



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

D'Angelo Carlo Magliano

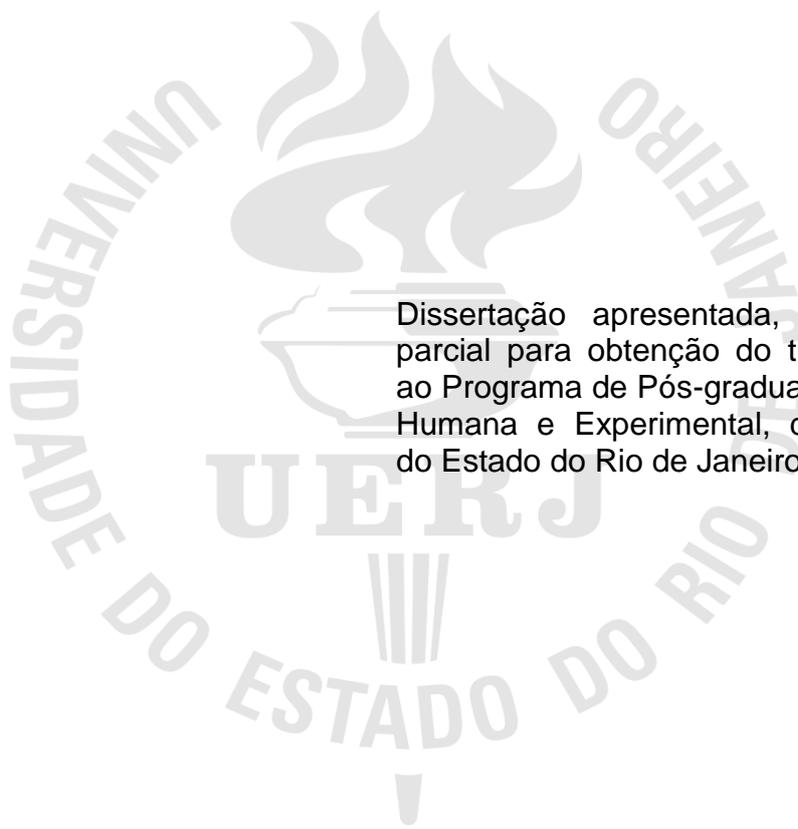
Agonista PAN-PPAR (receptores ativadores de proliferação peroxissomal) e alterações hepáticas na prole adulta de camundongos de mães obesas

Rio de Janeiro

2012

D'Angelo Carlo Magliano

**Agonista PAN-PPAR (receptores ativadores de proliferação peroxissomal) e alterações hepáticas na prole adulta de camundongos de mães obesas**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Vanessa Souza-Mello

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M195 Magliano, D'Angelo Carlo.  
Agonista PAN-PPAR (receptores ativadores de proliferação peroxissomal) e alterações hepáticas na prole adulta de camundongos de mães obesas / D'Angelo Carlo Magliano. – 2012.  
81 f.

Orientadora: Vanessa Souza Mello.  
Coorientador: Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Obesidade - Teses. 2. Fígado Gorduroso - Teses. 3. Bezafibrato. 4. Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo. 5. Proliferadores de Peroxissomos I. Mello, Vanessa Souza. II. Mandarin-de-Lacerda, Carlos Alberto. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 357.359.2

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

D'Angelo Carlo Magliano

**Agonista PAN-PPAR (receptores ativadores de proliferação peroxissomal) e alterações hepáticas na prole adulta de camundongos de mães obesas**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de julho de 2012.

Coorientador:

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Vanessa Souza-Mello (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiane da Silva Faria  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Monique Bandeira Moss  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2012

## DEDICATÓRIA

À minha mãe,  
por representar a luta, força e coragem que me fizeram chegar aqui.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

*George Bernard Shaw*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha mãe, Lucilene, por sempre estar ao meu lado na caminhada da minha vida. Obrigado por apoiar minhas decisões e confiar no meu potencial. Tudo o que faço devo ao amor, carinho e dedicação que você me dá. E é para você mais esta conquista.

Ao meu irmão, Carlos, por acreditar e confiar nos passos que dou dentro da minha carreira profissional. Agora, mais do que nunca, me sinto preparado para mais discussões nutricionais.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Vanessa Souza-Mello, por ter me acolhido e confiado este projeto de pesquisa. É com imenso orgulho que porto o cargo do seu “primeiro orientado”. Você é o exemplo no qual hoje me espelho quando penso como um professor deve ser. E é com muitíssimo orgulho que hoje entro na sala da Professora Vanessa para conversar sobre meu Doutorado. Obrigado por me fazer amar cada vez mais o meu trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, por ter aberto as portas do LMMC quando aqui cheguei em busca de uma orientação para o Mestrado. Seu modo de desafiar, muitas vezes, me fez pensar em inúmeras respostas para este trabalho. Obrigado pelo acolhimento na família LMMC.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Bianca Martins Gregório por estar retirando, pouco a pouco, o meu trauma pela Anatomia. Obrigado pelas dicas com a programação metabólica e por se preocupar comigo. Quando te chamo de “dinda” não é à toa!

