um grupo sulfidríla, carboxila ou fosforila que interage com os íons zinco (55). O efeito dos IECA não se limita apenas a

impedir a vasoconstrição mediada pelo angiotensina II, mas também suprimir a síntese de aldosterona endógena (56).

Na década de 70, foram desenvolvidos os primeiros IECA, cujo protótipo é o captopril. Vários IECA, diferindo na duração de ação e na distribuição tecidual são usados clinicamente, incluindo o enalapril e o ramipril (57).

Estudos mostraram que os IECA podem reduzir a resistência insulínica no fígado e adipócitos, causando uma redução na produção hepática de glicose e diminuição dos níveis séricos dos ácidos graxos livres (58). Outros estudos mostraram valores menores na glicemia de jejum quando se usa o IECA se comparado ao placebo. Um dos mecanismos propostos para esta ação dos IECA sobre o metabolismo de carboidratos seria uma redução da secreção de aldosterona e, conseqüentemente, da perda de potássio pelos rins, o que poderia preservar a sensibilidade das células beta (59). Os efeitos metabólicos benéficos dos IECA, principalmente sobre os carboidratos, são amplamente difundidos, constituindo hoje, primeira linha no tratamento de hipertensos diabéticos (53).

### 1.5.1 Enalapril

O maleato de enalapril foi o segundo IECA aprovado nos EUA. Ele é um pró-fármaco o qual precisa ser hidrolisado por esterases no fígado para então produzir o metabólito ativo, o ácido dicarboxílico ou enalaprilat, que é um inibidor altamente potente de ECA (60, 61). O enalapril é absorvido rapidamente quando administrado por via oral e apresenta biodisponibilidade oral em torno de 60 %, sendo reduzida pela presença de alimento (62).

O enalapril é um éster etílico do enalaprilato (62). Possui pouca atividade até que seja metabolizado no fígado em enalaprilat (63). O enalapril tem meia vida de apenas 1,3 horas, enquanto o enalaprilat, em virtude de sua forte ligação à ECA, tem meia vida plasmática de aproximadamente de 11 horas. Quase todo fármaco apresenta excreção renal na forma de enalapril intacto ou enalaprilat. A dose oral de enalapril varia de 2,5 mg a 40 mg/dia, em dose única ou fracionada (64). A escolha do enalapril, como representante da classe de IECA, para o presente estudo, se justifica em função do mesmo apresentar poucos efeitos colaterais quando comparado aos demais representantes da classe. Além disso, ele pode ser administrado em doses menores e menos frequentes (64, 65).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos do tratamento oral com resveratrol e enalapril sobre o metabolismo glicídico e lipídico em camundongos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento oral com resveratrol e enalapril sobre o peso corporal, ingestão alimentar e adiposidade corporal.
- Analisar os efeitos do tratamento oral com resveratrol e enalapril sobre o perfil glicêmico, por meio da glicemia de jejum e dos testes de sensibilidade insulínica e tolerância à glicose.
- Analisar os efeitos do tratamento oral com resveratrol e enalapril sobre o perfil lipídico, por meio da dosagem sérica do colesterol total, HDL e triglicerídeos.
- Avaliar a expressão dos genes relacionados à lipogênese, ACC, FAS, SRBP-1c e PPAR $\gamma$ , no tecido adiposo epididimal dos animais em estudo.
- Comparar os aspectos histomorfológicos dos adipócitos do tecido adiposo epididimal entre os grupos de animais estudados.

### 3 PRODUTOS

3.1 Produto 1: “EFFECTS OF RESVERATROL AND ACE INHIBITOR ENALAPRIL ON GLUCOSE AND LIPID PROFILES IN MICE”, aceito para publicação no periódico Protein & Peptide Letters



# EFFECTS OF RESVERATROL AND ACE INHIBITOR ENALAPRIL ON GLUCOSE AND LIPID PROFILES IN MICE

Thaís de Almeida Pinheiro<sup>a,b</sup>, Thales de Almeida Pinheiro<sup>a,b</sup>, João Marcus Oliveira Andrade<sup>a</sup>, Emílio César Neves Ferreira<sup>b</sup>, Deborah de Farias Lelis<sup>a</sup>, André Luiz Sena Guimarães<sup>a</sup> (PhD), Alfredo Mauricio Batista de Paula<sup>a</sup> (PhD), Antônio Prates Caldeira<sup>a,b</sup> (PhD), Sérgio Henrique Sousa Santos<sup>a,c</sup> (PhD)#.

<sup>a</sup>Laboratory of Health Science, Postgraduate Program in Health Sciences, Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), Montes Claros, MG, Brazil; <sup>b</sup>Faculdades Integradas Pitágoras de Montes Claros (FIPMOC), Montes Claros, MG, Brazil; <sup>c</sup>Institute of Agricultural Science. Food Engineering College, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, MG, Brazil.

**Abstract:** Lipogenesis is a process that involves the synthesis of fatty acids. Resveratrol and enalapril are being studied for their beneficial physiological properties on the glucose and lipid metabolism. The aim of the present study was to evaluate the oral administration of resveratrol and enalapril on the glucose and lipid metabolism, evaluating the white pad lipogenesis genes expression in mice. Swiss male mice were divided into four groups and treated for eight weeks as follows: Standard diet *ad libitum* (G1); Standard diet + Resveratrol (G2); Standard diet + Enalapril (G3); Standard diet + Resveratrol + Enalapril (G4), where resveratrol was administered with the food and enalapril with the water. Body weight, lipid profile, adiposity, glycemic parameters and epididymal adipocytes area were assessed. The expression levels of FAS, ACC, PPAR $\gamma$  and SREBP-1c were assessed by RT-PCR. The main findings showed an improvement in the insulin sensitivity and glucose tolerance in the group G2 as compared to G1. Similar results were also found for the fasting glucose levels. Decreased triglycerides were observed in the animals treated with resveratrol and enalapril, along with decreased weight of the epididymal adipose tissue in the animals of the group G2. A mild reduction in the group G4 as compared to the group G1 was observed. Decreased mRNA expression of FAS, ACC and PPAR $\gamma$  in the animals of the group G4 as compared to the group G1 were observed. In conclusion, it could be observed that the association between resveratrol and enalapril improved the glucose and lipid mice profiles by modulating the expression of some lipogenesis genes, which are critical regulators of metabolic homeostasis.

**Keywords:** Metabolism; Adipose Tissue; Lipogenesis; Resveratrol; Enalapril.

## 1. INTRODUCTION

Lipogenesis is the process by which the fatty acids are synthesized using the glucose derived from the metabolism of dietary carbohydrates as the primary substrate [1]. Among the main genes associated with the lipid metabolism, fatty acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase (ACC), peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- $\gamma$ ), sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) are noteworthy, as they are associated with important roles in the regulation of lipogenesis [2]. The PPAR $\gamma$  is a protein that regulates several biological processes, including glucose homeostasis and lipid metabolism. This enzyme promotes the transcription of lipogenic genes associated with fat storage [3-5]. SREBP1 is a protein that activates the regulation of ACC and FAS. Thus, high levels of this protein increase the synthesis of fatty acids and triglycerides accumulation [6,7].

