



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Nayara Peixoto Silva

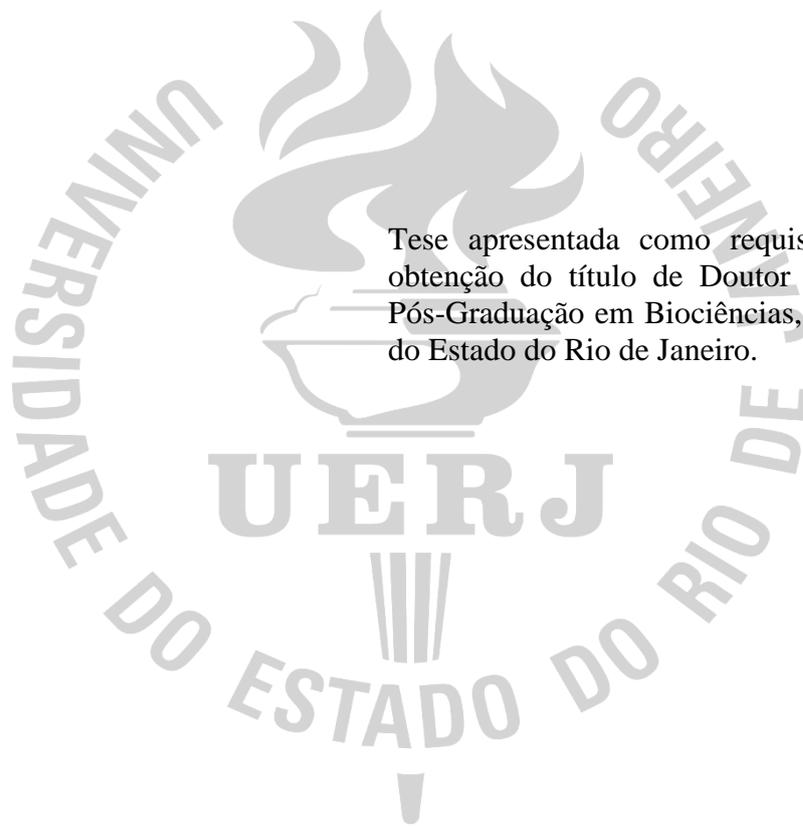
Bromocriptina na lactação atenua os efeitos deletérios do desmame precoce

Rio de Janeiro

2015

Nayara Peixoto Silva

Bromocriptina na lactação atenua os efeitos deletérios do desmame precoce



Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Cristina Lisboa
Coorientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Rio de Janeiro

2015

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

S586 Silva, Nayara Peixoto.
Bromocriptina na lactação atenua os efeitos deletérios do desmame precoce / Nayara Peixoto Silva.– 2015.
115 f.

Orientadora: Patrícia Cristina Lisboa.
Coorientador: Egberto Gaspar de Moura.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Bromocriptina - Teses. 2. Lactação - Teses. 3. Obesidade - Teses. 4. Estresse oxidativo- Teses. 5. Desmame. I. Lisboa, Patrícia Cristina. II. Moura, Egberto Gaspar de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 612.433.664

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

Assinatura

Data

Nayara Peixoto Silva

Bromocriptina na lactação atenua os efeitos deletérios do desmame precoce

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor ao Programa de
Pós-graduação em Biociências.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2015.

Coorientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Patrícia Cristina Lisboa (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dra. Ângela de Castro Resende

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. João Antônio Pegas Henriques

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rodrigo Soares Fortunato

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Elaine de Oliveira

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Luciano e ao meu bebezinho Arthur. Vocês completam a minha vida e a tornam indescritivelmente maravilhosa.

AGRADECIMENTOS

A Deus por se fazer presente todos os dias da minha vida. "A Ti entrego meu caminho, confio, e o mais ... o Senhor sempre fará".

A minha mãe Vania *in memoriam*. Tornara-se o meu exemplo de dedicação e perseverança. Apesar de separadas, continuo a trilhar os nossos sonhos e diante de mais uma etapa que se concretiza, agradeço-lhe por tudo que fizeste por mim. Hoje mais do que nunca sinto a sua falta.

A minha família, em especial meu pai e meu irmão, e amigos por todo o incentivo, carinho e compreensão.

Ao meu esposo Luciano que com amor, paciência e compreensão esteve sempre do meu lado. Sinto-me extremamente feliz por poder compartilhar mais uma conquista com você e mais uma vez poder lhe agradecer por fazer parte desta minha vitória de uma maneira única e especial.

Aos professores do laboratório. A minha orientadora Professora Patrícia Lisboa, ao meu co-orientador Professor Egberto G. de Moura e minha revisora Elaine de Oliveira. Agradeço-lhes pela oportunidade que me foi dada, por acreditarem no meu trabalho e me proporcionarem constante motivação.

Ao Professor Claudio Filgueiras pelos conselhos estatísticos e ajuda com o software SPSS.

A doutoranda Ellen pela colaboração nos ensaios do estresse oxidativo.

As amigas Aninha, Natália, Liginha, Fernanda, Vivi, Mabel, Jéssica, Cintinha e Janaine. Pela amizade, alegria e companheirismo, capazes de deixar o dia-a-dia muito mais prazeroso. Obrigada por toda a ajuda (principalmente na etapa final). De 10 em 10 reais, chego ao final deste trabalho com grande saldo devedor.

Aos alunos de iniciação científica pela valiosa participação na execução deste trabalho.

Aos funcionários e técnicos Fabi, Ulisses, Milton e Andreia, pela colaboração.

À Coordenação de Pós-Graduação em Biociências e agencias de fomento que possibilitaram a realização deste estudo.

Os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste estudo.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

RESUMO

SILVA, Nayara Peixoto. *Bromocriptina na lactação atenua os efeitos deletérios do desmame precoce*. 2015. 115f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Como o desmame precoce (DP) não-farmacológico programa para a obesidade, microesteatose hepática e estresse oxidativo, e o DP farmacológico (com bromocriptina) também causa obesidade, objetivamos: (1) verificar o *status* redox e função hepática no DP farmacológico. Sendo a bromocriptina um interferente na homeostase glicêmica, hipotetizamos sua ação na programação do DP não-farmacológico e objetivamos: (2) avaliar sua interferência na programação através da sua aplicação nas proles de DP não-farmacológico; (3) avaliar os efeitos a longo prazo deste tratamento neonatal em diferentes dietas. Experimento 1: ratas lactantes foram divididas em 2 grupos: DP (**BROMO**): mães tratadas via i.p. com 1mg/dia de bromocriptina nos 3 últimos dias de lactação; Controle (**C**): mães tratadas com solução veículo. As proles foram avaliadas aos 90 e 180 dias de vida (P90 e P180) com teste *t-Student* ($P < 0,05$). Experimento 2: ratas lactantes foram divididas em 2 grupos: DP não-farmacológico (**DP**): mães com bandagem adesiva no corpo, impedindo o aleitamento, nos últimos 3 dias de lactação; Controle (**C**): filhotes mamando livremente. Estas proles foram subdivididas de acordo com o tratamento. (**DP/BRO** e **C/BRO**): proles recebendo bromocriptina via i.p. (4mg/kg/dia) nos últimos 3 dias de lactação; (**DP** e **C**): proles recebendo solução veículo. Os grupos foram analisados em P120. Em P130 estas proles foram subdivididas de acordo com a dieta, compondo 8 grupos experimentais (**C**; **C/BRO**; **DP** e **DP/BRO** - ração padrão e **C-HF**; **C/BRO-HF**; **DP-HF** e **DP/BRO-HF** - ração hiperlipídica - 45% Kcal de lipídeos) sendo acompanhados até P200 e analisados através de two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, one-way ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls e teste *t-Student* ($P < 0,05$). No experimento 1: o DP promoveu maior adiposidade visceral e dislipidemia. Em P90, animais BROMO apresentaram intolerância a glicose, normoinsulinemia, superexpressão hepática de sirtuína-1 (SIRT-1), aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) no plasma e fígado e da glutatona peroxidase (GPx) hepática levando a uma redução hepática de malondialdeído (MDA). Já em P180 constatamos resistência insulínica, maior atividade de GPx plasmática e SOD e catalase no fígado promovendo redução de MDA em ambos os tecidos e prevenindo a esteatose hepática no grupo BROMO, apesar do declínio de SIRT-1. Experimento 2: a bromocriptina intensifica a perda de peso ao desmame. Em P120 observamos uma intolerância a glicose no C/BRO e uma hipertrofia de adipócitos no DP. Já em P200 o DP apresenta maior adiposidade, hiperleptinemia, hipertrofia de adipócitos e aumento de triglicérido hepático, condições estas, prevenidas pela bromocriptina somente quando associada ao consumo de dieta padrão. Sendo assim, confirmamos os efeitos deletérios do DP e verificamos o potencial terapêutico da bromocriptina, prevenindo o ganho de peso corporal, a adiposidade e a leptinemia colaborando com a prevenção do tecido hepático, desde que associado a um padrão dietético adequado.

Palavras-chave: Desmame precoce. Obesidade. Estresse oxidativo. Fígado. Bromocriptina.

ABSTRACT

SILVA, Nayara Peixoto. *Bromocriptine at lactation attenuates the deleterious effects of early weaning*. 2015. 115f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

As non-pharmacological early weaning (EW) programs to obesity, liver microsteatosis and oxidative stress in adulthood, and the pharmacological EW (with bromocriptine), also cause obesity we aim to: (1) verify the redox status and hepatic function in the pharmacological EW. As bromocriptine has effects on glucose homeostasis, we hypothesized that it could interfere with the programming of non-pharmacological EW and to test it we aimed: (2) to evaluate the interference of this drug in programming through its application in the offspring non-pharmacological EW; (3) to evaluate the long-term effects of treatment of a hyperlipidic diet. Experiment 1: lactating rats were divided into 2 groups: EW (**BROMO**) in which the mothers were treated i.p. with 1 mg/day of bromocriptine in the last 3 days of lactation; Control (**C**) whose mothers received similar treatment with vehicle solution. The offspring were evaluated at 90 and 180 days old (P90 and P180). The differences were analyzed through *Student's t-test* ($P < 0.05$). Experiment 2: lactating rats were divided into 2 groups: non-pharmacological EW (**EW**) whose mothers received an adhesive bandage around the body to prevent access of pups to milk the last 3 days of lactation; Control (**C**) whose pups suckled freely. Thus the offspring of both groups were subdivided according to treatment: offspring that received bromocriptine (i.p. 4 mg/kg/day) on the last 3 days of lactation (**EW/BRO** and **C/BRO**); offspring receiving vehicle solution (**EW** and **C**). The groups were analyzed at P120. At P130 the offspring were subdivided according to the diet, constituting 8 experimental groups (**C**; **C/BRO**, **EW** and **EW/BRO** - standard chow and **C-HF**; **C/BRO-HF**, **EW-HF** and **EW/BRO-HF** - high-fat diet - 45% Kcal from lipid). The animals were followed until P200 and analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni post-test, one-way ANOVA with Newman-Keuls post-test and *Student's t-test* ($P < 0.05$). Experiment 1: we verified that the EW promoted greater visceral adiposity and dyslipidemia. At P90, **BROMO** offspring showed glucose intolerance, normoinsulinemia, overexpression of sirtuin-1 (SIRT-1) in the liver, increased activity of superoxide dismutase (SOD) in plasma and liver and liver glutathione peroxidase (GPx) leading to a reduced malondialdehyde (MDA) in the liver. At P180 we observed an insulin resistance, higher GPx activity in the plasma and SOD and catalase in the liver, promoting therefore, a reduction of MDA in both tissues and preventing the onset of hepatic steatosis in the **BROMO** offspring, despite the decline of SIRT-1 expression. Experiment 2: The bromocriptine enhances weight loss at the end of lactation. At P120 only observed a glucose intolerance in **C/BRO** and adipocyte hypertrophy in the EW. At P200 evidenced in the EW group, greater adiposity, hyperleptinaemia, adipocyte hypertrophy, and increased hepatic triglyceride. These changes were prevented with bromocriptine when associated with standard chow. We confirm the deleterious effects of EW and verify the therapeutic potential of bromocriptine, preventing the weight gain, adiposity and hyperleptinemia, contributing therefore, with the prevention of damage to liver tissue, when associated with an adequate dietary pattern.

Keywords: Early weaning. Obesity. Oxidative stress. Liver. Bromocriptine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Metabolismo hepático de lipídeos	26
Figura 2 –	Alterações nos tecidos-alvos da insulina em quadros de obesidade e suas consequências sistêmicas	27
Figura 3 –	Resistência insulínica como uma condição causal da doença não alcoólica do fígado gorduroso	28
Figura 4 –	Estresse oxidativo como fator causal da resistência insulínica	29
Figura 5 –	Representação esquemática do desenho experimental	33
Figura 6 –	Parâmetros biométricos	43
Figura 7 –	Quantificação da MGV em P90 e P180	43
Figura 8 –	Morfometria do tecido adiposo visceral	44
Figura 9 –	Avaliação da curva glicêmica pelo TOTG em P90 e P180	47
Figura 10 –	Histologia hepática em P90 e P180	49
Figura 11 –	Status redox no plasma e tecido hepático em P90 e P180	51
Figura 12 –	Quantificação proteica no tecido hepático por western blotting	52
Figura 13 –	Expressão hepática (RNAm) de SIRT-1 por RT-PCR em P90 e P180	53
Figura 14 –	Representação esquemática do experimento 1 e 2	62
Figura 15 –	Dados biométricos e glicemia no período neonatal	70
Figura 16 –	Biometria e adiposidade em P120	71
Figura 17 –	Morfometria do tecido adiposo visceral (gordura retroperitoneal) em P120	72
Figura 18 –	Leptinemia	73
Figura 19 –	Perfil glicêmico em P120	74
Figura 20 –	Avaliação do teste oral de tolerância a glicose – TOTG em P120	75
Figura 21 –	Avaliações hepáticas em P120	76
Figura 22 –	Massa corporal de P120 até P200 - Experimento 1	77
Figura 23 –	Massa corporal P200 - Experimento 1 e 2	79
Figura 24 –	Composição corporal P200 - Experimento 1 e 2	81
Figura 25 –	MGV em P200 - Experimento 1 e 2	83
Figura 26 –	Morfometria do tecido adiposo visceral (gordura retroperitoneal) em P200 - Experimento 1 e 2	85
Figura 27 –	Fotomicrografias do tecido adiposo visceral (gordura retroperitoneal) em P200 - Experimento 1 e 2	86

Figura 28 – Leptinemia em P200 - Experimento 1 e 2	88
Figura 29 – Perfil glicêmico em P200 - Experimento 1 e 2	89
Figura 30 – Avaliação da insulinemia e índice de resistência insulínica em P200 - Experimento 1 e 2	90
Figura 31 – Avaliação bioquímica de triglicerídeo e colesterol hepático em P200 - Experimento 1 e 2	91
Figura 32 – Quantificação proteica por western blotting das enzimas do sistema antioxidante presentes no tecido hepático em P200 - Experimento 1 e 2	92
Figura 33 – Quantificação proteica por western blotting dos marcadores de estresse oxidativo em P200 - Experimento 1 e 2	94
Figura 34 – Teste de comportamento alimentar em P120	96
Figura 35 – Teste de comportamento alimentar em P180	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Efeitos da programação por desmame precoce pelo uso de bromocriptina materna (2 mg por dia), em ratos machos aos 180 dias de vida	23
Tabela 2 –	Anticorpos utilizados na técnica de western blotting	39
Tabela 3 –	Sequência dos primers utilizados na técnica de PCR em tempo real	41
Tabela 4 –	Perfil metabólico em P90 e P180	46
Tabela 5 –	Avaliações teciduais e plasmáticas referentes as alterações hepáticas	48
Tabela 6 –	Descrição nutricional das dietas experimentais	63

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE	Aldeído 4-hidroxinonenal
AHRQ	<i>Agency for Healthcare Research and Quality</i>
ALT	Enzima alanina aminotransferase
ARQ	Núcleo arqueado hipotalâmico
AST	Enzima aspartato aminotransferas
CART	Fator de transcrição celular regulado por cocaína e anfetamina
CAT	Enzima catalase
CNA	Comprimento naso-anal
CPT-1	Enzima carnitina palmitoiltransferase - 1
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DP	Desmame precoce
EO	Estresse oxidativo
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPx	Enzima glutathiona peroxidase
HE	Coloração histológica de hematoxilina e eosina
HF	Dieta hiperlipídica
HMG-CoA	Hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA
MC	Massa corporal
MDA	Malondialdeído
MGV	Massa de gordura visceral
NADPH	Forma reduzida da coenzima fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADP)
NAFLD	Doença não alcoólica do fígado gorduroso
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial de Saúde
P21	21 dias de vida pós-natal
P90	90 dias de vida pós-natal
P120	120 dias de vida pós-natal
P180	180 dias de vida pós-natal

P200	200 dias de vida pós-natal
PVN	Núcleo paraventricular hipotalâmico
RI	Resistência insulínica
SIRT-1	Sirtuína-1
SOD	Enzima superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio estimulante da tireóide ou tireotrofina