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Márcia Barbosa Águila, por seus questionamentos nutricionais que ampliaram minha visão dentro da pesquisa em Nutrição Experimental, área pela qual me apaixonei.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiane Faria pelas dicas com o Bezafibrato e os momentos de descontração fora do laboratório! Rumo ao SLAN em Cuba!

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristiane Ramos por desmistificar o Western-Blotting. Prometo que por um bom tempo não vou ocupar mais o banheiro para fazer revelações deste procedimento!

À minha turma de Mestrado apelidada de “Era Luz”. À Fernanda Ornellas, pelas risadas mais espontâneas, pela implicância mais amorosa e pelos desabafos científicos. À Diana Moraes, meu exemplo de superação, pelas conversas que misturavam cafeína, fisioterapia e música, muita música! Seremos a melhor dupla que já passou pelo WB! À Débora Silva, que infelizmente teve de trancar o Mestrado por contratempos, mas que foi o meu primeiro apoio dentro do laboratório. Sua saída deixou uma grande lacuna na “Era Luz” e me deixou com imensas saudades dos nossos planos. E por fim, e especialmente, à Thereza Bargut, a grande amiga que tenho dentro e fora do laboratório e coautora deste trabalho. Nossas brigas, segredos compartilhados e ambições estarão sempre comigo. Você é a personificação de que “por trás de um grande homem, sempre existe uma grande mulher”. Obrigado por tudo, meninas!

À Eliete Dalla Corte Frantz, Jéssica Teixeira e Isabele Bringhenti pelo carinho e atenção. Obrigado por sanar as milhões de dúvidas, Eli! Jéssica, obrigado pelos toques na microscopia eletrônica e no WB! E, Bele, obrigado por ter se tornado a melhor diversão do laboratório!

Aos técnicos William Lannes, Thatiany Marinho e Aline Penna. Sem os puxões de orelhas, zelo e cuidado que vocês têm com o LMMC, este trabalho (e nenhum outro) sairia da ideia de projeto. Espero que no Doutorado eu erre menos!

Aos recém-chegados, porém não menos importantes, Helder Gonçalves, Fernanda Cavalcante, Flávia Gombar e Verônica. O LMMC estava sedento por mais Biomédicos como nós! Obrigado pelas descontrações de fim de tarde! Sem vocês o LMMC não é mais o mesmo.

Aos demais integrantes do LMMC, Flávia de Lima, Liliane, André, Francielle Graus, Alini Shultz, Sandra, Jorginho, Paulinha, Victor e Durval que de alguma forma colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho!

À minha amiga-irmã Angélica Furriel por acompanhar, agora do outro lado, os passinhos do “irmão mais velho”.

Aos demais amigos que estiveram de perto (ou de longe) comigo, Luciana, Carol, Bruna, Jéssica, Mariana, Ana Volpato, Leonardo, Conrado, Renan e Daniel que ouviram desabafos! Divido com vocês mais esta conquista!