Resveratrol is a phenolic compound that belongs to the group of flavonoids and is found in several plant species [8-10]. This compound is present in high concentrations in grapes and is associated with many physiological properties benefic to the human health [8, 11]. The resveratrol actions may be explained by its wide biological properties to activate and inhibit numerous molecular targets [9]. Resveratrol has anti-tumor activity, anti-inflammatory, antioxidant, cardioprotective and neuroprotective, and act positively on the life expectancy of many living beings. Furthermore, resveratrol has become the subject of further studies because of its ability to mimic the effects of calorie restriction [10, 12].

Studies showed that ACE inhibitors may reduce the insulin resistance in the liver and adipocytes, causing a reduction of the hepatic production of glucose and decrease of the serum levels of free fatty acids [13]. Among the ACE inhibitors, enalapril has been the target of studies aimed to elucidate its mechanisms on the metabolic regulation of carbohydrates and lipoproteins [14, 15].

In this context, the present study aimed to evaluate the effects of the oral administration of resveratrol and enalapril on the glucose and lipid metabolism, evaluating the white adipose tissue lipogenesis genes expression in mice.

## 2. MATERIALS AND METHOD

### 2.1 Animals

The experiment was conducted in thirty-two male Swiss mice (four weeks old) that were randomly divided into four groups (n=8\each) as follows: G1: Standard Diet (ST) ad libitum; G2: ST + Resveratrol 30mg/Kg/day; G3: ST + Enalapril 10mg/Kg/day; G4: ST + Resveratrol 30mg/Kg/day + Enalapril 10mg/Kg/day. The animals were maintained under controlled conditions of light and temperature.

### 2.2 Diets

Standard diet (Purina - Labina®), which is used for regular mice maintenance, is composed of 66% carbohydrate, 23% protein, and 11% fat, with a total of 3.95 kcal per 1g. The animals were fed a standard diet ad libitum during all the eight weeks of treatment.

### 2.3 Drugs administration

The drugs treatment was initiated when the mice were four weeks old. The resveratrol was administered orally, homogenized in the diet, on a daily basis during a period of 60 days. The enalapril was administered during the same period on a daily basis, where the drug was diluted in water based on the water intake of the mice in the last three days. Every two days the solution containing enalapril was replaced to avoid the mice to reject it due to possible flavor alterations.

### 2.4 The measurement of body weight, food intake, and tissue collection

Food intake and body weight were measured every day during the treatment period. Overnight fasted mice were killed by decapitation and blood samples and white adipose tissues (epididymal, retroperitoneal and mesenteric) were collected, weighed, immediately frozen in dry ice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for posterior analysis.

### 2.5 Glucose tolerance and insulin sensitivity tests (TTG and TSI)

For the glucose-tolerance test, D-glucose (2 mg/g of body weight) was intraperitoneally injected into overnight fasted mice. Glucose levels from tail blood samples were monitored at 0, 15, 30, 60 and 120 min after injection. Insulin sensitivity tests were performed with the animals in the fed state, after intraperitoneal injection of insulin (0.75 U/kg body weight), where tail's blood samples were taken at the time points 0, 15, 30 and 60 min after injection to measure blood glucose levels.

### 2.7 Determination of blood measurements

Serum was obtained after centrifugation (4000 x g for 7 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ). Total serum cholesterol, triglycerides, high-density protein (HDL) and glucose levels were assayed using enzymatic kits (Wiener®, Argentina). Measurements were made in Wiener BT-3000 plus Chemistry Analyzer (Wiener®, Argentina).

### 2.8 Hematoxylin and eosin staining

Epididymal adipose tissue samples from mice were fixed in 10% neutral-buffered formalin at 4°C overnight, dehydrated through a graded alcohol series, xylene and paraffin, and then embedded in paraffin. Five-millimeter sections were prepared for H&E. Images (x10 ocular and x40 objective lenses) were captured with Evolution LC Color light camera (MediaCybernetics®, USA). A total area of 1.84 mm<sup>2</sup>, containing at least 100 fat cells for each sample, was measured using the Image-Pro Plus - Media Cybernetics Software (Rockville, MD, USA).

### 2.9 Reverse transcription and Real Time PCR

Total RNA from the epididymal adipose tissue (Swiss mice) was prepared using TRIzol reagent (Invitrogen Corp.®, San Diego, California, USA), treated with DNase and reverse transcribed with M-MLV (Invitrogen Corp.®) using random hexamer primers. The endogenous glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (internal control), ACC, FAS, PPAR- $\gamma$  and SREBP-1c mRNA were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using SYBR Green reagent (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA) in a Step One Plus equipment (Applied Biosystems-EUA).

Gene expression was normalized to the endogenous GAPDH (FW:5' AAC GAC CCC TTC ATT GAC CTC 3'; RV: 5' CTT CCC ATT CTC GGC CTT GAC 3'). The genes of interest and respective primers were: PPAR- $\gamma$  (FW:5' TTA TGG GTG AAA CTC TGG G 3'; RV: 5' CAA CCA TTG GGT CAG CTC 3'), ACC (FW: 5' GAA CAT CCC CAC GCT AAA CAG A 3'; RV: 5' CTG ACA AGG TGG CGT GAA GG 3'), SREBP-1c (FW: 5' TGC GTG GTT TCC AAC ATG AC 3'; RV: 5' CCT CAT GTA GGA ATA CCC TCC TCA TA 3') and FAS (FW: 5' CAT CCT AGG CAT CCG AGA CCT 3'; RV: 5' ATC GTG TTC TCG TTC CAG GAT C 3'). The relative comparative CT method of Livak and Schmittgen [16] was applied to compare gene expression levels between groups, using the equation  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### 2.10 Statistical analysis

All data were transferred to GraphPad Prism software (Version 5.0®, San Diego, California, USA) and analyzed with 95% confidence ( $p < 0.05$ ). The data are expressed as the means  $\pm$  SEM. The statistical significance of the differences in the mean values between mice groups was assessed by One-Way ANOVA followed by the Bonferroni post-test. For the TTG and TSI, Two-Way ANOVA tests followed by the Bonferroni post-test were applied.

### 2.11 Ethical approval

All experimental protocols were conducted according to international guidelines for animal care and approved by local authorities.

## 2. RESULTS

The blood analysis showed a reduction in the levels of glucose in the group G2 (Standard diet + resveratrol) as compared to the group G1 (Standard diet) (Table 1). A significant reduction in the triglycerides levels was also observed in the group G4 (Standard diet + resveratrol + enalapril) as compared to the group G1 (Standard diet) (Table 1). Significant differences were not observed for the levels of HDL-cholesterol and total cholesterol among groups of treatment as compared to the group G1 (Standard diet) and also between the groups submitted to treatment.

In the glucose tolerance test, decreased blood glucose levels were observed in the group G2 (Standard diet + resveratrol) and G4 (Standard diet + resveratrol + enalapril) as compared to the control group G1 (Figs 1A and B). Additionally, a significant reduction in the blood glucose levels was observed in the group G4 (Standard diet + resveratrol + enalapril) as compared to the group G3 (Standard diet + enalapril) only (Figs 1A and B). In the insulin sensitivity test, a significant reduction in the blood glucose levels was observed in the group G2 as compared to the groups G1 (Standard diet) and G3 (Standard diet + enalapril) (Figs 1C and D). Furthermore, a significant decrease in the blood glucose levels in the group G4 as compared to the control group G3 (Standard diet + enalapril) was observed (Figs 1C and D).