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1	Aleitamento materno	18
1.2	Programação / Plasticidade ontogenética	20
1.3	Programação pelo desmame precoce – Modelos experimentais	21
1.4	Bromocriptina	24
1.5	Mecanismo de resistência insulínica (RI) e atuação do <i>status</i> redox no tecido hepático	25
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	31
2.1	Relevância do estudo e objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Protocolo experimental	32
3.2	Desenho experimental	32
3.3	Biometria e controle da ingestão alimentar	33
3.4	Avaliação de curva glicêmica - teste oral de tolerância à glicose (TOTG)	34
3.5	Coleta dos tecidos	34
3.6	Avaliações bioquímicas e dosagem hormonal	35
3.7	Análises histológicas do fígado e do tecido adiposo visceral	35
3.7.1	<u>Processamento histológico</u>	35
3.7.2	<u>Morfometria do tecido adiposo</u>	36
3.8	Dosagem hepática de triglicerídeo e glicogênio	36
3.9	Avaliação do <i>status</i> redox (enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo) em plasma e tecido hepático	37
3.9.1	<u>Determinação da atividade das enzimas antioxidantes</u>	37
3.9.2	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); mensuração de nitrito e carbonilação de proteínas</u>	37
3.9.3	<u>Análise do conteúdo proteico por Western Blotting – Avaliação hepática de SOD-1, SOD-2, catalase, GPx e 4-HNE</u>	38
3.10	Expressão de SIRT-1 em tecido hepático pela técnica de PCR em tempo real	40
3.11	Análise estatística	41

4	RESULTADOS	42
4.1	Dados biométricos, adiposidade e ingestão alimentar	42
4.2	Avaliação do perfil metabólico	45
4.3	Análise das alterações hepáticas	47
4.4	Status redox e avaliação de SIRT-1 hepática	50
5	DISCUSSÃO	54
6	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	58
6.1	Relevância do estudo e objetivo geral	58
6.2	Objetivos específicos	59
7	MATERIAIS E MÉTODOS	60
7.1	Protocolo experimental	60
7.2	Desenho experimental	60
7.2.1	<u>Experimento 2</u>	61
7.3	Dados biométricos (massa corporal e comprimento naso-anal)	64
7.4	Controle da ingestão alimentar: dados absolutos, eficiência alimentar e avaliação do comportamento alimentar	64
7.5	Coleta dos tecidos	65
7.6	Avaliação da composição corporal – método da carcaça	65
7.7	Avaliação do perfil glicídico	66
7.8	Dosagem de leptina plasmática	66
7.9	Dosagem hepática de triglicerídeo e colesterol	67
7.10	Análises histológicas do fígado e do tecido adiposo visceral	67
7.10.1	<u>Processamento histológico e morfometria do tecido adiposo</u>	67
7.11	Análise do conteúdo proteico por Western Blotting – Avaliação hepática de SOD-1, SOD-2, catalase, GPx, 4-HNE e nitrotirosina	67
7.12	Análise estatística	68
8	RESULTADOS	69
8.1	Desenvolvimento neonatal - janela crítica do desenvolvimento	69
8.2	Dados pós-desmame - P120	70
8.3	Dados pós-desmame P200 - Avaliações do experimento 1 (grupos submetidos a dieta padrão) e experimento 2 (grupos submetidos a dieta hiperlipídica a partir de P130)	77
8.4	Comportamento alimentar	95
9	DISCUSSÃO	100

CONCLUSÃO.....	106
REFERÊNCIAS.....	107

INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos mostram que um ambiente intrauterino adverso, assim como a exposição da vida pós-natal a uma dieta inadequada, estão fortemente relacionados com maior probabilidade de obesidade ao longo da vida (Metges, 2009). Estas relações embasam o conceito de “programação metabólica” (ou plasticidade ontogenética), no qual certas condições, que marcam (*imprinting*) de forma epigenética, durante os períodos críticos de desenvolvimento, resultam em respostas de longa duração (Lucas, 1991; Gluckman & Hanson, 2007) gerando profundas alterações fisiológicas que podem melhor adaptar o animal ao seu meio ou em caso de mudanças drásticas nas condições iniciais estabelecidas, desencadear severas disfunções tais como: hipertensão arterial sistêmica, distúrbios cardiovasculares (Wu et al., 2009), danos hepáticos (microesteatose), resistência insulínica (Trevenzoli et al., 2010) entre outras doenças, em seres humanos e animais (Yang et al., 2013, Algostoni et al., 2013, Garcia et al., 2011).

Já há alguns anos, diferentes dados vêm alertando o fato de que crianças submetidas a um menor tempo de aleitamento materno apresentam maior ganho de peso na infância configurando-se, portanto, como um importante fator de risco para obesidade e doenças crônicas na idade adulta (Sloan et al., 2008). Com o intuito de compreender os mecanismos destas alterações decorrentes da programação, diferentes estudos experimentais vêm sendo desenvolvidos, onde já foram identificadas modificações na pressão sanguínea, lipídeos séricos, insulina e leptina plasmática em animais precocemente desmamados e alimentados com dieta hiperlipídica (Wang et al., 2005). Adicionalmente, pesquisadores pernambucanos demonstraram que ratos submetidos ao desmame precoce apresentam uma preferência alimentar para dietas com um maior teor lipídico, bem como, uma hiperfagia para este tipo de dieta mais palatável (dos Santos Oliveira et al., 2011).

Em nosso laboratório demonstramos que o desmame precoce em roedores pode ser induzido farmacologicamente através do uso de bromocriptina, um agonista dopaminérgico inibidor de prolactina, que leva a uma hipoprolactinemia materna com consequente diminuição da produção de leite. Esta manipulação promove uma discreta desnutrição neonatal dos filhotes que pode contribuir para programá-los no desenvolvimento de obesidade central, dislipidemia e resistência insulínica, parâmetros característicos da síndrome metabólica (Bonomo et al., 2007, de Moura et al., 2009), além de hipotireoidismo (Bonomo et al., 2008).

Hoje, os estudos vêm determinando uma intrínseca relação entre a obesidade/síndrome metabólica e as doenças hepáticas. Sabe-se que um conjunto de disfunções no metabolismo, promove uma série de alterações na homeostasia da glicose e metabolismo lipídico, bem como, são capazes de aumentar o estresse oxidativo tecidual que acarretam a progressão destas doenças crônicas (Marseglia et al., 2014; Matsuda & Shimomura, 2013).

Por conseguinte, o presente estudo tem por objetivo averiguar o papel do *status* redox sobre as possíveis alterações hepáticas e os mecanismos que estejam relacionados às alterações na homeostase glicídica, em diferentes idades, no modelo de ratos programados pelo desmame precoce farmacológico. Ademais, serão avaliados os possíveis efeitos do uso direto da bromocriptina na prole lactente, avaliando-se animais programados por desmame precoce não-farmacológico e submetidos a diferentes condições dietéticas na idade adulta. Sendo assim, análises de tecidos-alvos, como fígado e tecido adiposo, quanto aos parâmetros de *status* redox (principalmente em tecido hepático), sensibilidade insulínica e análises histológicas foram avaliadas em ambos protocolos experimentais.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aleitamento materno

No intuito de abordar e promover modos de vida mais saudáveis à população, a Organização Mundial de Saúde (OMS), juntamente com o Ministério da Saúde do Brasil, recomendam que crianças sejam amamentadas exclusivamente com leite materno até os seis meses de idade. Posteriormente, segue-se uma adequada alimentação complementar sem, no entanto, descontinuar o aleitamento materno até pelo menos a idade de 2 anos (Ministério da Saúde, 2002). Sendo assim, salvo àquelas situações onde se devem evitar a transmissão vertical de doenças como HIV/Aids, a amamentação é uma prática que deve ser estimulada.

Em uma revisão sistemática sugere-se que a amamentação exclusiva ao seio materno, sem a adição de qualquer outro alimento ou líquido, por 6 meses possui maiores vantagens quando comparado ao aleitamento exclusivo somente pelo período de 3-4 meses seguido de alimentação complementar. Tais benefícios caracterizam-se por menor risco de infecção gastrointestinal e doenças alérgicas para o lactente; além da aceleração da perda de peso após o nascimento e retorno tardio de períodos menstruais para a nutriz (Kramer et al., 2012).

Ainda de acordo com duas importantes meta-análises, da OMS e da *Agency for Healthcare Research and Quality* (AHRQ), os efeitos a longo prazo (adolescência e idade adulta) do aleitamento aos lactentes são caracterizados pela diminuição da pressão arterial sistólica e diastólica, diminuição de colesterol total, maior probabilidade de melhora da capacidade cognitiva e menor risco de obesidade (redução de 22%) e *diabetes mellitus* do tipo II (DM) (redução de 47%). Ademais, encontrou-se uma relação proporcional entre a diminuição do risco de obesidade e a duração do aleitamento materno até aos nove meses de idade, onde cada mês adicional associa-se a uma redução de 4% neste risco (Taveras et al., 2004, Horta et al., 2007, Sandes et al., 2007).

Tais efeitos benéficos podem ser resultantes da composição do leite materno diferenciada, que se caracteriza por apresentar menor conteúdo proteico (leites artificiais geralmente são mais hiperproteicos) (Yang et al., 2013), de sódio e valor energético quando comparados às fórmulas artificiais. Ademais, o leite materno possui uma estratificação lipídica específica que favorece aos ácidos graxos de cadeia longa, e um maior conteúdo de colesterol que, em conjunto, podem promover melhores respostas através da modulação da

HMG-CoA redutase, uma enzima envolvida na biossíntese do colesterol (Taveras et al., 2004).

Somado as qualidades nutricionais supracitadas, o leite materno também é capaz de fornecer importantes componentes bioativos como os fatores de crescimento, enzimas, citocinas e hormônios, tais como: leptina, insulina, adiponectina e grelina, reconhecidos pela ação em vias neuroendócrinas capazes de modular o peso corporal, tornando-se, portanto, possíveis fatores de *imprinting* na programação nutricional (Uçar et al., 2000, Salvino et al., 2009, Schueler et al., 2013). Quanto à desregulação da ingestão alimentar ressalta-se que bebês alimentados com mamadeira podem apresentar uma falta de auto-regulação que propicia um maior consumo energético (Yang et al., 2013).

Apesar dos inúmeros benefícios estabelecidos pelo aleitamento materno, dados mundiais demonstram que a prevalência do aleitamento materno exclusivo ainda é baixa, com menos de 40% das crianças com menos de seis meses em aleitamento exclusivo (WHO, 2012). No Brasil, desde a década de 80, inúmeras estratégias que compõem o Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno, vêm sendo desenvolvidas para estimular a amamentação, como: a capacitação de recursos humanos, apoio aos Hospitais Amigos da Criança, produção e vigilância das normas nacionais de comercialização de alimentos infantis, campanhas nos meios de comunicação e apoio a criação de bancos de leite humano, entre outras (Ministério da Saúde, 2005). Adicionalmente, em 3 de janeiro de 2006 criou-se uma lei que regulamenta a comercialização e o uso de alimentos, mamadeiras, bicos e chupetas para lactentes e crianças de primeira infância, incentivando a amamentação exclusiva nos seis primeiros meses de vida (Lei n° 11.265). Em 9 de setembro de 2008 uma nova lei prorroga por mais 60 dias a duração da licença maternidade, que até então era de apenas 4 meses, determinada no inciso XVIII do caput do art. 7° da Constituição Federal, tornando assim, o tempo de licença maternidade condizente com as diretrizes da OMS (Lei n° 11.770). De acordo com as estatísticas nacionais, todas estas medidas proporcionaram um aumento no tempo médio de amamentação e, por conseguinte, o índice de aleitamento materno exclusivo de crianças com menos de 4 meses, passou de 35% em 1999 para 52% em 2008 (Portal Brasil, 2011).

Contrapondo-se a todas as evidências discutidas até então, a literatura também expõe resultados que não conseguem evidenciar os efeitos da amamentação (seja o tempo total ou a duração da amamentação exclusiva) com a adiposidade em crianças (Vafa et al., 2012). No entanto, devemos ressaltar a limitação dos estudos observacionais onde diferentes fatores podem confundir a interpretação dos dados fazendo com que estes não sejam tão bem

controlados (Gillman et al., 2007). Estudos para o acompanhamento a longo prazo são necessários para avaliar a relação de causalidade da programação porém, seus custos representam uma grande barreira para sua realização, assim como, o tamanho da amostra a ser avaliada. Todavia, mais ensaios randomizados devem ser realizados, principalmente, em países em desenvolvimento onde fatores socioeconômicos, comportamento alimentar, estilo de vida e o baixo peso ao nascimento devem ser analisados, pois a generalização de resultados pode resultar em discrepâncias entre os estudos (Yang et al., 2013).

1.2 Programação / Plasticidade ontogenética

A obesidade, hoje reconhecida como um dos maiores problemas de saúde pública mundial, tornou-se uma fonte importante de estudos no intuito de se obter as medidas terapêuticas mais eficazes. Entretanto, cabe ressaltar que a busca pelos novos recursos tornou-se cada vez mais complexa, à medida que os pesquisadores se deparam com uma síndrome de causas multifatoriais, incluindo fatores genéticos, estilo de vida e alterações epigenéticas decorrente de fatores adversos ocorridos em períodos críticos de desenvolvimento.

O conceito de que um ambiente intrauterino e/ou a exposição da vida pós-natal a condições inadequadas resultam em respostas fisiológicas permanentes (Lucas, 2000) data de estudos ocorridos desde a década de 70. Günter Dörner, um pioneiro nos estudos da neuroendocrinologia, desenvolveu um conceito etiológico da epigenética na programação perinatal pautado, principalmente, nas funções de hormônios que atuam como críticos efetores endógenos responsáveis por inúmeros mecanismos de desenvolvimento (Dörner, 1974). Um dos mais importantes estudos observacionais foi publicado em 1976, no *New England Journal of Medicine*, por Ravelli, Zena Stein e Mervyn Susser que investigaram os efeitos da escassez alimentar durante o período histórico conhecido como “Fome do Inverno Holandês” durante a II Guerra Mundial. Neste trabalho, os autores evidenciaram os efeitos da nutrição materna durante a gestação e a lactação sobre o peso corporal dos seus filhos quando do alistamento militar aos 19 anos de idade. Se a desnutrição ocorreu no último trimestre da gestação ou durante a lactação, eles apresentavam menor probabilidade de serem obesos, porém se tivesse ocorrido na primeira metade da gestação, eles apresentavam maior risco de obesidade (Ravelli et al., 1976). Posteriormente, na década de 80, estudos retrospectivos realizados na Inglaterra corroboram o conceito de programação. Através de um estudo

publicado em 1986, o epidemiologista inglês David Barker e seus colaboradores, constataram uma forte associação entre o baixo peso ao nascimento e a ocorrência de doença cardíaca isquêmica na idade adulta (Barker et al., 1986).

Hoje, referimo-nos ao termo “plasticidade ontogenética” como um substituto a programação. Neste novo conceito tem-se estabelecida uma ideia mais probabilística deste fenômeno, em detrimento de um caráter determinístico como vinha sendo empregado. Sabe-se que a base molecular da programação está relacionada a alterações epigenéticas do DNA, como por exemplo, acetilação de histonas e a metilação de DNA, que modificam a taxa de transcrição de genes específicos sem alterar a sua sequência. Portanto, conceitualmente, a “plasticidade no desenvolvimento” consiste na habilidade que um simples genótipo tem de produzir mais de uma forma alternativa de estrutura, estado fisiológico e comportamento em resposta a condições ambientais (Gluckman & Hanson, 2007).

Dentre os fatores de *imprinting*, destacam-se a nutrição, hormônios e estímulos ambientais (de Moura et al., 2008). Nosso laboratório possui uma vasta experiência na identificação destes fatores, especialmente na lactação. Em diferentes modelos experimentais observou-se a atuação de diferentes agentes durante a lactação, sejam eles: nutricionais, representados pela restrição proteica (Fagundes et al., 2007, Lisboa et al., 2012), desmame precoce sem uso de fármaco ou separação materna (Lima et al., 2011, Franco et al., 2013, Nobre et al., 2012, Younes-Rapozo et al., 2012, Lima et al., 2013), supernutrição por redução da ninhada (Conceição et al., 2013 a,b) e utilização de alimentos funcionais, como a linhaça (Figueiredo et al., 2012, Troina et al., 2012); endócrinos, como hiperleptinemia neonatal (Trevenzoli et al., 2007, Fraga-Marques et al., 2010); e ambientais, como exposição ambiental à fumaça do cigarro e do uso da nicotina isolada (Oliveira et al., 2011; Santos-Silva et al., 2012).

1.3 Programação pelo desmame precoce – Modelos experimentais

No intuito de mimetizarmos o que ocorre com seres humanos, diferentes modelos experimentais são propostos pela literatura, e em alguns destes, podemos encontrar limitações pontuais sem, no entanto, comprometer a validação dos estudos.

Um possível protocolo experimental de desmame precoce pode ser realizado através da simples privação do contato materno. Neste modelo de desmame precoce podemos confirmar a importância da ingestão do leite materno mesmo em períodos precoces da

lactação (P15). Foi demonstrado que animais submetidos à privação do leite materno apresentam uma superexpressão de NPY (um peptídeo orexigênico) no núcleo arqueado (ARC) hipotalâmico e redução de leptina plasmática, condições estas, que foram revertidas pela infusão intragástrica de leite, mas que não foram sustentadas pela infusão intragástrica de água (Kowalski et al., 2002). Tais achados demonstram a importância do leite neste modelo de programação decorrente da privação materna, não se resumindo somente a condição de estresse da prole, apesar desta condição, se configurar como o maior viés deste tipo de modelo experimental.