## RESUMO

MAGLIANO, D'Angelo Carlo. Agonista PAN-PPAR (receptores ativadores de proliferação peroxissomal) e alterações hepáticas na prole adulta de camundongos de mães obesas. 2012. 81 f. (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O objetivo do presente estudo foi avaliar se o Bezafibrato, um agonista PAN-PPAR, é capaz de aliviar a doença não alcoólica do fígado gorduroso (NAFLD) na prole de machos de mães C57BL/6 obesas. Fêmeas virgens foram alimentadas com uma dieta HL (hiperlipídica, 49% de lipídios) ou uma dieta C (controle, 10% de lipídios) por oito semanas antes do acasalamento e durante os períodos de gestação e lactação. A prole de machos foi subdividida em quatro grupos: C (dieta controle para as mães e filhotes); C/BZ (dieta controle para as mães e filhotes com tratamento com Bezafibrato[100mg/Kg]); HL (dieta HL para as mães e dieta controle para os filhotes); e HL/BZ (dieta HL para as mães e dieta controle para os filhotes com tratamento com Bezafibrato [100mg/Kg]). O tratamento com Bezafibrato começou na 12<sup>a</sup> semana e se manteve por três semanas. Análise do metabolismo, bioquímica, estereológica e por western-blotting foram realizadas. A dieta HL causou um fenótipo de sobrepeso nas mães e acarretou em uma intolerância oral à glicose com aumento da glicemia de jejum. A prole HL apresentou hiperfagia, ganho de massa corporal, altos níveis de triglicérideo hepático e plasmático, esteatose hepática e aumento da expressão de proteínas lipogênicas concomitante com diminuição do receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa (PPAR $\alpha$ ), que é responsável pela  $\beta$ -oxidação e aumento do receptor ativador de proliferação peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) e do elemento regulador de esteroide ligante da proteína 1 (SREBP-1c) proteínas envolvidas na lipogênese hepática. Por outro lado, o tratamento com o Bezafibrato reverteu o quadro da programação metabólica no fígado, com uma melhora dos parâmetros morfológicos, bioquímicos e moleculares do fígado dos animais, com um aumento da ativação de PPAR $\alpha$  em associação a uma diminuição do PPAR $\gamma$  e não alterando a expressão de SREBP-1c. Em conclusão, nós demonstramos que o tratamento com Bezafibrato melhora a NAFLD causada pela obesidade materna.

Palavras-chave: Obesidade materna. Programação metabólica. Bezafibrato. Doença não alcoólica do fígado gorduroso. Ativador de proliferação peroxissomal alfa e ativador de proliferação peroxissomal gama.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate whether Bezafibrate, a PPAR agonist, could attenuate non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) of male offspring from obese C57BL/6 dams. Dams were fed on a HF (high-fat, 49% lipids) diet or SC (standard chow; 10% lipids) diet for 8 weeks before mating and during gestation and lactation periods. Male offspring were subdivided into 4 groups: SC (standard-chow for dams and offspring); SC/BZ [standard-chow for dams and offspring with treatment with BZ (100mg/Kg)]; HF (high-fat diet for dams and standard-chow for offspring); HF/BZ [high-fat diet for dams and standard-chow for offspring with treatment with Bezafibrate (100mg/Kg)]. Treatment with Bezafibrate started at 12<sup>th</sup> week and was maintained for 3 weeks. Metabolic measurements, biochemical analysis, stereological tools and western-blotting were performed. The HF diet yielded an overweight phenotype and an increase in oral glucose tolerance and fasting glucose of dams. The HF offspring presented hyperphagia, body mass gain, high levels of plasmatic and hepatic triglycerides, impairment of glucose metabolism, hepatic steatosis and high expression of lipogenic proteins concomitant to decreased expression of PPAR $\alpha$ , which is responsible for  $\beta$ -oxidation. On the other hand, treatment with Bezafibrate reverted hepatic outcomes of metabolic programming, with an improvement of morphological, biochemical and molecular parameters of animals' livers, with an increase of PPAR $\alpha$  activation in association with a decrease of PPAR $\gamma$  expression and no changes in SREBP-1c expression. In conclusion, we demonstrated that treatment with Bezafibrate improved NAFLD caused by maternal obesity.

Keywords: Maternal obesity. Metabolic programming. Bezafibrate. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Obesidade materna e programação metabólica.....	24
Figura 2 –	Mecanismos moleculares da esteatose hepática.....	26
Figura 3 –	Resistência à insulina e influência do tecido adiposo no desenvolvimento da NAFLD.....	28
Figura 4 –	Esquema de ativação dos PPARs.....	29
Figura 5 –	PPARs e obesidade.....	33
Figura 6 –	Desenho experimental.....	38
Tabela 1 –	Composição das dietas experimentais.....	39
Figura 7 –	Ingestão alimentar das progenitoras.....	44
Figura 8 –	Ingestão energética das progenitoras.....	44
Figura 9 –	Ganho ponderal das progenitoras durante as oito semanas pré-acasalamento.....	45
Figura 10 –	Área sob a curva (ASC) do teste oral de tolerância à glicose realizado uma semana antes do acasalamento.....	45
Figura 11 –	Glicemia de jejum das progenitoras uma semana antes do acasalamento.....	46
Figura 12 –	Ingestão alimentar da prole de machos duas semanas antes do sacrifício.....	47
Figura 13 –	Evolução da massa corporal durante o período de tratamento com Bezafibrato dos quatro grupos experimentais estudados.....	48
Figura 14 –	Triglicerídeo plasmático dos quatro grupos experimentais estudados.....	50