According to the Fig 2A, there were no statistically significant differences in the body weight of the animals among groups at the end of the treatment. Concerning the body adiposity, a significant reduction in the weight of the epididymal adipose tissue was observed in the group G2 (Standard diet + resveratrol) as compared to the groups G1 (Standard diet) and G3 (Standard diet + enalapril) only (Fig 2B). The weight of the mesenteric and retroperitoneal adipose tissues did not differ among groups (Fig 2C and D). A decreased adipocyte area in the epididymal adipose tissue, assessed by histological analysis, in the group G2 (Standard diet + resveratrol) and G4 (Standard diet + resveratrol + enalapril) as compared to the group G1 (Standard diet) was observed (Fig 2E and F).

The lipogenesis markers mRNA expression analysis in the epididymal adipose tissue showed a significant reduction in the group G4 as compared to G1 for the genes: FAS (Fig 3A), ACC (Fig 3B) and PPAR- $\gamma$  (Fig 3C). Statistically significant differences were not observed for the SREBP-1c among groups (Fig 3D).

## 4. DISCUSSION

The present study evaluated the metabolic profile and lipogenesis mRNA expression levels in the epididymal adipose tissue of mice fed a standard diet *ad libitum* and treated preventively with resveratrol, enalapril and the association of these drugs. An improvement in the glycemic profile and a slight improvement in the lipid profile of the animals treated with the association between resveratrol and enalapril were observed. A reduction in the weight of the epididymal adipose tissue of the mice treated with resveratrol, associated with a decrease in the adipocyte area was also observed. Additionally, a significant reduction in the mRNA expression levels of some lipogenesis markers in the epididymal adipose tissue of animals treated with resveratrol and enalapril was found.

The results from the insulin sensitivity and glucose tolerance tests showed that the treatment with resveratrol is beneficial for the glycemic profile. Similar results were also found for the fasting glucose levels. These results are in accordance with several published studies that describe the beneficial effects of the resveratrol on human health [8, 11]. The resveratrol ability to mimic calorie restriction through its numerous molecular mechanisms on the cellular metabolism, which occur mainly by the activation of sirtuins, make it a potential agent in the prevention and treatment of the metabolic syndrome and obesity [10, 12]. Some of the physiological properties of the resveratrol, seems to be related to the activation of SIRT1, exerting metabolic effects on the animal organism. There is evidence that the resveratrol ameliorates the glycemia homeostasis in mammals, and increase the mitochondrial mass and function through the activation of SIRT1 [17, 18]. Other studies show that resveratrol is able to promote the glucose absorption by skeletal muscle cells, improving insulin sensitivity [19].

The results from the lipid profile analysis, show an improvement in the triglycerides levels in all treatment groups as compared to the control group, but a significant reduction was only observed in the group of animals treated with an association of resveratrol and enalapril. Studies demonstrated that the resveratrol increases the adrenaline effect on lipolysis in the adipose tissue [20], inhibits the differentiation and proliferation of preadipocytes [21] and prevents the plasma release of free fatty acids by the adipocytes [22]. In other studies, it was yet observed, that the administration of resveratrol improved the lipid parameters, such as triglyceride levels, free fatty acids and total cholesterol as compared to the animals not treated with resveratrol [12, 23]. Studies suggest that such associations might be triggered by the increased expression of sirtuins by the resveratrol [12, 23]. Thus, the use of resveratrol in the prevention and treatment of obesity is a promising alternative and should be further unveiled in studies aimed to elucidate these mechanisms [24, 25].

Studies have demonstrated that the use of ACE inhibitors may reduce the insulin resistance in the liver and adipocytes, thus causing a reduction in the

hepatic production of glucose and decrease in the serum levels of free fatty acids [13]. Other studies reported decreased levels of fasting glucose when the ACE inhibitor it is used as compared to the placebo [16]. A decreased secretion of aldosterone and consequently potassium loss by the kidneys may be one of the mechanisms by which the ACE inhibitors preserve the sensitivity of the Beta cells [16]. The beneficial metabolic effects of ACE inhibitors, mainly on carbohydrates, are widespread, constituting today, the first-line treatment of diabetic hypertensive [12].

Weight loss was not evidenced in the treatment groups of animals as compared to the control group. However, a significant reduction in the weight of the epididymal adipose tissue of mice treated with resveratrol and a slight reduction in the group treated with resveratrol and enalapril, as compared to the control group, were observed. Studies have demonstrated that the chronic administration of resveratrol is associated with a reduction in the visceral mass index, but it was often unable to reduce body weight gain [12, 23]. This reduction in the weight of the epididymal adipose tissue was associated with the reduction in the adipocytes area. There are evidence that the resveratrol reduces the fat accumulation in mice through the action of SIRT 1 [17, 18], increase the adipose tissue lipolysis [20] and regulates the proliferation of preadipocytes [21]. As described previously, the enalapril also regulates the lipid metabolism as a consequence of its action on the reduction of insulin resistance in the adipocytes, decreasing the serum levels of free fatty acids [13].

The lipid and energetic metabolism are regulated by a complex network of signaling processes, being the investigation of the expression of genes involved in the lipid metabolism, necessary [26], among them FAS, ACC, PPAR- $\gamma$  and SREBP-1c [2, 27].

High levels of SREBP-1c have been associated with the increase in the synthesis of free fatty acids and increased storage of triglycerides by the activation of genes such as ACC and FAS [6, 7]. Studies have been demonstrating that resveratrol may reduce the fat deposition through the inhibition of SREBP-1c via SIRT1-FOXO1 [24] in obese mice [28, 29]. However, our experiment was performed with standard diet fed animals. Thus, the results obtained from this study may apply to the adiposity reduction in individuals not considered obese.

PPAR- $\gamma$  is a central nuclear receptor involved in the lipid and glycemic homeostasis [30] and represents an additional lipogenic mechanism for the SREBP-1c activation and consequently hepatic accumulation of lipids and increased levels of serum cholesterol [31]. Studies demonstrate that the PPAR $\gamma$  develops an important role in the lipid metabolism and promotes positive regulation of the enzymes responsible for the adipogenesis and absorption of fatty acids [32, 33]. PPAR $\gamma$ , via crosstalk with other substances, may suppress the transcription factor of SREBP-1c, thus reducing the expression of enzymes

such as ACC and FAS, which are involved in the fatty acids synthesis [34].

Based on the associations between resveratrol and enalapril with the carbohydrates and lipids metabolism, and knowing that the lipogenesis genes described are correlated with the metabolism of these macromolecules, it is possible to infer that the association between resveratrol and enalapril may decrease the expression of lipogenesis markers, such as fatty acid synthase (FAS) and acetyl-CoA carboxylase (ACC), thus reducing the fatty acids and triglycerides synthesis, and increasing the fatty acids oxidation. These effects appear to be due to synergistic effects of the studied drugs, characterizing the resveratrol as an adjuvant that along with enalapril, may be used for therapeutic purposes. However, although a strong hypothesis for these drugs actions may be via PPAR $\gamma$  further studies are encouraged to elucidate and confirm the mechanism by which the association of these two drugs interacts with the expression of lipogenesis markers and consequently the lipid metabolism. In order to confirm this hypothesis, in vivo studies with PPAR $\gamma$  antagonists or transient knockout of this nuclear receptor by siRNA are encouraged as to prove the participation of PPAR $\gamma$  in the beneficial effects induced by both resveratrol and ACE inhibitors.