Em seres humanos se utiliza a supressão da produção láctea, com a bromocriptina, em determinadas situações, tais como hiperprolactinemia (Mirkou et al., 2012). Assim, nosso laboratório desenvolveu um modelo diferente de desmame precoce baseado no tratamento materno com bromocriptina, sem que precisasse haver a privação materna, reduzindo o grau de estresse da prole.

Sabe-se que roedores programados desta forma, apresentam alterações aos 21 dias de vida condizentes com o *imprinting* do metabolismo. Ao desmame, animais cujas mães receberam, nos últimos 3 dias da lactação, 2 doses de 1 mg de bromocriptina ao dia, apresentam uma desnutrição neonatal acompanhada de hiperleptinemia, graças a maior transferência deste hormônio pelo leite materno, mesmo diante de uma produção diminuída de leite. Consequentemente, os resultados demonstraram uma clara evidencia sobre o papel da prolactina na modulação da concentração de leptina no soro da prole, tornando-a um importante sinalizador do estado nutricional materno para os filhotes através do leite (Bonomo et al., 2005). Tais acontecimentos durante este período do desenvolvimento geram alterações na idade adulta que caracterizam o efeito da programação (tabela 1).

Tabela 1 - Efeitos da programação por desmame precoce pelo uso de bromocriptina materna (2 mg por dia), em ratos machos aos 180 dias de vida

Bonomo et al., 2007	Maior massa corporal, maior adiposidade visceral e hiperleptinemia associada à resistência ao efeito anorexigênico da leptina.
Bonomo et al., 2008	Hipofunção tireoidiana, decorrente de uma alteração central que promove a diminuição da secreção de TRH e TSH.
de Moura et al., 2009	Hiperglicemia, dislipidemia, elevação de corticosterona e catecolamina, hipoadiponectinemia, hipoprolactinemia e resistência insulínica.
Passos et al., 2011	Menor peso renal, glomeruloesclerose e fibrose peritubular associada a menor <i>clearance</i> de creatinina e hipercalemia.
Fraga et al., 2011	Aumento da ansiedade e déficit de memória e aprendizado.
Younes-Rapozo et al., 2015	Aumento da expressão de NPY (núcleo arqueado - ARC e paraventricular - PVN) e inflamação hipotalâmica.

Também já foi descrito pelo nosso grupo, um modelo diferente de desmame precoce através do uso de uma faixa adesiva no corpo da mãe (ou seja, não-farmacológico). Este recurso impede que os filhotes mamem, formando uma barreira física e obrigando os filhotes a consumirem ração padrão a partir do 17° - 18° dia de vida pós-natal, sem que ocorra privação materna. Tal manipulação resulta em modificações precoces nos filhotes machos representadas por diminuição de massa corporal (MC), comprimento naso-anal (CNA), percentual de gordura total, hipoleptinemia, hipoglicemia e hipoinsulinemia aos 21 dias de vida. Entretanto, na idade adulta, os animais desmamados precocemente apresentam aumento

de MC, hiperfagia, resistência insulínica, hipertrigliceridemia e alteração da via de sinalização da leptina, sugerindo uma resistência central a este hormônio (Lima et al., 2011), capaz de promover uma disfunção de neuropeptídeos hipotalâmicos representada por aumento de NPY e redução de CART (um peptídeo anorexigênico) no núcleo paraventricular (PVN) (Younes-Rapozo et al., 2012).

1.4 Bromocriptina

A bromocriptina é um fármaco pertencente à classe dos agonistas dos receptores da dopamina, derivados da ergolina (agonista do receptor D2), capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Friis et al., 1979). Seus efeitos são mediados via recomposição do tônus dopaminérgico e simpático no sistema nervoso central (Cincotta, 2002), além de promover uma alteração nos níveis de neurotransmissores monoamina no hipotálamo, exercendo assim, efeitos significativos sobre a glicemia e o metabolismo lipídico (Defronzo, 2011).

Sob a apresentação de mesilato de bromocriptina, esta droga vem sendo apontada como a mais nova aposta terapêutica para o tratamento de pacientes portadores de diabetes (sem o uso de insulino-terapia) e com ineficiente controle glicêmico. Através do nome comercial Cycloset® a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou desde 2009 a sua prescrição aos seres humanos como um tratamento co-adjuvante ao *diabetes mellitus* do tipo II em conjunto com o controle dietético e prática de atividades físicas (Yogendra, 2010; Quianzon & Cheikh, 2012).

A diferença que existe nesta nova formulação para a já conhecida fórmula de mesilato de bromocriptina denominada Parlodel® se baseia no pico de liberação, caracterizada por uma rápida liberação na versão Cycloset® o que justificaria uma melhor resposta nas alterações glicêmicas dos pacientes diabéticos principalmente no período matinal. Acredita-se que estes pacientes amanhecem com um decréscimo do tônus dopaminérgico, podendo então, ser rapidamente corrigidos pelo uso da medicação até duas horas após o despertar (Defronzo, 2011; Weiland & Hilaire, 2013).

A bromocriptina já se mostrou um fármaco favorável ao tratamento de algumas disfunções, não somente na homeostase glicêmica, decorrentes da obesidade inclusive nos estudos experimentais. Roedores submetidos à obesidade induzida por dieta apresentam melhora da tolerância à glicose, da esteatose hepática e do estresse oxidativo mitocondrial,

quando tratados com bromocriptina (10mg/Kg de peso corporal, intraperitonealmente, por 4 semanas). Os pesquisadores acreditam que tais resultados são decorrentes da atividade agonista da bromocriptina nos receptores dopaminérgicos D2, que promovem uma diminuição da ingestão alimentar e aumento da atividade locomotora desencadeando assim, uma série de alterações metabólicas favoráveis (Davis et al., 2006).

Recentemente foi mostrado que o tratamento com bromocriptina por 6 semanas, na dose de 10mg por Kg de peso corporal, reduziu as complicações cardiovasculares associadas a síndrome metabólica em ratos alimentados com dieta rica em frutose. O tratamento crônico reduziu o ganho de peso, melhorou a glicemia, o perfil lipídico, a insulinemia e a pressão sanguínea (através da melhora na resposta relaxante a acetilcolina na aorta e reduzida resposta pressora da adrenalina, noradrenalina e fenilefrina) demonstrando uma proteção as modificações degenerativas e de hipertrofia do miocárdio (Nade et al., 2012).

1.5 Mecanismo de resistência insulínica (RI) e atuação do *status* redox no tecido hepático

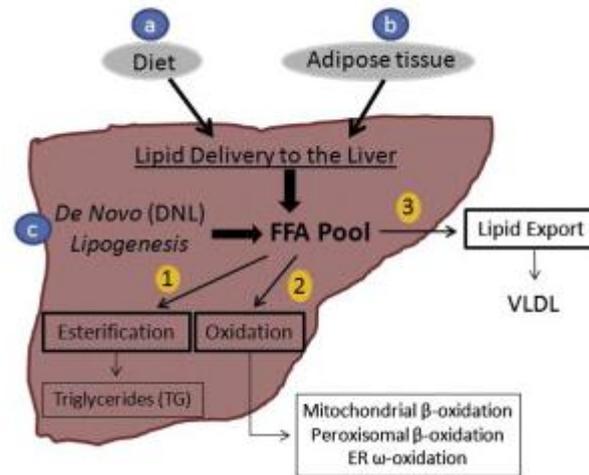
Hoje, a doença não alcoólica do fígado gorduroso (NAFLD) vem ganhando cada vez mais relevância devido a sua forte associação com a obesidade e DM (Buqué et al., 2008), sendo considerada a tempos como uma manifestação hepática da síndrome metabólica (Reaven, 1999). A NAFLD pode progredir desde uma simples esteatose a uma esteatohepatite e cirrose, mostrando que a NAFLD nem sempre pode ser encarada como uma desordem benigna (Dima et al., 2012). Sua patogênese envolve múltiplos processos dentre os quais a RI, estresse oxidativo, apoptose e liberação de citocinas (Kim et al., 2008).

Todavia, cabe ressaltar que mais do que a obesidade por si, devemos considerar como um agravo a diferenciação do compartimento corporal, caracterizado, principalmente, pelo acúmulo de gordura visceral. Estudo em seres humanos realizados com tomografia computadorizada conclui que o acúmulo ectópico de gordura no fígado relaciona-se grandemente com a gordura abdominal em detrimento da gordura subcutânea (Jang et al., 2011).

Do ponto de vista fisiológico a gordura é fornecida para o fígado a partir de três fontes: dieta, lipólise do tecido adiposo, e do mecanismo de *lipogenesis de novo* (figura 1). Portanto, a homeostase de lípideos no fígado resulta de um bom equilíbrio entre o

fornecimento de gordura, a sua utilização, quer por esterificação ou oxidação, e pela exportação dos lipídeos a demais tecidos (Matherly et al., 2012).

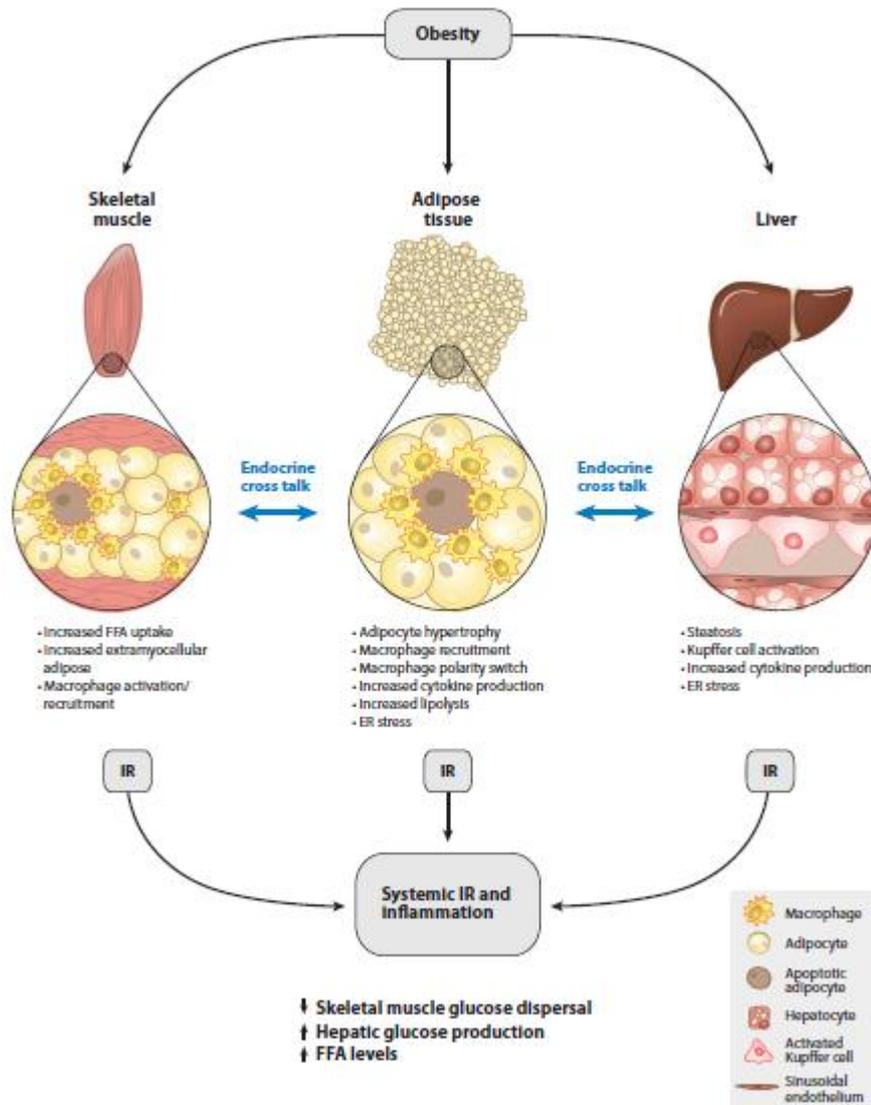
Figura 1 - Metabolismo hepático de lipídeos



Fonte: Matherly et. al, 2012.

Uma justificativa plausível que pode nortear a existência da relação entre NAFLD - obesidade - DM passa pelo mecanismo de RI. Afinal, a obesidade é uma condição metabólica capaz de promover uma intensa liberação de mediadores inflamatórios acarretando, portanto, na instalação da inflamação propriamente dita e, conseqüentemente, um estado de RI em tecidos-avos como: o tecido adiposo, fígado e músculo esquelético (figura 2), levando a uma série de disfunções a nível tecidual (Olefsky et al., 2010).

Figura 2 - Alterações nos tecidos-alvos da insulina em quadros de obesidade e suas consequências sistêmicas

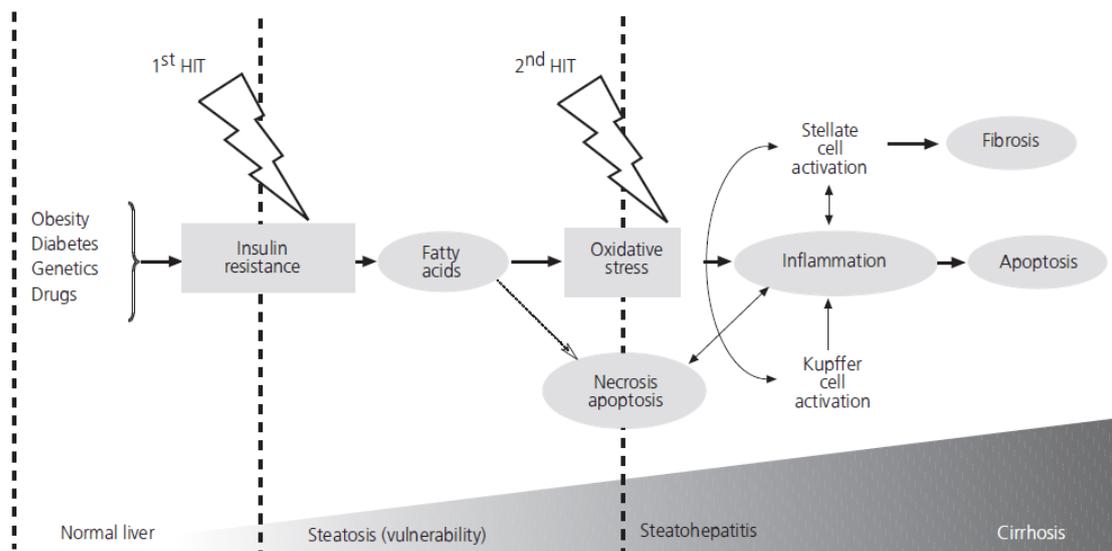


Fonte: Olefsky et al., 2010.

Neste caso a resistência à ação da insulina caracteriza-se como uma alteração chave no surgimento do DM, uma vez que a instalação deste quadro já ocorre mesmo nos estados pré-diabéticos. Na presença de RI tem-se uma superprodução do hormônio pelas células beta pancreáticas, levando a uma hiperinsulinemia compensatória capaz, inclusive, de sobrepor-se aos efeitos da resistência, tornando a tolerância à glicose relativamente normal. Em indivíduos que desenvolvem a DM observa-se uma falha neste mecanismo compensatório, resultante de uma exaustão das células beta na produção de insulina, desencadeando uma piora da tolerância à glicose e evolução fisiopatológica (Dabelea et al., 2004).

Inicialmente, a literatura abordava a doença hepática como uma alteração condicionada a RI (figura 3), onde mais tardiamente passávamos a observar o aumento do estresse oxidativo (EO) e os consecutivos mecanismos de inflamação e apoptose (Buqué et al., 2008).

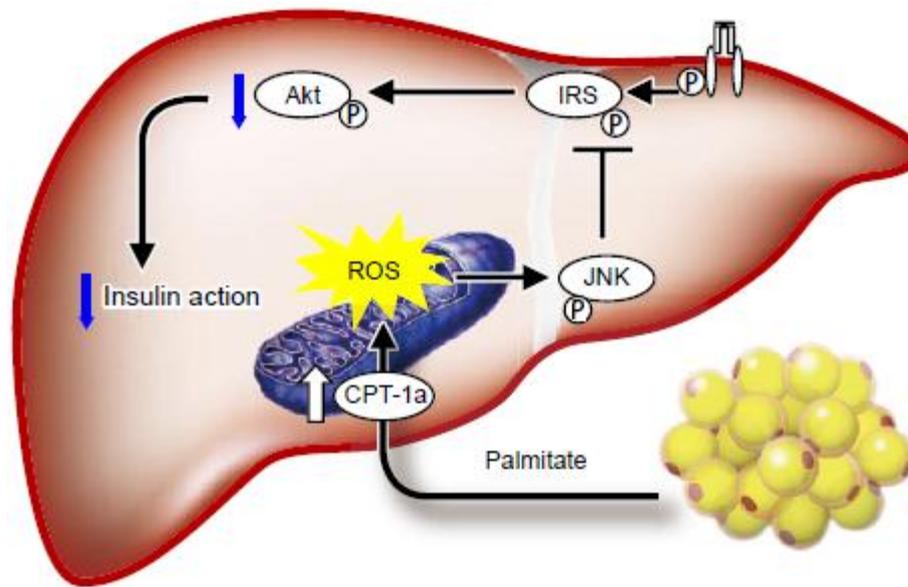
Figura 3 - Resistência insulínica como uma condição causal da doença não alcoólica do fígado gorduroso



Fonte: Buqué et. al, 2008.