Figura 15 -	Glicemia de jejum dos quatro grupos experimentais estudados.....	50
Figura 16 -	Área sob a curva (ASC) do teste oral de tolerância à glicose realizado ao fim do experimento.....	51
Figura 17 -	Massa do fígado corrigida pelo comprimento da tíbia esquerda.....	51
Figura 18 -	Triglicérideo hepático dos quatro grupos experimentais estudados.....	52
Figura 19 -	Percentual de esteatose encontrado nos quatro grupos experimentais..	53
Figura 20 -	Fotomicrografias do fígado dos quatro grupos experimentais.....	54
Figura 21 -	Perfis de binucleação encontrados nos quatro grupos experimentais.....	55
Figura 22 -	Expressão de SREBP-1c nos quatro grupos experimentais estudados..	56
Figura 23 -	Expressão de PPAR-alfa nos quatro grupos experimentais estudados..	57
Figura 24 -	Expressão de PPAR-gama nos quatro grupos experimentais estudados.....	57
Figura 25 -	Expressão de GLUT-2 nos quatro grupos experimentais estudados.....	58
Figura 26 -	Razão entre PPAR-alfa/SREBP-1c dos quatro grupos experimentais....	58
Figura 27 -	Razão entre PPAR-alfa/PPAR-gama dos quatro grupos experimentais.	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL -	Ácidos Graxos Livres
ApoB -	Apolipoproteína B
ASC -	Área Sob a Curva
C -	Prole Controle
C/BZ –	Prole Controle com tratamento com Bezafibrato
ChREBP -	Elemento de resposta ao carboidrato ligante de proteína
CPT-1 -	Carnitina palmitoitransferase 1
DM2 -	Diabetes Mellitus tipo 2
EROS -	Espécies reativas de oxigênio
GLUT2 -	Transportador de glicose 2
HDL -	Lipoproteína de alta densidade
HL -	Prole Hiperlipídica
HL/BZ -	Prole Hiperlipídica com tratamento com Bezafibrato
LDL -	Lipoproteína de baixa densidade
MTP -	Proteína trifuncional mitocondrial
NF-κB -	Fator nuclear κB
NAFLD -	Doença não-alcoólica do fígado gorduroso
NASH -	Esteatohepatite não alcoólica
PPAR-alfa	Receptor ativador de proliferação peroxissomal alfa
PPAR- beta/delta	Receptor ativador de proliferação peroxissomal beta/delta
PPAR- gama	Receptor ativador de proliferação peroxissomal gama

PPRE -	Elemento responsivo ao PPAR
Qa -	Perfil de binucleação
RXR -	Receptor X retinoide
SREBP-1c	Elemento regulador de esteroide ligante da proteína 1
sTG -	Síntese de Triglicerídeos
SM -	Síndrome Metabólica
TNF-alfa -	Fator de necrose tumoral-alfa
TOTG –	Teste oral de tolerância à glicose
TZD -	Tiazolidinadiona
VLDL -	Lipoproteína de densidade muito baixa
Vv –	Densidade de volume

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
1.1	<b>Gerais</b> .....	20
1.2	<b>Específicos</b> .....	20
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
2.1	<b>Obesidade materna e programação metabólica</b> .....	21
2.2	<b>Doença não-alcoólica do fígado gorduroso (NAFLD)</b> .....	24
2.3	<b>Receptores ativadores de proliferação peroxissomal e Bezafibrato</b> .....	29
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1	<b>Animais e Dieta</b> .....	36
3.2	<b>Massa Corporal e Ingestão Alimentar</b> .....	37
3.3	<b>Teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e Glicemia de jejum</b> .....	39
3.4	<b>Sacrifício</b> .....	40
3.5	<b>Análise Bioquímica</b> .....	40
3.6	<b>Estereologia do Fígado</b> .....	41
3.7	<b>Western-Blotting</b> .....	42
3.8	<b>Análise Estatística</b> .....	43
4	<b>RESULTADOS</b> .....	44
4.1	<b>Dados Maternos</b> .....	44
4.1.1	<u>Ingestão alimentar, ingestão energética e ganho ponderal</u> .....	44
4.1.2	<u>TOTG e glicemia de jejum</u> .....	45
4.2	<b>Dados da prole (período de tratamento)</b> .....	46
4.2.1	<u>Ingestão alimentar e evolução da massa corporal</u> .....	46
4.2.2	<u>Triglicerídeo plasmático, glicose em jejum e TOTG</u> .....	48
4.2.3	<u>Estrutura e bioquímica do fígado</u> .....	49
4.2.4	<u>Western-Blotting</u> .....	53
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	60
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	68
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
	<b>ANEXO - Comitê de Ética</b> .....	80