## CONCLUSIONS

In conclusion, it was observed that the resveratrol improves the glycemic profile and that the association between resveratrol and enalapril improves the serum levels of triglycerides in mice fed a standard diet ad libitum. In addition, it is concluded that the resveratrol might be associated with a reduction in the visceral adipose tissue, through the decrease in the epididymal adipose tissue weight. Yet, it can be concluded that the association between resveratrol and enalapril reduces the lipogenesis gene expression, thus affecting the metabolic homeostasis.

The present study opens a perspective of a new therapeutic approach that improves metabolic parameters and reduces body adiposity and lipogenesis markers expression in the non-obese population. Future studies must be performed in order to evaluate the molecular mechanisms and interactions involved.

## CONFLICTS OF INTEREST

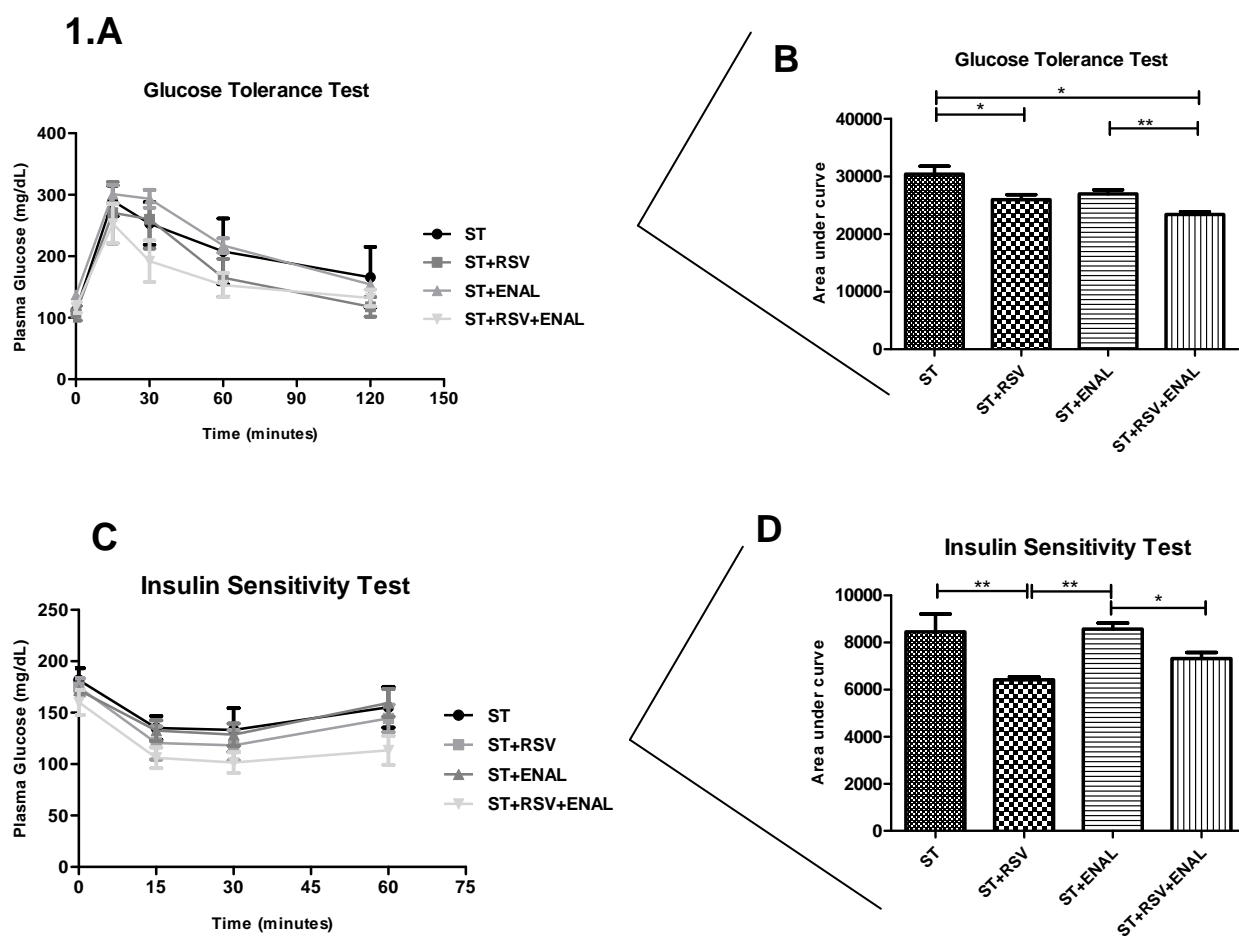
The authors declare no potential conflicts of interest.

## REFERENCES

- [1] Girard, J; Ferre, P; Foufelle, F. Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr.* **1997**, *17*,325-52.
- [2] Beyea M. M.; Heslop C. L.; Sawyer, C. G.; Edwards, J. Y.; Markle, J. G.; Hegele, R. A.; Huff, M. W. Selective up-regulation of LXR-regulated genes ABCA1, ABCG1, and APOE in macrophages through increased endogenous synthesis of 24(S),25-epoxycholesterol. *J Biol Chem.* **2007**, *28*, 5207-16.
- [3] Koutnikova, H.; Cock, T.A.; Watanabe, M.; Houten, S.M.; Champy, M.F.; Dierich, A.; Auwerx J. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2003**, *100*(24), 14457-62.
- [4] Tavares, V.; Hirata, M.H.; Hirata, R.D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*, **2007**, *51*,526-33.
- [5] Desvergne, B. PPARdelta/beta: the lobbyist switching macrophage allegiance in favor of metabolism. *Cell metabolism.*, **2008**, *7*(6), 467-9.
- [6] Bryzgalova, G.; Lundholm, L.; Portwood, N.; Gustafsson, J.A.; Khan, A.; Efendic, S.; Dahlman-Wright, K. Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **2008**, *295*(4), E904-12.
- [7] Shimomura, I.; Matsuda, M.; Hammer, R.E.; Bashmakov, Y.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Molecular cell.* **2000**, *6*(1), 77-86.
- [8] Brown, L.; Kroon, P.A.; Das, D.K.; Das, S.; Tosaki, A.; Chan, V.; Singer, M.V.; Feick, P. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcohol Clin Exp Res.* **2009**, *33*(9), 1513-23.
- [9] Pirola, L.; Frojdo, S. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB life.*, **2008**, *60*(5), 323-32.
- [10] Shakibaei, M.; Harikumar, K.B.; Aggarwal, B.B. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res.* **2009**, *53*(1), 115-28.
- [11] Beaudoux, J.L.; Nivet-Antoine, V.; Giral, P. Resveratrol: a relevant pharmacological approach for the treatment of metabolic syndrome? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*, **2010**, *13*(6), 729-36.
- [12] Baur, J.A.; Pearson, K.J.; Price, N.L.; Jamieson, H.A.; Lerin, C.; Kalra, A.; Prabhu, V.V.; Allard, J.S.; Lopez-Lluch, G.; Lewis, K.; Pistell, P.J.; Poosala, S.; Becker, K.G.; Boss, O.; Gwinn, D.; Wang, M.; Ramaswamy, S.; Fishbein, K.W.; Spencer, R.G.; Lakatta, E.G.; Le, Couteur, D.; Shaw, R.J.; Navas, P.; Puigserver, P.; Ingram, D.K.; de Cabo, R.; Sinclair, D.A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, **2006**, *16*(7117), 337-42.
- [13] Torlone, E.; Rambotti, A.M.; Perriello, G.; Botta, G.; Santeusano, F.; Brunetti, P.; Bolli, G.B. ACE-inhibition increases hepatic and extrahepatic sensitivity to insulin in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and arterial hypertension. *Diabetologia.* **1991**, *34*(2), 119-25.
- [14] Lonn, E.; Weitz, J.; Dzavik, V.; Crowther, M.; Pogue, J.; Bosch, J.; Yusuf, S. Effects of Ramipril and Vitamin E on hematological markers of fibrinolysis, coagulation and endothelial function Results of the MORE-HOPE study. *Canan J Cardiol.*, **2000**, *16*, 233F.
- [15] Hansson, L.; Lindholm, L.H.; Niskanen, L.; Lanke, J.; Hedner, T.; Niklason, A.; Luomanmäki, K.; Dahlöf, B.; de Faire, U.; Mörlin, C.; Karlberg, B.E.; Wester, P.O.; Björck, J.E. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet.*, **1999**, *20*(9153), 611-6.