Apesar de todas as considerações que podemos estabelecer para uma relação entre RI e doenças hepáticas, questiona-se se esta condição seria baseada em uma relação causal. Hoje, discute-se que o EO poderia ser um fator inicial ao surgimento e/ou agravamento de doenças crônicas. Neste caso, o influxo de ácidos graxos para o fígado induziria a maior expressão da enzima carnitina palmitoiltransferase - 1 (CPT-1), acelerando o metabolismo e favorecendo ao excesso de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial. Esta exacerbação desencadeia uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que influenciam negativamente na sinalização intracelular de insulina via ativação da quinase c-Jun NH2 terminal (JNK) (figura 4) (Takamura et al., 2012).

Figura 4 - Estresse oxidativo como fator causal da resistência insulínica



Fonte: Takamura et al., 2012.

Reconhecemos como ERO o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (HO^{\bullet}), além de seus produtos oxidantes secundários (hidroperóxidos e radicais peróxidos de biomoléculas). Assim, definimos como EO, as circunstâncias nas quais o cômputo de radicais livres, incluindo as EROs, resultam em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos, o que evidencia um desequilíbrio entre os sistemas pro-oxidantes e antioxidantes, de forma que os primeiros sejam preponderantes.

Reconhece-se que o mecanismo de oxidação de lipídeos mediados por radicais livres (peroxidação lipídica) pode estar relacionado com a patogênese de diversas doenças. Esta peroxidação é capaz de induzir a distúrbios na membrana celular, como alteração de integridade, permeabilidade e fluidez; a redução quantitativa e/ou funcional de biomoléculas; modificação das lipoproteínas LDL-c e HDL-c para formas mais pró-aterogênicas e inflamatórias; além da geração de produtos tóxicos. Adicionalmente, produtos secundários deste processo, como componentes carbonil, podem modificar proteínas e bases de DNA (Poli et al., 2008).

Em contraponto, o sistema antioxidante protege contra a geração descontrolada de radicais livres e ERO ou inibe suas consecutivas reações com estruturas biológicas. As principais enzimas antioxidantes incluem as dismutases, como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), que não necessitam de cofatores; e as peroxidases, como a glutaciona

peroxidase (GPx). Ademais, lipídeos como α -tocoferol e licopeno, proteínas como albumina e bilirrubina e outros compostos como o ácido úrico também exercem atividade antioxidante. Portanto, conclui-se que as interações sinérgicas entre os diferentes componentes antioxidantes podem exercer uma importante função na regulação de expressão proteica e/ou atividade ao nível transcricional ou pós-transcricional (Chaudière et al., 1999).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Relevância do estudo e objetivo geral

Levando-se em consideração que a lactação se caracteriza como uma janela crítica do desenvolvimento e que estudos demonstram a condição de programação metabólica em modelo de desmame precoce, sendo ele farmacológico ou não, objetivamos investigar as possíveis interferências na homeostase glicêmica e *status* redox, bem como, as suas associações às disfunções na morfologia do fígado e do tecido adiposo visceral em ratos programados pelo desmame precoce farmacológico em duas diferentes idades da fase adulta (P90 e P180).

2.2 Objetivos específicos

- a) Acompanhamento da massa corporal (MC), comprimento naso-anal (CNA) e ingestão alimentar;
- b) Análise da adiposidade;
- c) Avaliação da glicemia de jejum, curva glicêmica, insulina plasmática e sensibilidade insulínica;
- d) Avaliação do triglicerídeo plasmático;
- e) Avaliação das enzimas hepáticas a nível plasmático;
- f) Verificação hepática do conteúdo de triglicerídeos e glicogênio;
- g) Avaliação do *status* redox através da atividade e/ou quantificação protéica no plasma e fígado dos componentes enzimáticos do sistema antioxidante (SOD, CAT e GPx) e metabólitos indicativos do estresse oxidativo (peroxidação lipídica e oxidação proteica - MDA, proteínas carboniladas, relação nitrito/nitrato e 4-HNE);
- h) Estudo da morfologia do fígado e tecido adiposo visceral;
- i) Expressão de SIRT-1 no tecido hepático.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental

Todos os animais utilizados foram mantidos em biotério sob temperatura (21-23°C) e ciclo claro-escuro (7:00 - 19:00h) controlados, com livre acesso à água e ração padrão para roedores. Os experimentos descritos a seguir foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA/186/2007, CEUA/017/2009).

3.2 Desenho experimental

Ratas Wistar nulíparas de 3 meses de idade foram acasaladas com machos matrizes (proporção 2:1 fêmeas/macho) e acondicionadas em caixas individuais. Após o parto espontâneo, conferiu-se o tamanho da ninhada, peso dos filhotes e a diferenciação quanto ao gênero através da distância ânus-genital. A partir de então, ajustou-se o tamanho da ninhada para 6 filhotes machos por rata lactante, no intuito de padronizar o suprimento de alimento e maximizar o potencial lactotrófico.

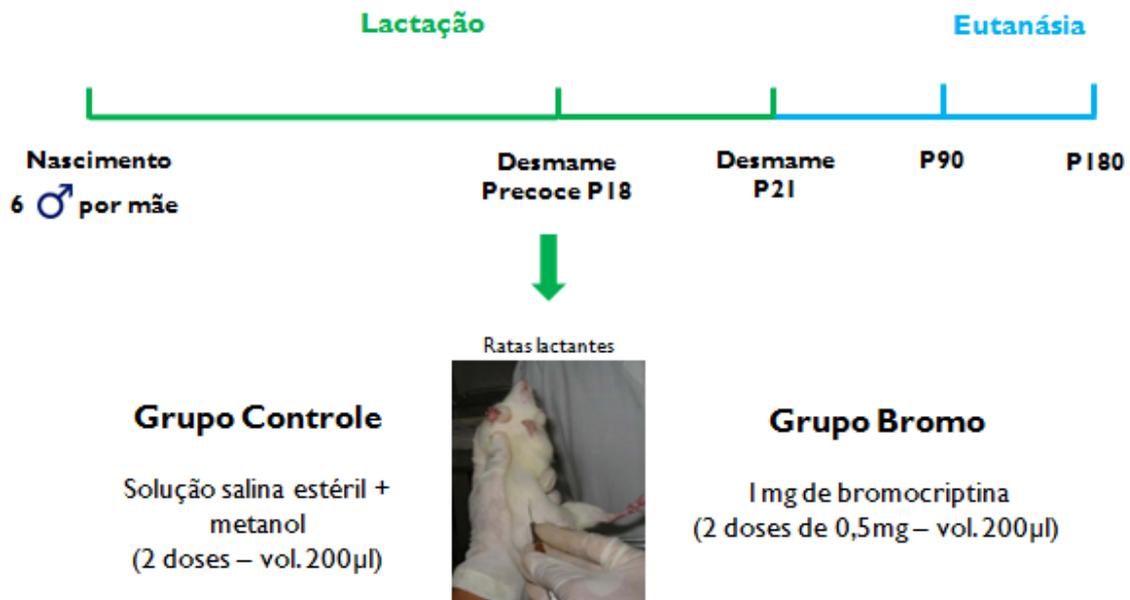
As ninhadas foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos experimentais:

Grupo Bromocriptina (Bromo) (n=5): Filhotes cujas mães foram tratadas intraperitonealmente com bromocriptina (Parlodel[®], Novartis, São Paulo, SP, Brasil) diluída em uma solução de metanol-salina (1:1 v/v), na dose de 1mg/dia, dividida em duas doses (volume de 200 µL cada) do 18º dia da lactação até o desmame;

Grupo Controle (Controle) (n=5): Filhotes cujas mães receberam o mesmo volume de solução veículo (metanol-salina - 1:1 v/v), intraperitonealmente, duas vezes ao dia, pelo mesmo período de tempo.

O desmame ocorreu no 21º dia de vida pós-natal (P21) e os filhotes passaram a receber dieta comercial padrão para roedor (Nuvilab[®], Sogorb, São Paulo, SP, Brasil), sendo acompanhados até o dia do sacrifício, que ocorreu em P90 e P180 (figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática do desenho experimental



3.3 Biometria e controle da ingestão alimentar

Na lactação, a MC e o CNA foram aferidos a cada três dias com instrumento acurado e dimensionado ao tamanho dos animais (balança digital e fita métrica). Após o desmame, estes parâmetros foram monitorados semanalmente, juntamente com a ingestão alimentar em termos absolutos, através da diferença entre a quantidade de ração fornecida (R_i) e a quantidade de ração restante (R_f) após 7 dias e dividida pelo número de animais (n) que compunham a caixa. Portanto, para a avaliação da ingestão alimentar diária considerou-se:

$$\text{Ingestão de ração (g)} = \left[\frac{R_i - R_f}{n} / 7 \right]$$

3.4 Avaliação de curva glicêmica - teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Na semana anterior aos sacrifícios (P90 e P180), os animais foram submetidos ao TOTG. Após jejum de 12 h (20:00 – 08:00h) os animais receberam, por gavagem orogástrica, uma solução de glicose a 50% em solução salina estéril (0,9% NaCl) na dose de 2 g/kg de MC. Através de uma pequena incisão na cauda dos animais coletou-se amostras de sangue para a medida da glicemia nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. A glicemia foi avaliada utilizando-se fitas reagentes com auxílio de glicosímetro (Accu-chek Advantage, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha) do sangue proveniente da veia caudal. Em seguida, calculou-se o valor da área sob a curva através da regra trapezoidal.

3.5 Coleta dos tecidos

Nos pontos de corte determinados (P90 e P180), os animais foram colocados em jejum de 12 h (20:00 – 08:00h) e decapitados. O sangue foi coletado em tubo previamente heparinizado e centrifugado (2.500 rpm, 25 minutos, 4°C). O plasma obtido foi estocado individualmente a -20°C e utilizado para diferentes dosagens. Cada análise foi realizada em ensaio único, dispensando medida da variação inter-ensaio.

As gorduras retroperitoneal, epididimária e mesentérica foram coletadas e pesadas. Estabeleceu-se como gordura retroperitoneal o depósito existente em volta de cada rim e ao longo dos músculos lombares; a gordura epididimária como o tecido adiposo ao redor dos ureteres, bexiga, epidídimo; e gordura mesentérica os depósitos existentes ao longo das alças intestinais. O somatório destes compartimentos de gordura perfaz a massa de gordura visceral (MGV) (Hansen et al., 1997).

O fígado também foi dissecado, e teve o seu volume aferido através do método de Scherle, que se fundamenta no deslocamento do líquido devido ao volume do órgão submerso em solução salina de maneira que as paredes do recipiente posicionado sobre uma balança não sejam tocadas (Scherle, 1970). Com isso, tem-se a avaliação do volume por meio do peso, visto que, volume = massa/gravidade. Considerando que a gravidade da solução fisiológica salina é 1,0048, pode-se considerar então que volume (cm³) = massa (g) (Weibel, 1979). A

tíbia esquerda foi dissecada e medida com uso do paquímetro permitindo a padronização da massa do fígado e o estudo comparativo entre os grupos experimentais (Yin et al., 1982).

Todos os tecidos coletados foram fracionados e acondicionados de maneiras distintas (congelamento a -80°C ou solução de fixador histológico) para a execução de diferentes procedimentos.

3.6 Avaliações bioquímicas e dosagem hormonal

Imediatamente antes dos sacrifícios (P90 e P180), a glicemia de jejum foi verificada através de uma pequena incisão na cauda dos animais utilizando-se fitas reagentes que foram lidas em glicosímetro (Accu-chek Advantage, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha).

A insulinemia foi avaliada por radioimunoensaio utilizando-se kit comercial (ICN Pharmaceuticals, Orangeburg, NY, EUA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4,1% e o limite de sensibilidade foi de 0,1 ng/mL. Os valores foram expressos em $\mu\text{UI/mL}$.

Para avaliação da sensibilidade insulínica, calculou-se o índice HOMA-IR [glicemia de jejum (mmol/L) x insulina plasmática de jejum ($\mu\text{UI/mL}$) / 22.5] (Matthews et al., 1985).

O conteúdo de triglicerídeos (mg/dL), alanina aminotransferase – ALT (U/L) e aspartato aminotransferase – AST (U/L) foram dosados através de kit comercial (Biosystem[®], Barcelona, Espanha) com auxílio de espectrofotômetro (Biosystem[®], Barcelona, Espanha).

3.7 Análises histológicas do fígado e do tecido adiposo visceral

3.7.1 Processamento histológico

Fragmentos da gordura retroperitoneal e de diferentes lobos hepáticos, de ambos os períodos estudados (P90 e P180), foram fixados em Formalina de Millonig (1,27 mol/L formaldeído, 0,1 M tampão fosfato, pH 7,2) por 48 h. Após processamento histológico, constituído por desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico e diafanização em xilol, o material foi incluído em Paraplast Plus[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para

obtenção de cortes, aleatórios e não sequenciais, com 5µm de espessura, que foram corados com hematoxilina e eosina (HE).

3.7.2 Morfometria do tecido adiposo

O tamanho dos adipócitos foi determinado através do software Image-Pro Plus[®], versão 5.0 (Media Cybernetics, SilverSpring, MD, EUA) com a utilização de imagens digitais adquiridas aleatoriamente (formato TIFF, 36-bit color, 1360x1024 pixels, objetiva 40x) com microscópio Olympus BX40 e câmera Olympus DP71 (Olympus, Tokyo, Japão). Ao todo, 50 adipócitos por animal foram mensurados, em cada um dos 5 animais por grupo.

3.8 **Dosagem hepática de triglicerídeo e glicogênio**

Amostras de 50 mg de fígado foram homogeneizadas em 1 mL de isopropanol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e centrifugadas (5.900 rpm, 10 minutos, 4°C). O conteúdo total de triglicerídeos foi mensurado a partir de ensaio colorimétrico utilizando kit comercial (Bioclin[®], Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante.

A glicose produzida pela hidrólise do glicogênio hepático foi avaliada com kit comercial (Doles, Goiânia, GO, Brasil) em método previamente descrito (Casimiro-Lopes et al., 2012). As amostras de fígado foram pesadas e homogeneizadas com 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) à 10%. Após a centrifugação (1.000xg, 10 min, 4°C) foram adicionados 5 mL de etanol absoluto (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) a 2 mL do sobrenadante. Após 24 horas de incubação à -20°C a mistura foi centrifugada (1.000xg, 10 min, 4°C) e o sobrenadante descartado. O glicogênio foi hidrolisado pela incubação do *pellet* com 1M de ácido clorídrico (HCl) (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 30 minutos. Adicionou-se 1 mL (1M) de hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) para neutralizar a mistura. A glicose foi quantificada em 200 µL do sobrenadante a 510 nm em espectrofluorímetro (Hidex, Turku, Finlândia).

3.9 Avaliação do *status* redox (enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo) em plasma e tecido hepático

3.9.1 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

Amostras de fígado (200mg) foram homogeneizadas (CT-136, Cientec – Laboratory Equipment, Campinas, SP, Brasil) em tampão fosfato com potássio e EDTA. Os homogenatos hepáticos e o plasma foram estocados a -80°C até as análises serem realizadas. A concentração proteica foi avaliada através do método de Bradford (Bradford, 1976).

As análises foram realizadas conforme estudo prévio (Conceição et al., 2013 a,b). Para a atividade total da superóxido dismutase (SOD) mensurou-se a absorvância em comprimento de onda de 480 nm (Hidex, Turku, Finlândia), após inibição da auto-oxidação da adrenalina. A atividade da catalase (CAT) foi obtida através da taxa de decréscimo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em comprimento de onda de 240 nm (Hidex, Turku, Finlândia). Já a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi mensurada através da oxidação de NADPH em presença de H_2O_2 com comprimento de onda de 340 nm (Hidex, Turku, Finlândia).

3.9.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); mensuração de nitrito e carbonilação de proteínas

Para a avaliação da peroxidação lipídica, obtivemos a concentração de manoldialdeído (nmol/mg proteína) em amostras de plasma e fígado homogeneizado. Ambos foram adicionados de 1 mL de TCA a 10% e 0,67% de ácido tiobarbitúrico (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) e aquecidos por 30 minutos. A absorvância da fase orgânica contendo um cromógeno de coloração rósea foi então, mensurado através de espectrofotômetro (Hidex, Turku, Finlândia) em comprimento de onda de 532 nm.

O radical óxido nítrico (NO) foi indiretamente quantificado através da análise da razão nitrito/nitrato em comprimento de onda de 540 nm. A oxidação de proteínas estimada pela reação dos grupos carbonil com 2,4-dinitro-fenilhidrazina (Sigma Chemical, St Louis, MO,

EUA) com comprimento de onda de 380 nm cujos valores foram expressos como nmol de carbonil/mg de proteína.

3.9.3 Análise do conteúdo proteico por Western Blotting – Avaliação hepática de SOD-1, SOD-2, catalase, GPx e 4-HNE

Fragmentos de fígado (100mg) foram homogeneizados em tampão de lise (50mM Hepes, pH 6.4, 1mM MgCl₂, 10mM EDTA e 1% Triton X-100) adicionado de 1 µg/mL de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St Louis MO, EUA), para posterior centrifugação (13.500 rpm, 25 minutos, 4°C). As amostras foram coletadas, aliqüotadas e analisadas quanto à concentração proteica através de kit específico (BCA Protein Assay Reagent[®], ThermoScientific, IL, EUA) com auxílio de Leitor de Elisa e comprimento de onda de 540 nm (TU-1800 UV-VIS, EUA). Em seguida, as amostras foram desnaturadas a uma temperatura de 95°C por 5 minutos.