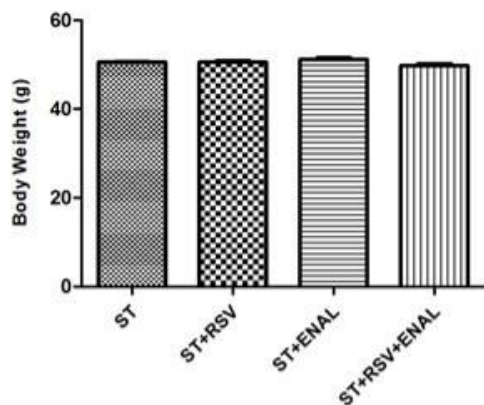
- [16] Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.*, **2001**, 25(4), 402-8.
- [17] Rivera, L.; Moron, R.; Zarzuelo, A.; Galisteo, M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol.* **2009**, 15(6), 1053-63.
- [18] Valenzano, D.R.; Terzibasi, E.; Genade, T.; Cattaneo, A.; Domenici, L.; Cellierino, A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol.* **2006**, 16(3), 296-300.
- [19] Breen, D.M.; Sanli, T.; Giacca, A.; Tsiani, E. Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochem Biophys Res Commun.*, **2008**, 12(1), 117-22.
- [20] Pedersen, S.B.; Olholm, J.; Paulsen, S.K.; Bennetzen, M.F.; Richelsen, B. Low Sirt1 expression, which is upregulated by fasting, in human adipose tissue from obese women. *Int J Obes (Lond).* **2008**, 32(8), 1250-5
- [21] Bai, L.; Pang, W.J.; Yang, Y.J.; Yang, G.S. Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Mol Cell Biochem.* **2008**, 307(1-2), 129-40.
- [22] Backesjo, C.M.; Li, Y.; Lindgren, U.; Haldosen, L.A. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res.* **2006**, 21(7), 993-1002.
- [23] Barger, J.L.; Kayo, T.; Vann, J.M.; Arias, E.B.; Wang, J.; Hacker, T.A.; Wang, Y.; Raederstorff, D.; Morrow, J.D.; Leeuwenburgh, C.; Allison, D.B.; Saupe, K.W.; Cartee, G.D.; Weindruch, R.; Prolla, T.A.. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PLoS one.* **2008**, 3(6), 2264.
- [24] Wood, J.G.; Rogina, B.; Lavu, S.; Howitz, K.; Helfand, S.L.; Tatar, M.; Sinclair, D. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature.*, **2004**, 430(7000), 686-9.
- [25] Zou, S.; Carey, J.R.; Liedo, P.; Ingram, D.K.; Muller, H.G.; Wang, J.L.; Yao, F.; Yu, B.; Zhou, A.. The longevity effect of resveratrol depends on dietary composition and calorie intake in a tephritid fruit fly. *Exp Gerontol.* **2009**, 44(6-7), 472-6.
- [26] Yang, Z.H.; Miyahara, H.; Takeo, J.; Katayama, M. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetol Metab Syndr.* **2012**, 4(1), 32.
- [27] Tontonoz, P.; Spiegelman, B.M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem.*, **2008**, 77, 289-312.
- [28] Wang, G.L.; Fu, Y.C.; Xu, W.C.; Feng, Y.Q.; Fang, S.R.; Zhou, X.H. Resveratrol inhibits the expression of SREBP1 in cell model of steatosis via Sirt1-FOXO1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.*, **2009**, 380(3), 644-9.
- [29] Ponugoti, B.; Kim, D.H.; Xiao, Z.; Smith, Z.; Miao, J.; Zang, M.; . SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem.* **2010**, 29(44), 33959-70.
- [30] Moran-Salvador, E.; Lopez-Parra, M.; Garcia-Alonso, V.; Titos, E.; Martinez-Clemente, M.; Gonzalez-Periz, A.; López-Vicario, C.; Barak, Y.; Arroyo, V.; Clària, J. Role for PPAR gamma in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J.*, **2011**, 25(8), 2538-50.
- [31] Pettinelli, P.; Videla, L.A. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. *J Clin Endocrinol Metab.*, **2011**, 96(5), 1424-30.
- [32] Calder, P.C. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr.* **2012**, 142(3), 592S-599S.
- [33] Puglisi, M.J.; Hasty, A.H.; Saraswathi, V. The role of adipose tissue in mediating the beneficial effects of dietary fish oil. *J Nutr Biochem.*, **2011**, 22(2), 101-8.
- [34] Suchankova, G.; Tekle, M.; Saha, A.K.; Ruderman, N.B.; Clarke, S.D.; Gettys, T.W. Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. *Biochem Biophys Res Commun.*, **2005**, 326(4), 851-8.

## FIGURES AND LEGENDS

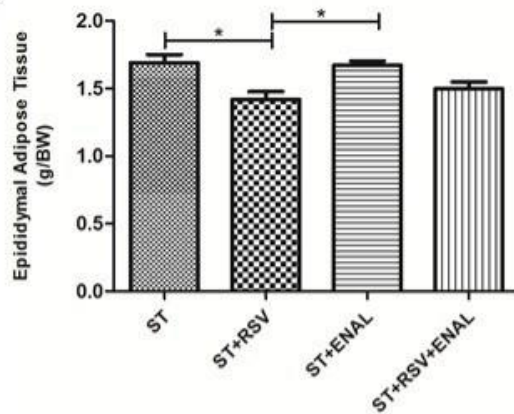


**Fig. 1.** Glucose tolerance (Fig. A and B) and Insulin sensitivity (Fig. C and D) tests in mice fed with standard diet and treated with enalapril and resveratrol. Data are presented as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

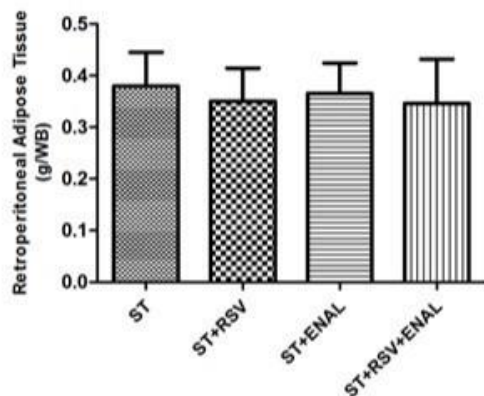
## 2.A



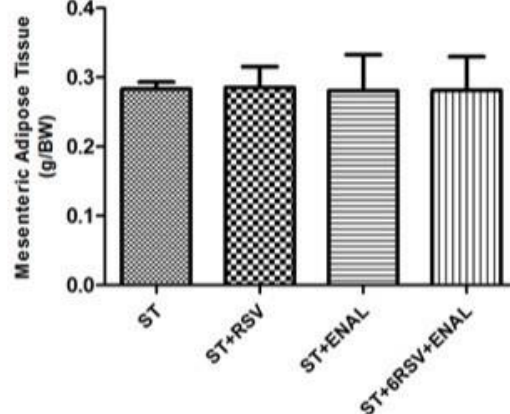
## B



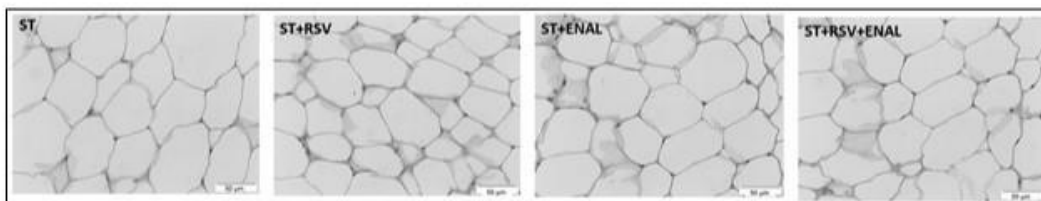
## C



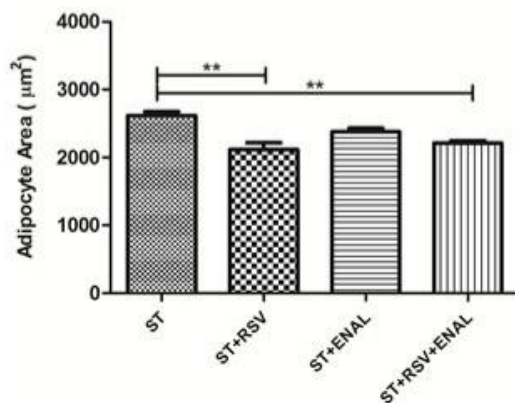
## D



## E

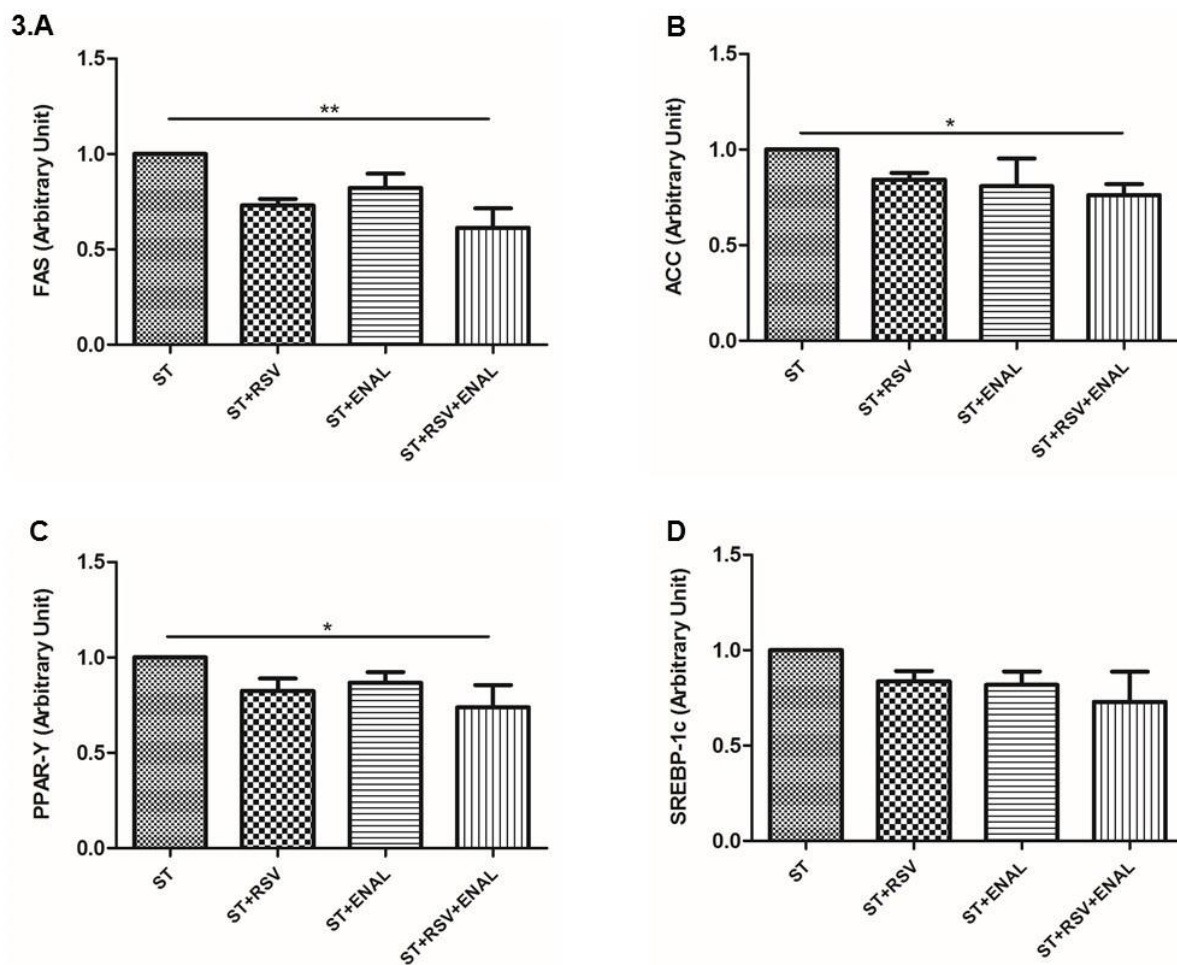


## F



**Fig. 2.** Body weight, fat weight, adipocyte area and hematoxylin/eosin staining in mice fed a standard diet and treated with enalapril and resveratrol. Total body weight (A), epididymal adipose tissue weight (B), retroperitoneal adipose tissue weight (C), mesenteric adipose tissue weight (D), hematoxylin and eosin staining (E) and epididymal adipocyte area (F), Data are presented as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .





**Fig. 3.** mRNA expression of lipogenesis markers by qRT-PCR in epididymal adipose tissue of the mice fed a standard diet and treated with enalapril and resveratrol. (A) Fatty acid synthesis (FAS). (B) Acetyl-CoA carboxylase (ACC). (C) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- $\gamma$ ). (D) Sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c). Data are presented as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Table 1. Plasma glucose and lipid parameters.**

	<b>G1: Standard diet</b>	<b>G2: Standard diet + Resveratrol</b>	<b>G3: Standard diet + Enalapril</b>	<b>G4: Standard diet + Resveratrol + Enalapril</b>
Glucose (mg/dL)	88 ± 2	79 ± 3 *	81 ± 4	84 ± 4
Total cholesterol (mg/dL)	113 ± 11	120 ± 34	114 ± 8	117 ± 13
High-density lipoprotein (mg/dL)	60 ± 10	57 ± 2	59 ± 15	56 ± 15
Triglycerides (mg/dL)	181 ± 55	136 ± 41	167 ± 38	85 ± 25 * &

**Table 1** – Plasma glucose and lipid parameters in mice fed with standard diet and treated with enalapril and resveratrol. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . \* Between treatment groups G2 (Standard diet + Resveratrol) and G1 (ST); \* Between treatment groups G4 (Standard diet + Resveratrol + Enalapril) and G1 (ST); & Between treatment groups G4 (Standard diet + Resveratrol + Enalapril) and G3 (Standard diet + Enalapril).