Foram utilizadas amostras contendo 10 µg/mL de proteína em gel de poliacrilamida de 10 a 12% (SDS-PAGE). Para a identificação dos respectivos pesos moleculares durante a separação das proteínas por eletroforese, utilizou-se marcador de peso molecular específico (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido).

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através de corrente elétrica (PVDF; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). O bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado em uma solução de 2% (peso/volume) de albumina bovina em T-TBS (0,02M Tris; pH 7.5; 0,15M NaCl; 0.1% Tween 20) durante 1 h e 30 minutos em mesa agitadora a temperatura ambiente. Sequencialmente, as membranas foram incubadas, *overnight* a 4°C, com anticorpo primário em T-TBS (tabela 2). No dia seguinte, após tripla lavagem com T-TBS, as membranas seguiram para incubação, sob agitação constante, com anticorpo secundário por 1 h. Após mais uma sequência de lavagens, as membranas foram incubadas com estreptavidina na mesma concentração do anticorpo secundário por 1 h em temperatura ambiente.

A visualização das bandas se deu através do equipamento ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) após a incubação das membranas em composto quimioluminescente (ECL, AmershamBiosciences, Piscataway, NJ, EUA). Para a

quantificação da densidade das bandas utilizou-se o software Image J (Media Cybernetics, Silver Spring, Md, EUA). Todos os resultados foram normalizados pelo controle.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados na técnica de western blotting

	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
SOD-1	Anti-Cu-Zn SOD-1 - rabbit policlonal (1:1000) (Cód. sc-11407, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA)	Donkey anti-rabbit IgG (1:10000)
SOD-2	Anti-Mn SOD-2- mouse monoclonal (1:500) (Cód. sc-133134, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA)	Donkey anti-mouse IgG (1:10000)
Catalase	Anti-Catalase - mouse monoclonal (1:1000) (Cód. C0979, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)	Donkey anti-mouse IgG (1:10000)
GPx	Anti-GPx1/2 - mouse monoclonal (1:500) (Cód. sc-133152, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA)	Donkey anti-mouse IgG (1:3000)
4-HNE	Anti-4-HNE - goat policlonal (1:500) (Cód. sc-130083, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA)	Donkey anti-goat IgG (1:7000)
Actina	Anti-Actina - mouse monoclonal (1:500) (Cód. A3853, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)	Donkey anti-mouse IgG (1:7000)

3.10 Expressão de SIRT-1 em tecido hepático pela técnica de PCR em tempo real

A extração do RNA foi realizada em amostras de 100 mg de tecido, sob condições controladas e livres de RNase, através do reagente TRIzol (Cat. No.15596 - 018, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e quantificadas através do equipamento NanoVue™Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). No intuito de eliminarmos qualquer vestígio de contaminação como proteína ou solventes da extração, as amostras utilizadas no estudo apresentaram uma razão de absorbância $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$.

A confecção do cDNA partiu da amostra de RNA total, utilizando Moloney Murine LeukemiaVirus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) para RT-PCR (Cat. No. 1158862, Promega, Madison, WI, EUA) e Oligo(dT)15Primer (Promega, Madison, WI, EUA). Medimos a expressão de RNAm de SIRT-1 no fígado dos animais P90 e P180 utilizando a proteína 36β-4 como controle interno do ensaio. Ambos os primers foram confeccionados pela ABI Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA) (tabela 3).

As amostras de cDNA foram amplificadas utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, com o auxílio do equipamento Applied Biosystems 7500 Real- Time PCR System (Life Technologies Co.,Carlsbad, CA, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicata, como as seguintes especificações: 40 ciclos; 95°C por 15 segundos; 60° por 30 segundos e 70° por 45 segundos. Os resultados foram normalizados pelos níveis de expressão do RNAm de 36β-4 utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001).

Tabela 3 - Sequência dos primers utilizados na técnica de PCR em tempo real

Sequência dos primers	
SIRT-1	5'-CAG GTT GCA GGA ATC CAA A-3' (F)
	5'-CAA ATC AGG CAA GAT GCT GT-3' (R)
36 β -4	5'-TGT TTG ACA ACG GCA GCA TTT-3' (F)
	5'-CCG AGG CAA CAGTTG GGT A-3' (R)

3.11 Análise estatística

Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste *t-Student* através do *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Em todas as avaliações, o valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

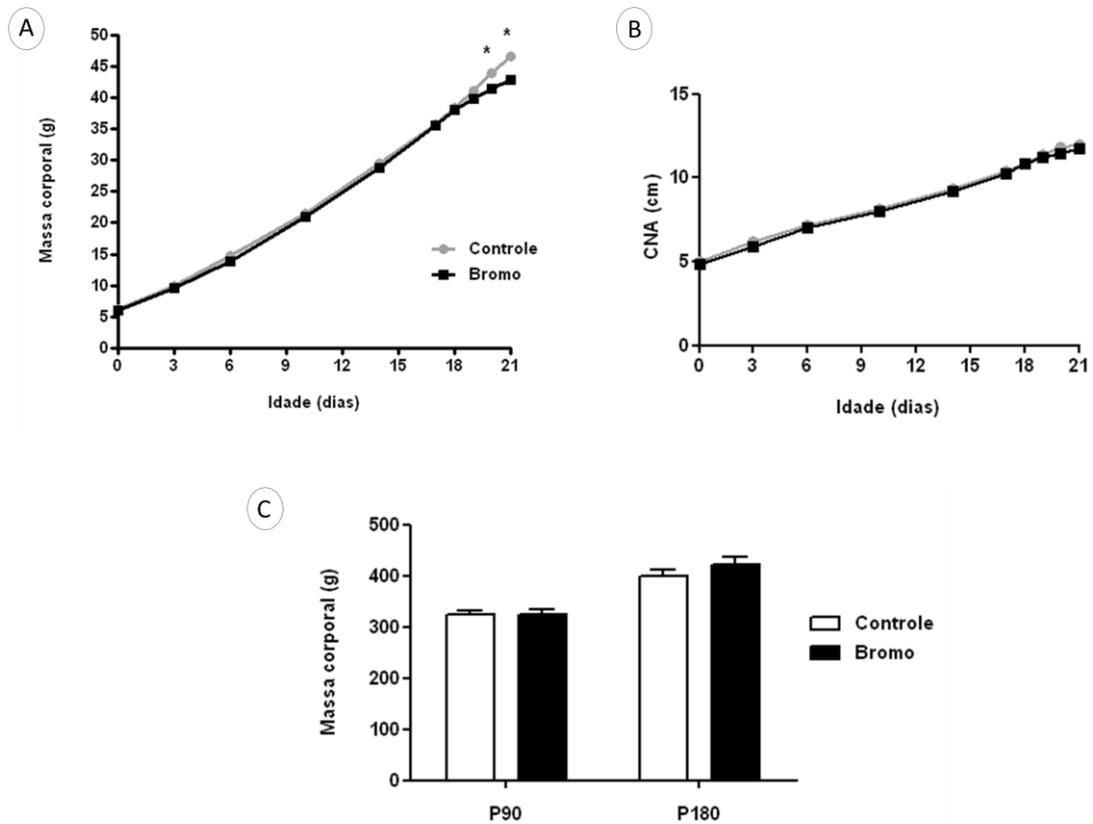
Os dados avaliados em P90 foram representados por somente um animal de cada ninhada, totalizando 5 amostras por grupo. Em P180, os dados avaliados foram representados pela média de 2 animais por ninhada (10 animais por grupo), também totalizando 5 amostras por grupo.

4 RESULTADOS

4.1 Dados biométricos, adiposidade e ingestão alimentar

O desmame precoce foi capaz de promover uma discreta, mas significativa redução da MC do grupo bromo ao 20^o e 21^o dia de vida (-6% e -8% respectivamente) sem, no entanto, afetar o CNA. Após este período, não foram encontradas diferenças tanto na MC quanto no CNA durante o tempo de acompanhamento do estudo (figura 6). O mesmo ocorreu com a ingestão alimentar que não diferiu entre os grupos em qualquer período estudado (dados não mostrados). Contudo, um aumento da adiposidade foi observado no grupo bromo através da análise da MGV (+45% em P90 e +47% em P180) (figura 7), associado a uma hipertrofia das células adiposas, demonstrado através do estudo morfométrico (+31% em P90 e +43% em P180) (figura 8).

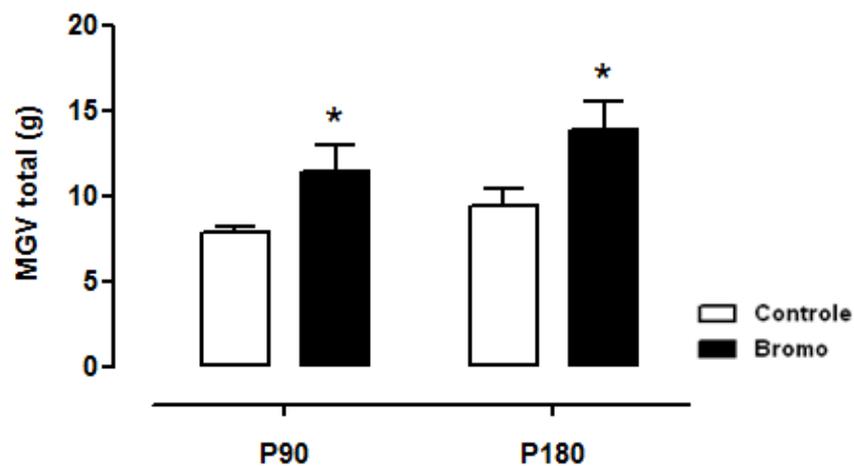
Figura 6 - Parâmetros biométricos



Legenda: Evolução da massa corporal durante a lactação (A); evolução do comprimento naso-anal durante a lactação (B); massa corporal pós desmame - P90 e P180 (C).

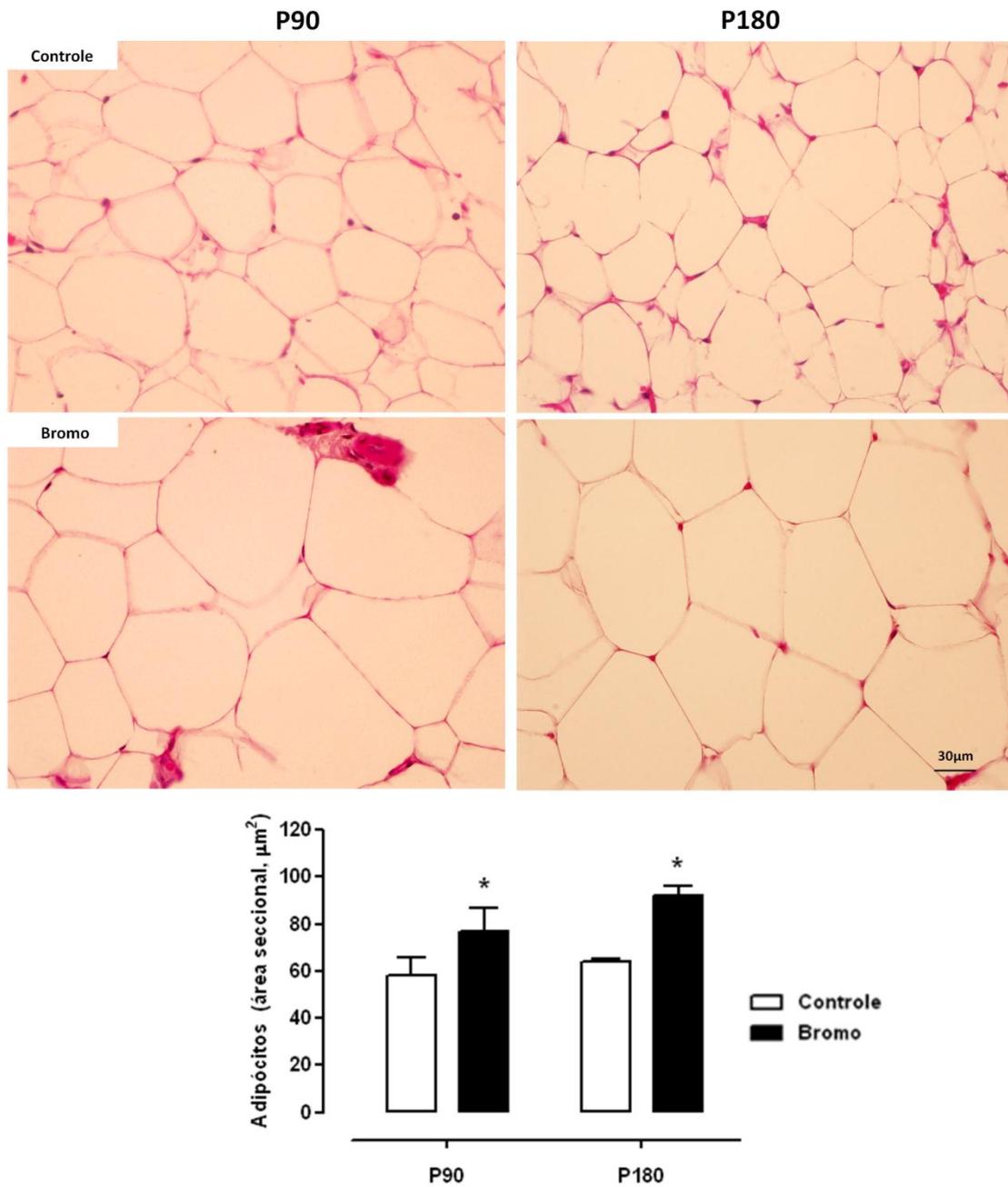
Nota: Valores expressos como média \pm EPM (n=5). * $P < 0,05$.

Figura 7 - Quantificação da MGV em P90 e P180



Nota: Valores expressos como média \pm EPM (n=5). * $P < 0,05$.

Figura 8 - Morfometria do tecido adiposo visceral



Nota: Gordura retroperitoneal em P90 e P180. Fotomicrografias de mesmo aumento (objetiva de 40x), coradas em HE. Valores expressos como média \pm EPM (n=5). *P<0,05.

4.2 Avaliação do perfil metabólico

Não foram encontradas diferenças quanto à glicemia de jejum nos animais em P90 (tabela 4). Contudo, nesta idade, constatou-se através do TOTG, um aumento da área sob a curva (+10%) no grupo bromo, indicando uma intolerância à glicose (figura 9). Em contrapartida, em P180 não foram encontradas diferenças quanto à glicemia de jejum (tabela 4) e curva glicêmica (figura 9).

Quanto à insulina plasmática, o presente estudo mostrou que em P90 os animais do grupo bromo ainda não apresentam alteração na insulinemia, bem como, na avaliação do índice HOMA-IR. Entretanto, como esperado, em P180, este grupo passa a apresentar uma hiperinsulinemia de jejum (+27%) e uma elevação no índice HOMA-IR (+30%), caracterizando de fato, o início do quadro de resistência insulínica (tabela 4).

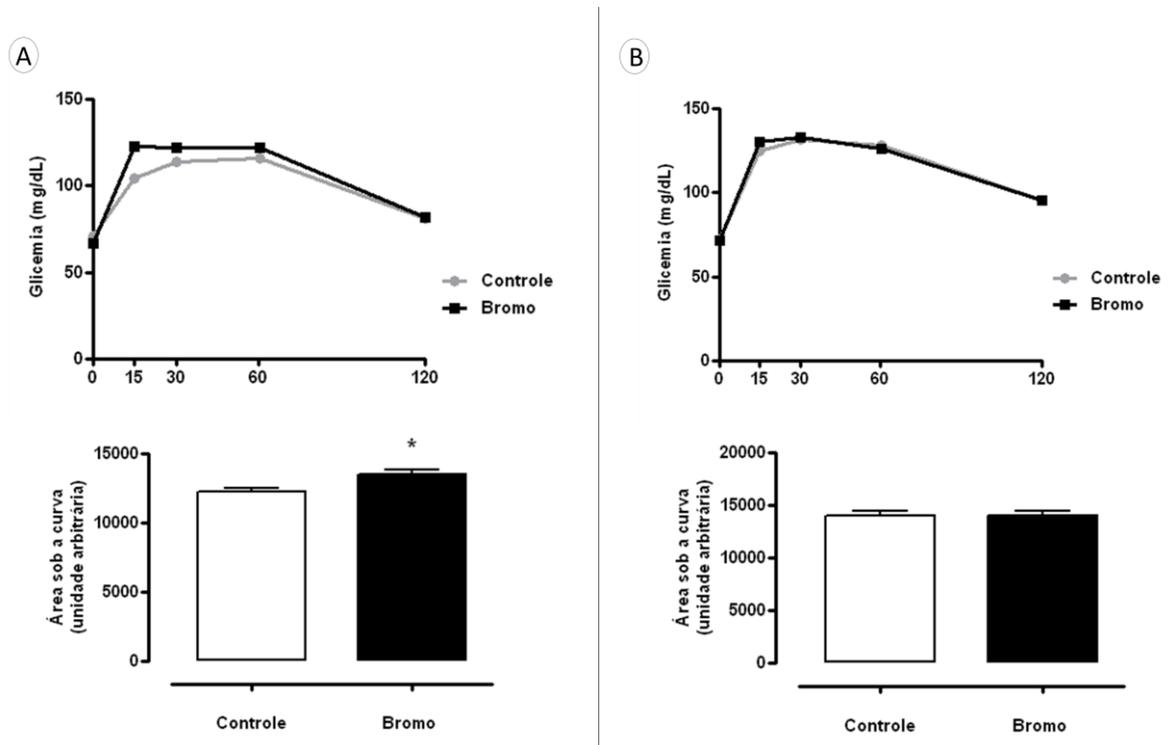
Na avaliação do perfil lipídico, o grupo bromo apresentou uma hipertrigliceridemia (+52%) somente em P180 (tabela 4).

Tabela 4 - Perfil metabólico em P90 e P180

	P90		P180	
	Controle	Bromo	Controle	Bromo
Glicemia de jejum (mg/dL)	70 ± 1,59	69 ± 2,65	74 ± 4,92	68 ± 2,11
Insulina plasmática (μUI/mL)	31,01 ± 1,87	35,24 ± 2,66	35,79 ± 2,97	45,57 ± 2,43*
HOMA-IR	5,38 ± 0,32	6,01 ± 0,61	5,94 ± 0,46	7,77 ± 0,56*
TG plasmático (mg/dL)	51,0 ± 3,35	61,8 ± 3,97	55,8 ± 2,35	85,1 ± 10,79*

Nota: Valores expressos como média ± EPM (n=5). TG: Triglicerídeo. * $P < 0,05$.

Figura 9 - Avaliação da curva glicêmica pelo TOTG em P90 e P180



Legenda: Evolução da glicemia ao TOTG e área sob a curva em P90 (A) e P180 (B).

Nota: Valores expressos como média \pm EPM (n=5). * $P < 0,05$.

4.3 Análise das alterações hepáticas

Não foram encontradas diferenças na massa e/ou volume hepático, assim como, no conteúdo de glicogênio e enzimas hepáticas no plasma entre os grupos em nenhuma das idades avaliadas (tabela 5). Somente foi observado um aumento no conteúdo de TG em P180 (+51%) no grupo bromo. Contudo, não foram encontradas quaisquer alterações morfológicas entre os grupos avaliados em ambos os períodos (P90 e P180) (figura 10).

Tabela 5 - Avaliações teciduais e plasmáticas referentes as alterações hepáticas

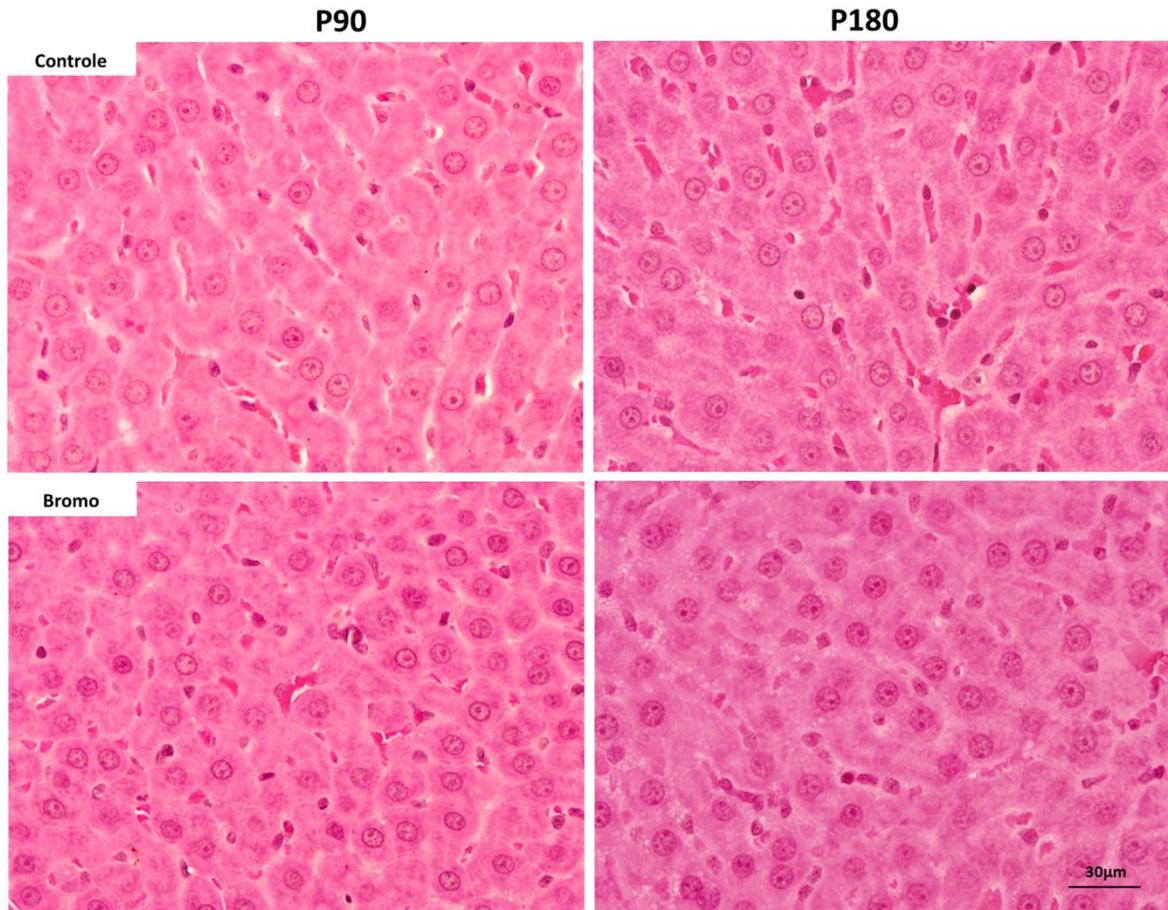
	P90		P180	
	Controle	Bromo	Controle	Bromo
Massa do fígado corrigida (g/mm)	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Glicogênio (mM/g)	3,10 ± 0,89	3,41 ± 0,38	2,07 ± 0,69	2,01 ± 0,19
TG (mg/dL)/mg	1,56 ± 0,16	1,72 ± 0,32	1,68 ± 0,14	2,54 ± 0,31*
AST (U/L)	190,4 ± 29,34	188,0 ± 16,25	244,6 ± 18,66	281,2 ± 9,83
ALT (U/L)	75,60 ± 1,94	67,40 ± 4,72	75,40 ± 5,89	83,40 ± 5,09

Nota: Valores expressos como média ± EPM (n=5). A massa do fígado foi corrigida pelo comprimento da tíbia.

TG: triglicerídeo; AST: enzima aspartato aminotransferase; ALT: enzima alanina aminotransferase.

* $P < 0,05$.

Figura 10 - Histologia hepática em P90 e P180



Nota: Fotomicrografias hepáticas de mesmo aumento (objetiva de 60x), coradas em HE. As imagens não demonstram qualquer alteração significativa entre os grupos analisados (análise qualitativa).

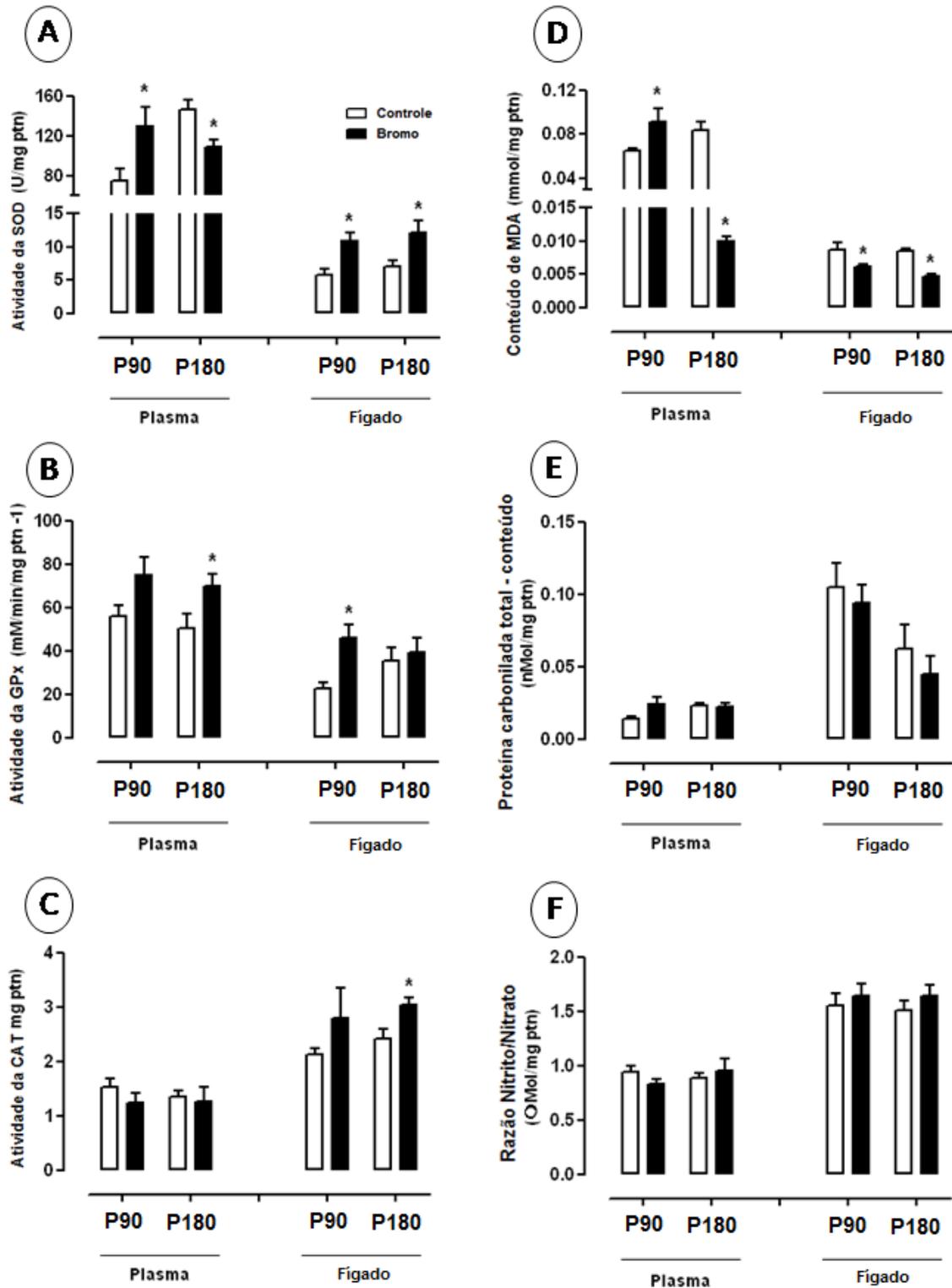
4.4 *Status* redox e avaliação de SIRT-1 hepática

Quanto às avaliações plasmáticas, o grupo bromo apresentou um aumento da atividade de SOD (+72%), associado a um aumento no quantitativo de MDA (+41%) e tendência ao aumento da atividade de GPx ($P=0,083$) e conteúdo de proteínas carboniladas ($P=0,077$) em P90. Já em P180, o grupo passou a apresentar uma redução da atividade de SOD (-25%), aumento da atividade de GPx (+38%) e redução do conteúdo de MDA (-88%) (figura 11).

Nas avaliações do tecido hepático, os animais bromo apresentaram um aumento da atividade de SOD tanto em P90 quanto em P180 (+88% e +72%, respectivamente), maior atividade de GPX em P90 (+102%) e CAT em P180 (+25%). Estas condições associam-se a uma redução do conteúdo de MDA em ambos os períodos estudados (-30% em P90 e -44% em P180). O conteúdo de nitrito/nitrato do grupo bromo foi similar ao grupo controle em ambos os tempos (figura 11).

As análises de western blotting, no tecido hepático, para as enzimas antioxidantes (SOD-1, SOD-2, CAT e GPx) e para a proteína correspondente à avaliação da peroxidação lipídica (4-HNE) não foram diferentes entre os grupos em qualquer período de análise (figura 12).

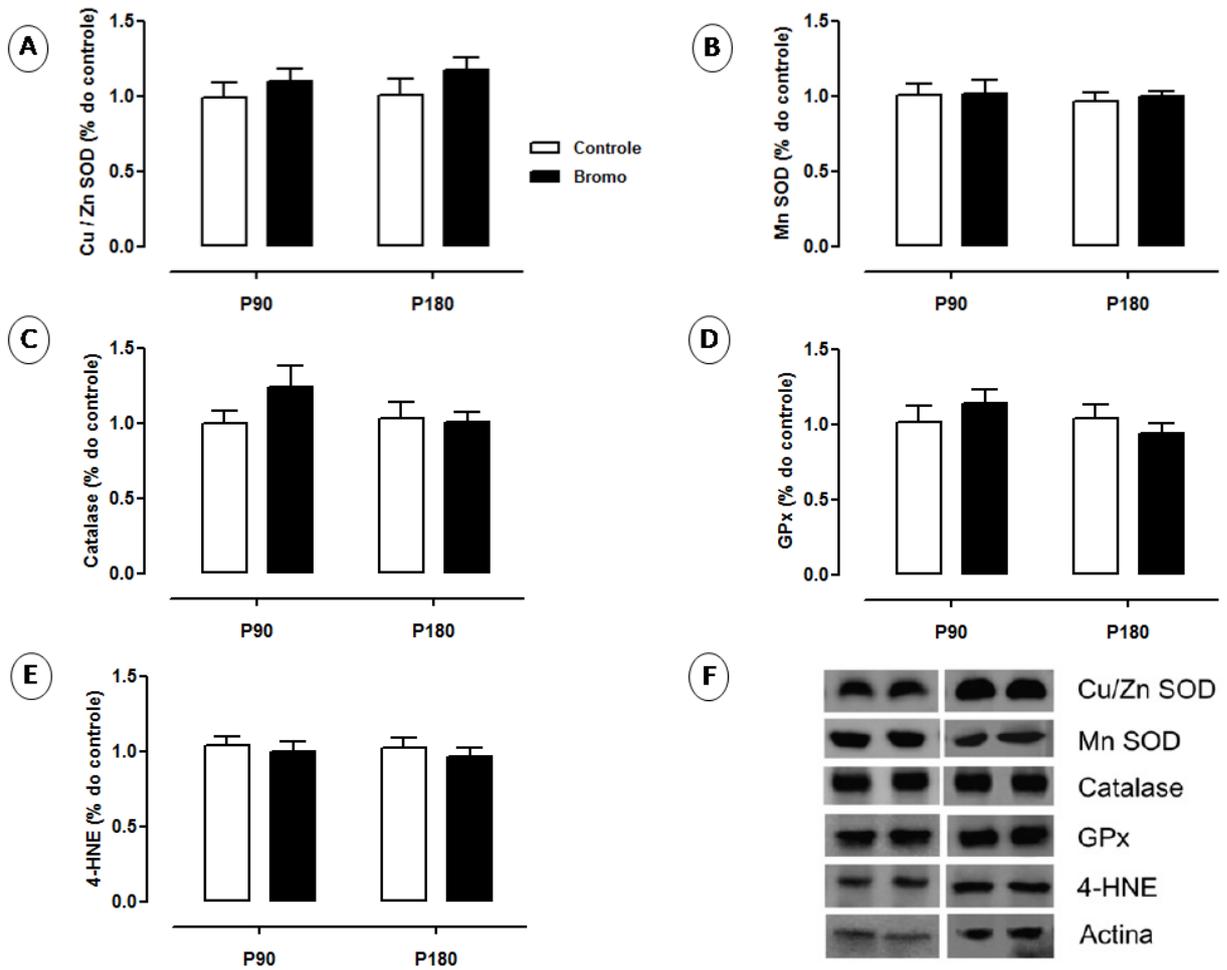
O presente estudo encontrou uma elevada expressão de SIRT-1 hepática nos animais bromo em P90 e uma leve tendência a sua redução em P180 (figura 13).

Figura 11 - *Status* redox no plasma e tecido hepático em P90 e P180

Legenda: Atividade da SOD (A); atividade da GPx (B); atividade da CAT (C); Conteúdo de MDA (D); Conteúdo de proteínas carboniladas total (E) e razão nitrito/nitrato (F). SOD - Superóxido dismutase; GPx - Glutathione peroxidase; CAT - Catalase; MDA - Malondialdeído.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM (n=5). * $P < 0,05$.

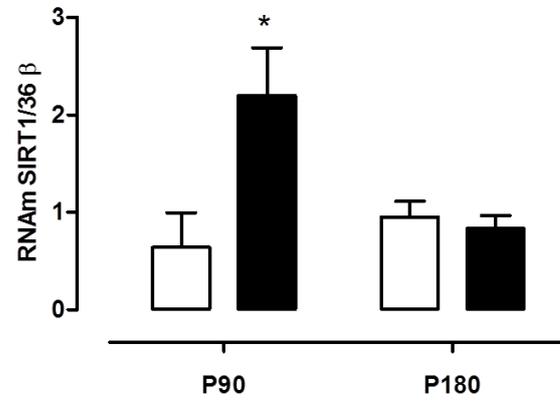
Figura 12 - Quantificação proteica no tecido hepático por western blotting



Legenda: SOD-1 (A); SOD-2 (B); CAT (C); GPx (D); 4-HNE (E) e demonstrativo das bandas imuno-marcadas (F). SOD - Superóxido dismutase; GPx - Glutathiona peroxidase; 4-HNE - 4-hidroxinonanal.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM (n=5). * $P < 0,05$.