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho, em síntese, mostraram que camundongos alimentados com dieta normolípídica e tratados com resveratrol apresentaram melhora nos testes de sensibilidade insulínica e tolerância a glicose e redução nos valores de triglicérides, quando tratados com a associação de enalapril e resveratrol. Verificou-se ainda que a administração de resveratrol foi associado a uma redução no tecido adiposo visceral, através da diminuição do peso de tecido adiposo epididimal. Pode-se concluir ainda que a associação entre resveratrol e enalapril reduz a expressão de alguns genes da lipogênese, afetando assim a homeostase metabólica.

Em conjunto, esses achados abrem uma perspectiva de uma nova abordagem terapêutica que melhora os parâmetros metabólicos, reduz a adiposidade corporal e a expressão de marcadores da lipogênese na população não-obesa, tornando-se necessário, entretanto, a realização de estudos futuros que elucidem os mecanismos moleculares e as interações envolvidas em tais achados.

## REFERÊNCIAS

01. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Oct;11(8):327-32. PubMed PMID: 10996528.
02. Lin YT, et al. Inhibition of adipogenesis by RGD-dependent disintegrin. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(10):1469-1478.
03. Majka SM. et al. De novo generation of white adipocytes from the myeloid lineage via mesenchymal intermediates is age, adipose depot, and gender specific. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(33):14781-14786.
04. Querioz JCF, Alonso-Vale MIC, Curi R, Lima FB. Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53(5):582-594.
05. Alaniz MHF, Takada J, Vale MICA, Lima FB. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(2):216-229.
06. Smorlesi A, et al. The adipose organ: White-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev.* 2012;13(2):83-96.
07. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280:827-847.
08. Fonseca AMH, Takada J, Alonso VMI, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50:216-229.
09. PI-SUNIER, X. A clinical view of the obesity problem. *Science*, v. 299, p. 859-860, 2003
10. Trayhurn P. Adipocyte biology. *Obes Rev.* 2007 Mar;8 Suppl 1:41-4. PubMed PMID: 17316300.
11. Schutz Y, et al. Dietary fat, lipogenesis and energy balance. *Physiology & Behavior*, v.83, n.4, p.557-564. 2004.
12. Lafontan M et al. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes & Metabolism*, v.40, n.1, p.16-28. 2014.
13. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest.* 2006;116(3):571-580.
14. Beyea M. M.; Heslop C. L.; Sawyer, C. G.; Edwards, J. Y.; Markle, J. G.; Hegele, R. A.; Huff, M. W. Selective up-regulation of LXR-regulated genes ABCA1, ABCG1, and APOE in macrophages through increased endogenous synthesis of 24(S),25-epoxycholesterol. *J Biol Chem.*, 2007, 28, 5207-16.
15. Grimaldi PA. The roles of PPARs in adipocyte differentiation. *Prog Lipid Res.* 2001;40:269-281.
16. Tavares V, Hirata MH, Hirata RD. Receptor Ativado por Proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ): Estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem

- terapêutica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(6):526-533.
17. Desvergne B. PPARdelta/beta: the lobbyist switching macrophage allegiance in favor of metabolism. *Cell Metabolism.* 2008;7(6):467-469
  18. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998;78:783-809.
  19. Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1529:103-113.
  20. Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue N, Toyoshima H, et al. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286:176-183.
  21. Cedernaes J, et al. Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase 1 index is increased and linoleic acids is decreased in obesity-prone rats fed a high-fat diet. *Lipids Health Dis.* 2013;12:2.
  22. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science.* 2001;291(5513):2613–2616.
  23. Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Experimental physiology.* 2008 May;93(5):519-27. PubMed PMID: 18310257.
  24. Hainault I, Nebout G, Turban S, Ardouin B, Ferre P, Quignard-Boulangé A. Adipose tissue-specific increase in angiotensinogen expression and secretion in the obese (fa/fa) Zucker rat. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism.* 2002 Jan;282(1):E59-66. PubMed PMID: 11739084.
  25. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research.* 2005 Jun;11(6):RA194-205. PubMed PMID: 15917731.
  26. Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L, van Kats JP, Saxena PR, et al. Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation.* 2004 May 18;109(19):2296-301. PubMed PMID: 15117835.
  27. Cassis LA. Role of angiotensin II in brown adipose thermogenesis during cold acclimation. *The American journal of physiology.* 1993 Dec;265(6 Pt 1):E860-5. PubMed PMID: 8279541.
  28. Cassis LA, Fetting MJ, Roe AL, Shenoy UR, Howard G. Characterization and regulation of angiotensin II receptors in rat adipose tissue. *Angiotensin receptors in adipose tissue. Advances in experimental medicine and biology.* 1996;396:39-47. PubMed PMID: 8726684.
  29. Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulangé A, Turban S, Saint-Marc P, et al. Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. *Endocrinology.* 2001 Dec;142(12):5220-5. PubMed PMID: 11713218.
  30. Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension.* 2000 Jun;35(6):1270-7. PubMed PMID: 10856276.

31. Harp JB, DiGirolamo M. Components of the renin-angiotensin system in adipose tissue: changes with maturation and adipose mass enlargement. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 1995 Sep;50(5):B270-6. PubMed PMID: 7671018.
32. Safonova I, Aubert J, Negrel R, Ailhaud G. Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. *The Biochemical journal*. 1997 Feb 15;322 ( Pt 1):235-9. PubMed PMID: 9078267. Pubmed Central PMCID: 1218182.
33. Cassis L, Laughter A, Fettinger M, Akers S, Speth R, Burke G, et al. Cold exposure regulates the renin-angiotensin system. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1998 Aug;286(2):718-26. PubMed PMID: 9694926.
34. Prasad A, Quyyumi AA. Renin-angiotensin system and angiotensin receptor blockers in the metabolic syndrome. *Circulation*. 2004 Sep 14;110(11):1507-12. PubMed PMID: 15364819.
35. Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A, Okamura T. Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension*. 2004 Feb;43(2):255-62. PubMed PMID: 14698997.
36. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2003 Jun;35(6):807-25. PubMed PMID: 12676168.
37. Blaj S, Stanciu S, Jurcut C, Ciobica L. Hypertension in obese patients: a dysmetabolic hypertension with a possible adipocyte dysfunction mechanism. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne*. 2003;41(2):103-11. PubMed PMID: 15526495.
38. Beaudeau JL, Nivet-Antoine V, Giral P. Resveratrol: a relevant pharmacological approach for the treatment of metabolic syndrome? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2010 Nov;13(6):729-36. PubMed PMID: 20823772.
39. Brown L, Kroon PA, Das DK, Das S, Tosaki A, Chan V, et al. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2009 Sep;33(9):1513-23. PubMed PMID: 19519720. Pubmed Central PMCID: 2782726.
40. Pirola L, Frojdo S. Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB life*. 2008 May;60(5):323-32. PubMed PMID: 18421779.
41. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Molecular nutrition & food research*. 2009 Jan;53(1):115-28. PubMed PMID: 19072742.
42. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006 Nov 16;444(7117):337-42. PubMed PMID: 17086191.
43. Rivera L, Moron R, Zarzuelo A, Galisteo M. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochemical pharmacology*. 2009 Mar 15;77(6):1053-63. PubMed PMID: 19100718.
44. Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellierino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Current*

biology : CB. 2006 Feb 7;16(3):296-300. PubMed PMID: 16461283.

45. Pedersen SB, Olholm J, Paulsen SK, Bennetzen MF, Richelsen B. Low Sirt1 expression, which is upregulated by fasting, in human adipose tissue from obese women. *International journal of obesity*. 2008 Aug;32(8):1250-5. PubMed PMID: 18560370.
46. Breen DM, Sanli T, Giacca A, Tsiani E. Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008 Sep 12;374(1):117-22. PubMed PMID: 18601907.
47. Bai L, Pang WJ, Yang YJ, Yang GS. Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Molecular and cellular biochemistry*. 2008 Jan;307(1-2):129-40. PubMed PMID: 17851734.
48. Backesjo CM, Li Y, Lindgren U, Haldosen LA. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2006 Jul;21(7):993-1002. PubMed PMID: 16813520.
49. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*. 2004 Aug 5;430(7000):686-9. PubMed PMID: 15254550.
50. Zou S, Carey JR, Liedo P, Ingram DK, Muller HG, Wang JL, et al. The longevity effect of resveratrol depends on dietary composition and calorie intake in a tephritid fruit fly. *Experimental gerontology*. 2009 Jun-Jul;44(6-7):472-6. PubMed PMID: 19264118. Pubmed Central PMCID: 3044489.
51. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006 Nov 16;444(7117):337-42. PubMed PMID: 17086191.
52. Barger JL, Kayo T, Vann JM, Arias EB, Wang J, Hacker TA, et al. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. *PloS one*. 2008;3(6):e2264. PubMed PMID: 18523577. Pubmed Central PMCID: 2386967.
53. Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet*. 1999 Feb 20;353(9153):611-6. PubMed PMID: 10030325.
54. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*. 1998 Apr 14;97(14):1411-20. PubMed PMID: 9577953.
55. Kittleson, M.D. Terapia da insuficiência cardíaca. In: Ettinger, S. J.; Feldman, E. C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária. Doenças do cão e do gato*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 754-779.
56. Weber KT, Villarreal D. Aldosterone and antialdosterone therapy in congestive heart failure. *The American journal of cardiology*. 1993 Jan 21;71(3):3A-11A. PubMed PMID: 8422002.

57. Cavanagh EM, Inserra F, Ferder L, Fraga CG. Enalapril and captopril enhance glutathione-dependent antioxidant defenses in mouse tissues. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2000 Mar;278(3):R572-7. PubMed PMID: 10712274.
58. Torlone E, Rambotti AM, Perriello G, Botta G, Santeusanio F, Brunetti P, et al. ACE-inhibition increases hepatic and extrahepatic sensitivity to insulin in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and arterial hypertension. *Diabetologia*. 1991 Feb;34(2):119-25. PubMed PMID: 2065846.
59. Lonn, E.; Weitz, J.; Dzavik, V.; Crowther, M.; Pogue, J.; Bosch, J.; Yusuf, S. Effects of Ramipril and Vitamin E on hematological markers of fibrinolysis, coagulation and endothelial function Results of the MORE-HOPE study. *Canadian Journal Of Cardiology*. 2000, v. 16 (supl. F), p. 233F.
60. Jackson, E.K., Garrison, J.C. Renin and angiotensin. In: Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ninth ed. McGraw-Hill, New York. 2003.
61. Wang P, Liang Y, Chen B, Zhou N, Yi L, Yu Y, Yi Z. Simultaneous Determination of Enalapril and Enalaprilat in Human Plasma by LC-MS: Application to a Bioequivalence Study. *Chromatographia*, v. 65, p. 209-215, 2007
62. Sakamoto K, Sugimoto K, Sudoh T, Fujimura A. Different effects of imidapril and enalapril on aminopeptidase P activity in the mouse trachea. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2005 Mar;28(3):243-7. PubMed PMID: 16097368.
63. Ramalho Fernando S., Ramalho Leandra N. Z., Zucoloto Sérgio, Castro-e-Silva Jr Orlando, Corrêa Fernando M. A.. Efeito de agentes anti-hipertensivos sobre as células estreladas durante a regeneração hepática em ratos. *Acta Cir. Bras.*. 2000;15( Supl 2 ): 18-20.
64. Lazebnik LB, Mikheeva OM, Drozdov VN, Petrakov AV, Sil'vestrova S. [Pharmacokinetics of enalapril and metoprolol in hypertensive patients with hepatic pathology]. *Terapevticheskii arkhiv*. 2007;79(9):18-25. PubMed PMID: 18038581.
65. Macfadyen, R. J, Meredith P. A, Elliot H. L. Enalapril Clinical Pharmacokinetics and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships An Overview. *Clinical Pharmacokinetics*; 25 (4): 274-282, 1993.



## ANEXO

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação e Bem Estar Animal.



FACULDADES INTEGRADAS PITÁGORAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL – CEUA/FIPMOC

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

Montes Claros, 04 de dezembro de 2013.

**Título do Projeto de Pesquisa ou Título do Protocolo de Aula Prática:**

Avaliação da expressão de componentes do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) e dos efeitos metabólicos do resveratrol e enalapril em camundongos tratados com dieta hiperlipídica e dieta hiperglicídica.

**Pesquisador ou Professor Responsável:**

Thaís de Almeida Pinheiro

**Processo Número:** 1/2013

**1. RESUMO DO PROJETO E OBJETIVOS**

Trata-se de um estudo que associa o uso do resveratrol e inibidor de ECA (enalapril) no tratamento da síndrome metabólica em camundongos tratados com diferentes dietas, abrindo uma perspectiva de desenvolvimento de novas propostas terapêuticas para o tratamento da obesidade e síndrome metabólica. Neste sentido, os objetivos são: (GERAL) Avaliar os efeitos metabólicos do tratamento oral com enalapril e resveratrol e a expressão de componentes do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) em camundongos tratados com dieta hiperlipídica e dieta hiperglicídica. (ESPECÍFICOS) Avaliar o peso corporal, ingestão alimentar e adiposidade corporal entre os grupos em estudo. Avaliar os efeitos do tratamento oral com resveratrol e enalapril no perfil lipídico por meio da mensuração dos níveis plasmáticos de colesterol total, HDL e triglicérides. Avaliar os efeitos do tratamento oral com resveratrol e enalapril na regulação glicêmica com aplicação de testes de sensibilidade insulínica e tolerância à glicose e glicemia de jejum. Avaliar a

1



tratamento com resveratrol e enalapril nos grupos tratados com dieta hiperlipídica e dieta hiperglicídica.

## 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O estudo em questão se justifica pela perspectiva de desenvolvimento de novas propostas terapêuticas para o tratamento da obesidade e síndrome metabólica.

## 3. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TERMOS DE APRESENTAÇÃO OBRIGATÓRIOS EM PESQUISA ANIMAL

Os termos de apresentação obrigatórios em pesquisa animal foram apresentados de acordo com as normas exigidas pela CEUA-FIPMOC e com as Resoluções pertinentes do Conselho Nacional de Experimentação Animal - CONCEA.

## 4. CONCLUSÕES OU PENDÊNCIAS E LISTA DE INADEQUAÇÕES

Sem inadequações ou pendências.

## 5. SITUAÇÃO DO PARECER

Aprovado.

Thales de Almeida Pinheiro  
Coordenador da CEUA-FIPMOC