Figura 13 - Expressão hepática (RNAm) de SIRT-1 por RT-PCR em P90 e P180



Legenda: SIRT-1 - Sirtuína-1.

Nota: Valores expressos como média ± EPM (n=5). * $P < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

No intuito de verificar os potenciais de risco do desmame precoce como um fator causal do processo de programação, diversos protocolos experimentais, tais como a privação materna ou interrupção física do aleitamento materno, vêm sendo desenvolvidos a fim de mimetizar este possível *imprinting* metabólico. Contudo, cabe ressaltar que seja no primeiro modelo ou no segundo deparamo-nos com limitações pontuais. Afinal, no protocolo de privação materna evidenciamos um possível viés condizente com o estresse promovido pela falta do contato materno. Já no desmame físico, o aleitamento materno é bruscamente interrompido não havendo um período de transição para a ingestão completa de alimentos sólidos.

Em contrapartida, o desmame farmacológico, com o uso da bromocriptina, foi desenvolvido com o objetivo de produzir uma redução dos níveis séricos maternos de prolactina, proporcionando conseqüentemente, uma menor oferta de leite (Bonomo et al., 2005; Bonomo et al., 2007). Esta manipulação perfaz uma transição gradativa da alimentação, capaz de preservar o contato materno, tornando-a mais comparável ao processo que ocorre nos seres humanos. Entretanto, uma possível limitação deste modelo experimental está no fato de que a bromocriptina é uma droga capaz de ser transferida pelo leite materno, apesar de não exercer qualquer efeito sobre o nível sérico de prolactina nos filhotes ao desmame (de Moura et al., 2009).

A literatura demonstra que a bromocriptina pode exercer um importante efeito antioxidante (Yoshikawa et al., 1994), reduzindo tanto a peroxidação lipídica (Kline et al., 2004) quanto a hiperfagia em ratos adultos e obesos, levando a uma melhora da composição corporal e glicemia (Davis et al., 2009).

Pesquisadores demonstraram que um tratamento de 10 mg/Kg de peso corporal de bromocriptina, durante 4 semanas, mostrou-se efetivo no tratamento da esteatose hepática em ratos obesos em função de sua predisposição genética (cepa Zucker) (Davis et al., 2006). A justificativa levantada para tais achados recaiu sobre as propriedades antioxidantes do fármaco, pois demonstrou-se através da técnica de imunohistoquímica, um aumento da MnSOD, revelando-se portanto, como uma condição chave para a melhoria histológica.

Em roedores, testes com diferentes doses de bromocriptina para o tratamento do estresse oxidativo induzido pelo álcool constataram que a dose de 12,5 mg/Kg de peso

corporal (a menor utilizada no estudo) foi eficaz na melhora de parâmetros hepáticos relacionado-os ao sistema antioxidante (Popovic et al., 2008).

Sendo assim, o uso da bromocriptina para o estabelecimento do modelo experimental de desmame precoce pode se configurar como um agente multifatorial que pode não se restringir somente a inibição da produção de leite materno, mas também como um regulador do *status* redox, da adipogênese, e da homeostase glicêmica, justificado por seus efeitos antioxidantes, anti-obesogênicos e anti-diabetogênicos descritos na literatura.

Nossos resultados demonstraram uma condição similar de controle do *status* redox e da proteção hepática, pois proles adultas oriundas de mães que foram tratadas com bromocriptina ao fim da lactação, apresentaram melhor controle do estresse oxidativo e preservação do tecido hepático, mesmo diante do quadro de obesidade e das desordens metabólicas previstas. Assim, a bromocriptina pode apresentar uma característica de *imprinting* específica não encontrada em outros modelos de desmame precoce.

Os resultados do presente estudo corroboram antigos achados deste modelo de programação, demonstrando que o desmame precoce contribui para o aumento da adiposidade visceral (de Moura et al., 2009) associando-se a uma hipertrofia de adipócitos tanto em P90 quanto em P180. Neste caso, pode-se considerar que a condição de desnutrição durante um período crítico de desenvolvimento como a lactação, sobrepõe-se aos possíveis efeitos benéficos da bromocriptina na composição corporal. Sabe-se que a hipertrofia de células adiposas configura-se como um mecanismo chave para o cenário fisiopatológico existente entre a obesidade e o *diabetes mellitus* através da secreção de adipocinas capazes de desregular e favorecer a liberação de ácidos graxos livres, que contribuem grandemente, para a instalação da resistência insulínica (Dunmore & Brown, 2013). Através dos nossos dados de glicemia de jejum, TOTG e insulinemia, sugerimos que os animais do grupo bromo encontram-se em um estágio pré-diabético, no qual a aparente normalização da curva glicêmica em P180 decorre de uma hiperinsulinemia compensatória, favorecendo a condição de resistência insulínica, identificada através do índice HOMA-IR.

Quanto aos dados referentes ao balanço redox plasmático observamos que já ocorre uma tentativa de minimizar os danos do estresse oxidativo em P90 onde apesar disto ocorre um aumento de MDA, tornando-se efetivo em P180 onde há uma redução deste marcador. Consideramos que quando mais novos, a alteração da homeostase glicêmica nos animais bromo contribui para a produção excessiva de EROs (Kassab & Piwowar, 2012), desencadeando um aumento compensatório da atividade da SOD e uma tendência ao aumento da atividade de GPx com o objetivo de minimizar a formação de MDA e a carbonilação de

proteínas. Já em idade mais avançada, o aumento da atividade de GPx é capaz de compensar a reduzida atividade de SOD. Paradoxalmente, a menor atividade de SOD pode também contribuir para a redução da peroxidação lipídica, uma vez que teríamos a menor formação de peróxido de hidrogênio derivado da dismutação do ânion superóxido promovido por esta enzima (Kar et al., 2012).

Em estudo prévio com o mesmo desenho experimental e desenvolvido pelo nosso laboratório, constatou-se um aumento do estresse oxidativo plasmático associado a uma reduzida capacidade antioxidante total (analisado através da redução de DPPH) nos animais bromo em P90. Em P180, esta condição foi aparentemente melhorada (Casimiro-Lopes et. al, 2012). No presente estudo, realizamos a avaliação de diferentes biomarcadores do estresse oxidativo, e complementamos as análises com a avaliação do estresse oxidativo hepático. Adicionalmente, o estudo dos diferentes componentes que compõem o sistema antioxidante em diferentes tempos, permitiu-nos, pela primeira vez, descrever a sequencia de eventos.

Deste modo, a alteração na adiposidade e na homeostase da glicose aumenta o estresse oxidativo, o que desencadeia uma resposta adaptativa representada por maior atividade antioxidante, capaz inclusive, de corrigir a peroxidação lipídica em particular no fígado. Tais considerações não se baseiam somente no método de TBARS, que reconhecidamente, apresenta determinadas limitações, mas baseamo-nos numa avaliação complementar do marcador 4-HNE.

O resultado da morfologia hepática em P180 não demonstrou qualquer alteração nos animais bromo, apesar da elevação do conteúdo de triglicerídeos, constatado através de ensaio bioquímico. Consideramos assim, que neste momento a elevação dos triglicérides não foi suficientemente capaz de promover as alterações histológicas. Este resultado difere das avaliações realizadas no modelo de desmame precoce não farmacológico (Franco et al., 2013), no qual os animais programados apresentam, na idade adulta, um quadro de microesteatose hepática e aumento do conteúdo de MDA com concomitante redução da capacidade antioxidante no plasma (atividade da SOD) e no fígado (atividade da GPx). Curiosamente, estes animais quando submetidos ao tratamento com resveratrol, um componente bioativo com propriedades antioxidantes, passam a apresentar uma reversão do estresse oxidativo e lesão hepática (Franco et al., 2013).

Nossos resultados evidenciam uma melhora do *status* redox, e conseqüentemente, uma redução do conteúdo de MDA resultante da modulação do sistema antioxidante, tanto no plasma quanto no fígado (atividade de SOD e GPx em P90 e SOD em P180). Especificamente no fígado, podemos considerar que tais resultados também tenham sido influenciados pelo

aumento da SIRT-1, capaz de inibir as vias para a fisiopatologia da doença não alcoólica do fígado gorduroso e o estresse oxidativo (Kaeberlein et al., 2005).

O aumento da expressão de mRNA para SIRT-1 no tecido hepático em P90, configura-se como uma importante condição que promove o aumento da capacidade antioxidante e, conseqüentemente, se configura como uma proteção hepática quanto aos danos promovidos pela programação. Sugerimos que elevados níveis de SIRT-1 também poderiam ser encontrados em idades mais precoces, contudo experimentos adicionais deverão ser realizados a fim de confirmar tal hipótese.

Embora, nossos resultados não tenham evidenciado qualquer alteração histológica no fígado dos animais bromo aos 180 dias de vida, cabe ressaltar que os dados referentes a expressão de SIRT-1 apresentaram um declínio com o passar do tempo. Assim, a redução da expressão de SIRT-1 contribui para o entendimento de uma série de alterações metabólicas desfavoráveis encontradas nesta idade, como a resistência insulínica, o aumento do conteúdo de triglicerídeo hepático, e a menor atividade plasmática da SOD. Muito provavelmente, estes distúrbios metabólicos continuariam a se desenvolver com o envelhecimento dos animais.

Portanto, através deste experimento observamos que os efeitos de programação pelo desmame precoce farmacológico, capaz de induzir a subnutrição neonatal, produz importantes efeitos a longo prazo característicos da obesidade e suas co-morbidades. No entanto, os resultados encontrados no presente estudo evidenciaram uma melhora no *status* redox e proteção a doença não alcoólica do fígado gorduroso através da SIRT-1. Tais observações servem como base para estudos adicionais no intuito de melhor compreendermos os efeitos da bromocriptina durante períodos críticos de plasticidade, assim como, dos seus potenciais efeitos terapêuticos na prevenção de doenças.

6 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

6.1 Relevância do estudo e objetivo geral

No estudo anterior, deparamo-nos com resultados que nos levam a considerar que o uso da bromocriptina para a obtenção de um modelo de desmame precoce pode não ser ideal, uma vez que outras ações além da interrupção da produção de leite pode se apresentar como fatores de confusão, tais como: 1. a desnutrição causada pela diminuição do leite; 2. A diminuição da prolactina materna, visto que no filhote não houve alteração deste hormônio (Bonomo et al., 2005; deMoura et al., 2009) e 3. efeito direto da bromocriptina. Sua possível transferência pelo leite materno poderia desencadear respostas de atenuação em desajustes específicos do *status* redox, ressaltando assim, uma característica benéfica da droga, fundamentada em seu potencial antioxidante, que aos poucos vêm sendo mais explorado na comunidade científica (Lim et al., 2008; 2009)

Assim, pautados nos resultados anteriores e cientes de que animais programados pelo desmame precoce sem um interferente farmacológico apresentam uma pior condição do estresse oxidativo e lesão hepática (Franco et al., 2013), este novo estudo tem por objetivo isolar os possíveis efeitos da bromocriptina na programação do metabolismo quanto aos parâmetros de adiposidade e histologia hepática na idade adulta (P120 e P200). Sendo assim, utilizamos um desenho experimental cujos filhotes machos de ratos foram submetidos a uma interrupção precoce do aleitamento materno (desmame não-farmacológico – bandagem adesiva no corpo materno) e tratados diretamente com a bromocriptina do 18º dia de vida ao desmame (21º dia).

Adicionalmente, durante a fase adulta (P130), parte dos animais que compõem os grupos experimentais foi submetida a uma dieta hiperlipídica no intuito de verificarmos se os possíveis benefícios da bromocriptina perduram frente a um novo agravo metabólico.

Face as diferentes avaliações ao que o estudo se propõe, ressaltamos que os resultados estão expressos como dois distintos experimentos:

Experimento 1: Efeitos do tratamento neonatal com bromocriptina na composição corporal, no perfil metabólico e alterações hepáticas de animais programados pelo desmame precoce não-farmacológico.

Experimento 2: Avaliação dos possíveis efeitos deletérios de uma dieta hiperlipídica em animais programados pelo desmame precoce não-farmacológico e tratados com bromocriptina no período neonatal.

6.2 Objetivos específicos

- a) Acompanhamento da massa corporal (MC), comprimento naso-anal (CNA), composição corporal, ingestão, eficiência e comportamento alimentar;
- b) Avaliação do perfil glicídico: glicemia de jejum, curva glicêmica, hemoglobina glicosilada, insulinemia, sensibilidade insulínica;
- c) Avaliação da leptinemia;
- d) Verificação do conteúdo de triglicerídeos e colesterol hepático;
- e) Quantificação proteica dos componentes enzimáticos do sistema antioxidante (SOD, CAT e GPx) e metabólitos indicativos do estresse oxidativo (peroxidação lipídica - 4-HNE e oxidação proteica - nitrotirosina);
- f) Estudo da morfologia do fígado e tecido adiposo visceral (gordura retroperitoneal).

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Protocolo experimental

Todos os animais utilizados foram mantidos em biotério sob temperatura (21-23°C) e ciclo claro-escuro (7:00 - 19:00h) controlados, com livre acesso à água e ração. Os experimentos descritos a seguir foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA/008/2014).

7.2 Desenho experimental

Ratas Wistar nulíparas de 3 meses de idade foram acasaladas com machos matrizes (proporção 2:1 fêmeas/macho) e acondicionadas em caixas individuais. Após o parto espontâneo, conferiu-se o tamanho da ninhada, peso dos filhotes e a diferenciação quanto ao gênero através da distância ânus-genital. A partir de então, ajustou-se o tamanho da ninhada para 6 filhotes machos por rata lactante, no intuito de padronizar o suprimento de alimento e maximizar o potencial lactotrófico.

As ninhadas foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

Grupo Desmame Precoce (DP) (n de ninhadas = 10): Filhotes submetidos a uma interrupção precoce do aleitamento materno como resultado da aplicação de bandagem adesiva ao redor do corpo da mãe, capaz de interromper o fornecimento de leite materno ao final do 17º dia de lactação até o desmame (21 dias de vida);

Grupo Desmame Precoce + Bromocriptina (DP/BRO) (n de ninhadas = 10): Filhotes submetidos a interrupção da lactação (bandagem materna ao final do 17º dia de lactação) e que foram tratados intraperitonealmente com bromocriptina (Parlodel[®], Novartis, São Paulo, SP, Brasil) na dose de 4mg/kg de peso corporal/dia, diluída em uma solução de metanol-salina (1:1 v/v) do 18º dia da lactação até o desmame;

Grupo Controle (C) (n de ninhadas = 10): Filhotes amamentados livremente durante toda a lactação;

Grupo Controle + Bromocriptina (C/BRO) (n de ninhadas = 11): Filhotes amamentados livremente e que foram tratados intraperitonealmente com bromocriptina (Parlodel[®], Novartis, São Paulo, SP, Brasil) na dose de 4mg/kg de peso corporal/dia, diluída em uma solução de metanol-salina (1:1 v/v) do 18º dia da lactação até o desmame.

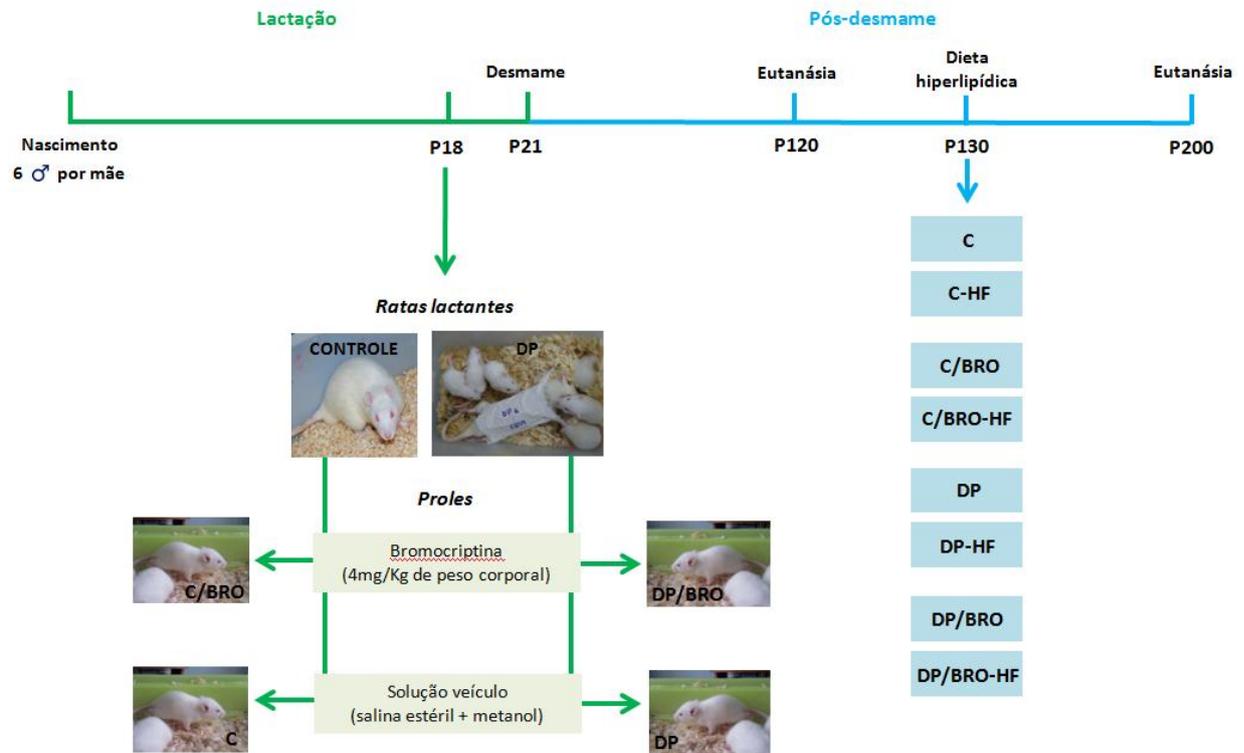
Todas as ninhadas do grupo DP e C, por não receberem o fármaco, foram submetidas a tratamento com solução veículo (metanol-salina - 1:1 v/v), intraperitonealmente com mesmo volume e período de tempo, para descartar qualquer efeito do próprio veículo e para simular o estresse causado durante a manipulação.

Após o desmame, os filhotes passaram a receber dieta comercial padrão para roedor (Nuvilab[®], Sogorb, São Paulo, SP, Brasil), sendo acompanhados até o dia do sacrifício, que ocorreu em P120 e P200.

7.2.1 Experimento 2

Os grupos experimentais estabelecidos na lactação (C; C/BRO; DP; DP/BRO) submetidos a dieta comercial padrão para roedor (Nuvilab[®], Sogorb, São Paulo, SP, Brasil) desde o desmame, foram subdivididos aos 130 dias de vida (P130), fazendo com que parte dos animais recebesse dieta hiperlipídica (tabela 6), constituindo assim, os novos grupos experimentais: **C-HF; C/BRO-HF; DP-HF; DP/BRO-HF**. Assim como no experimento 1, os animais foram igualmente acompanhados até P200.

Figura 14 - Representação esquemática do experimento 1 e 2



Tabelas 6 - Descrição nutricional das dietas experimentais

Ração padrão Nuvilab ®	Qtd	CHO	PTN	LIP
Ração padrão (g)	1000	660	220	40
Kcal / 1000g	3880	2640	880	360
%Kcal		68.0	22.7	9.3
Ração hiperlipídica	Qtd	CHO	PTN	LIP
Ração padrão (g)	600	396	132	24
Extrato de soja integral (g)	200	52	87	42
Banha (g)	200	0	0	200
Leite condensado (g)	198	109	14	16
TOTAL (g)	1198	557	233	282
TOTAL (g) / 1000g		465	194	235
Kcal / 1000g	4751	1860	776	2115
%Kcal		39.1	16.3	44.5

7.3 Dados biométricos (massa corporal e comprimento naso-anal)

Na lactação, a MC e o CNA foram aferidos a cada três dias e no pós-desmame tais parâmetros foram verificados a cada 4 dias com instrumento acurado e dimensionado ao tamanho dos animais (balança digital e fita métrica).

7.4 Controle da ingestão alimentar: dados absolutos, eficiência alimentar e avaliação do comportamento alimentar

Após o desmame, a ingestão alimentar absoluta foi verificada a cada 4 dias conforme descrição anterior (página 40). A razão entre a ingestão de energia consumida e o ganho de MC, denominada eficiência alimentar, também foi avaliada como um indicativo metabólico da facilidade com que o consumo energético é convertido em peso corpóreo (Roberts et. al, 2002).

Nas idades de P120 e P180 realizou-se a avaliação do comportamento alimentar através de um desafio com a dieta hiperlipídica, possibilitando-nos a aferição do consumo de uma ração com maior palatabilidade em dois diferentes tempos. O teste iniciou-se com a submissão dos animais a um período de 12 h de jejum no ciclo claro, permitindo, portanto, a realização dos testes no ciclo escuro, onde os animais apresentam maior atividade. Para verificarmos a voracidade alimentar, ofertou-se 200 g de ração hiperlipídica a cada gaiola (composta por 4 animais) para um livre consumo da ração pelo tempo de 30 minutos, recolhendo-se então, o quantitativo de ração restante após este período. Em seguida, para avaliarmos a compulsão dos animais frente a esta dieta diferenciada, ofertou-se uma quantidade regular (cerca de 800g) de ração as mesmas gaiolas, para o livre consumo durante 12h, onde novamente, fez-se a aferição do quantitativo de ração restante. A ingestão alimentar em ambos períodos foi equalizada pelo número de animais na gaiola.

7.5 Coleta dos tecidos

Em P120 e P200, os animais, após jejum de 12 horas (20:00 – 08:00h), foram anestesiados com cloridrato de ketamina (80mg/Kg) e cloridrato de xilazina (60mg/Kg) na proporção de 2:1 e submetidos a exsanguinação através de punção cardíaca, coletando-se o sangue em tubo com anticoagulante (EDTA). O plasma foi obtido por centrifugação (2.500 rpm, 25 minutos, 4°C) e estocado individualmente a -20°C para diferentes dosagens.

O fígado, assim como as gorduras retroperitoneal, epididimária e mesentérica (MGV) foram dissecados, pesados e armazenados (congelamento a -80°C ou solução de fixador histológico) para a realização dos diferentes procedimentos. Especificamente no tecido adiposo foram coletadas alíquotas similares para que não houvesse o comprometimento na determinação da composição corporal.

7.6 Avaliação da composição corporal – método da carcaça

Ao sacrifício, as carcaças foram coletadas para a determinação do conteúdo de gordura e proteína corporal total. Sendo assim, após a coleta dos tecidos de interesse, os animais foram eviscerados e suas carcaças juntamente com a gordura visceral foram autoclavadas por 1h à 134°C, e seguindo para uma homogeneização com água destilada na razão de 1:1 em liquidificador industrial (Leshner et al, 1972).

Para a avaliação do conteúdo lipídico, 3 g do homogenato foram misturados em 3 mL de KOH 30% em banho-maria a 70°C sob agitação por 15 min. Em seguida, foi adicionado 3 mL de etanol absoluto, e contínuo repouso no banho por 2 h. O homogenato foi acidificado em 2,5 mL de ácido sulfúrico 6M e agitado rapidamente no vórtex. Após, foram realizadas 3 lavagens sucessivas com 8, 6 e 4 mL de éter de petróleo por 10 minutos sob agitação e centrifugação à 1.000 rpm. O sobrenadante das 3 lavagens foi colocado em tubo Falcon de peso conhecido onde foi adicionado 2 mL de água destilada para a formação de uma solução bifásica. A fase inferior foi desprezada (porção hidrofílica da carcaça) e a fase superior, com o éter e a gordura, foi colocada destampada em capela de exaustão até que o éter evapore, restando somente o conteúdo lipídico. O tubo foi pesado a cada 3 dias até que seu peso

permanecesse constante. O peso de gordura foi expresso em g de gordura/100 g de carcaça (Stansbie et al., 1976).

A análise da proteína corporal total foi feita a partir de 1g do homogenato, que foi colocado em 10 mL de KOH 0,6N à 37°C por 1 h. Seguido de uma centrifugação (2.000 rpm, 10 minutos), a concentração de proteína foi determinada por ensaio colorimétrico com BSA como padrão. O valor foi expresso por g de proteína/100g de carcaça (Lowry et al., 1951).

7.7 Avaliação do perfil glicídico

Nas idades de P120 e P180 realizou-se o TOTG, conforme descrição anterior (página 41).

Em P21 realizou-se a aferição da glicemia, após 2 h de jejum, através do sangue caudal com auxílio de fitas reagentes e glicosímetro (Accu-chekAdvantage, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha). Este parâmetro também foi avaliado ao sacrifício (P120 e P200), entretanto após jejum de 12 h.

Em amostras de sangue, não centrifugado, realizou-se o ensaio de hemoglobina glicosilada com kit comercial (INLAB Diagnóstica, Diadema, SP, Brasil) e auxílio de espectrofotômetro segundo as instruções do fabricante.

A insulina plasmática foi avaliada por radioimunoensaio (ICN Pharmaceuticals, Orangeburg, NY, EUA) e a avaliação da sensibilidade insulínica baseou-se no índice HOMA-IR. Ambos procedimentos foram realizados conforme descrição anterior (página 42).

7.8 Dosagem de leptina plasmática

A leptinemia foi analisada por ELISA (Millipore, St. Charles, MO, EUA) conforme instrução dos fabricantes com coeficiente de variação intra-ensaio foi de 1,9 - 2,5% e limite de sensibilidade de 0,04 ng/mL. Adicionalmente, avaliou-se a razão da leptinemia (ng/mL) e o % de gordura corporal total.

7.9 Dosagem hepática de triglicerídeo e colesterol

Amostras de 50mg de fígado foram homogeneizadas em 1 mL de isopropanol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e centrifugadas (5.900 rpm, 10 minutos, 4°C). O total de triglicerídeos e colesterol foi mensurado a partir de ensaio colorimétrico utilizando kit comercial (Bioclin[®], Belo Horizonte, MG, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante.

7.10 Análises histológicas do fígado e do tecido adiposo visceral

7.10.1 Processamento histológico e morfometria do tecido adiposo

Amostras de tecido adiposo retroperitoneal (P120 e P200) foram fixadas em Formalina de Millong, processadas, coradas em HE e analisadas através de microscopia de luz conforme protocolo anteriormente descrito (páginas 43 e 44).

7.11 Análise do conteúdo proteico por Western Blotting – Avaliação hepática de SOD-1, SOD-2, catalase, GPx, 4-HNE e nitrotirosina

Amostras de fígado de P200 foram processadas para a realização da quantificação proteica de enzimas do sistema antioxidante e marcadores do estresse oxidativo. O procedimento, bem como a utilização dos anticorpos, foi realizado conforme descrição anterior (páginas 46-48). Adicionalmente, realizou-se a marcação de nitrotirosina utilizando o anticorpo primário (anti-Nitrotirosina, mouse polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), na diluição de (1:500) seguido da incubação com anticorpo secundário (Donkey anti-mouse IgG - 1:5000).

7.12 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), sendo analisados por two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni no intuito de avaliarmos a interação entre os fatores: desmame precoce e uso da bromocriptina. Quando necessário, utilizou-se o one-way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls. Especificamente na avaliação dos animais submetidos a dietas diferenciadas (padrão vs hiperlipídica), realizou-se o teste *t-Student* não pareado. Todas as análises foram realizadas com auxílio do *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA) onde considerou-se um $P < 0,05$ como valor estatisticamente significativo.

8 RESULTADOS

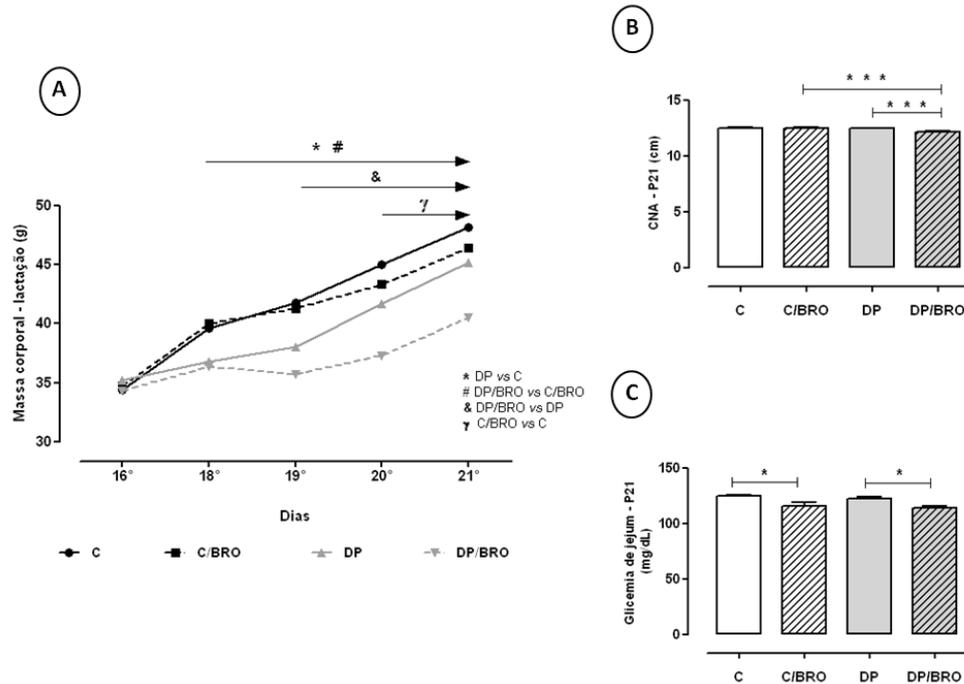
8.1 Desenvolvimento neonatal - janela crítica do desenvolvimento

Durante a lactação, a prole DP apresentou redução da MC comparada aos animais C desde P18 até P21, fato este, que também foi constatado entre os grupos tratados com bromocriptina e que diferiam apenas quanto ao aleitamento materno, onde o grupo DP/BRO exibiu menor MC que a prole C/BRO, tornando-se similar a prole DP. Já em P19, o grupo DP/BRO apresentou uma acentuada redução de MC tornando-se, inclusive, diferente do grupo DP, permanecendo desta forma até P21. Apenas em P20, a prole C/BRO apresentou diminuição de MC comparada ao grupo C (figura 15). Em P21, observamos uma interação entre os fatores desmame precoce e o uso da bromocriptina, onde a condição de aleitamento provou ser o fator mais preponderante para as alterações biométricas apresentadas ($F=9,21$; $gl=1/252$; $P=0,0027$; two-way ANOVA), destacando um cenário representado por: C/BRO vs C: -4,3%; DP vs C: -6,2% ; DP/BRO vs C/BRO: -12,7% e DP/BRO vs DP: -10,3% (figura 15).

A mesma interação também pôde ser evidenciada no CNA e ressaltou a condição do desmame ser novamente o fator de maior influência nos resultados de redução deste parâmetro ($F= 8,05$; $gl= 1/246$; $P=0,0049$; two-way ANOVA). A prole DP/BRO demonstrou menor CNA comparada as proles DP (-2,2%); C/BRO (-2,9%) (figura 15).

Quanto a glicemia de jejum em P21, os grupos tratados com bromocriptina apresentaram menor glicemia comparado ao seus respectivos grupos tratados com solução veículo (C/BRO vs C: -7,4% e DP/BRO vs DP: -6,7%) (figura 15).

Figura 15 - Dados biométricos e glicemia no período neonatal



Legenda: Evolução da massa corporal durante a lactação (A); CNA em P21 (B); glicemia plasmática após 2h de jejum em P21 (C). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina; **CNA**: comprimento naso-anal.

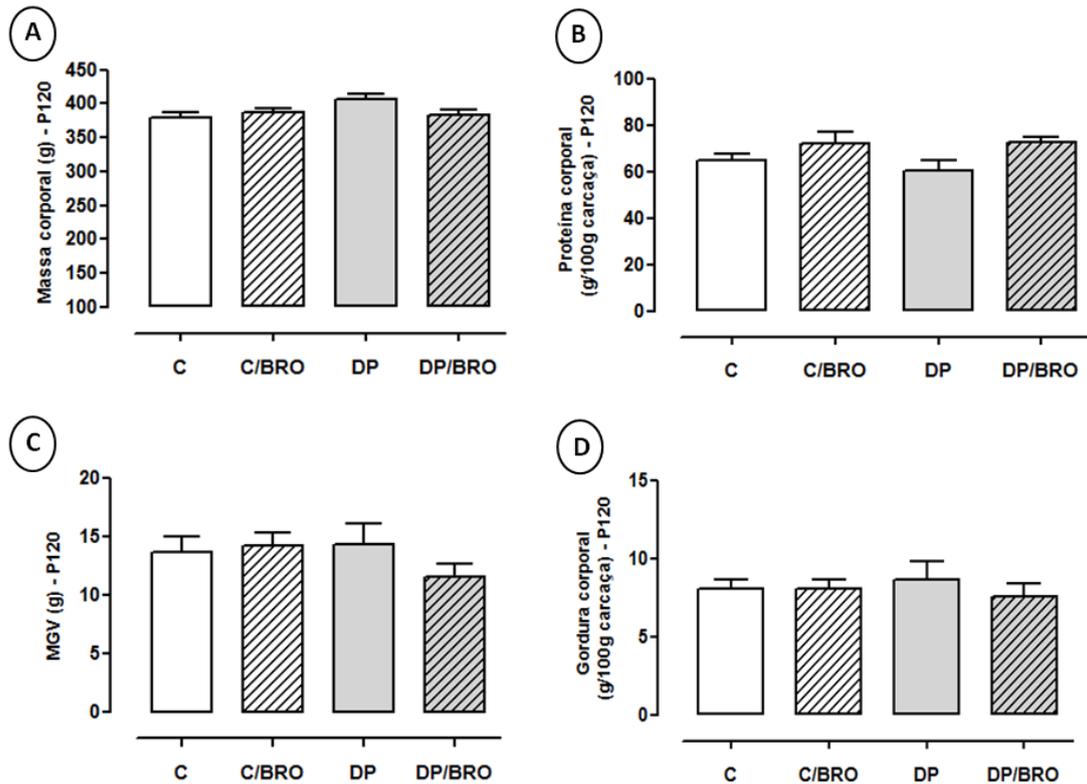
Nota: Valores expressos como média \pm EPM. $n = 10-11$ ninhadas por grupo para a massa corporal e CNA; $n=10-11$ animais por grupo para a glicemia de jejum. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.0001$.

8.2 Dados pós-desmame - P120

Em P120, não observamos diferença entre os grupos quanto a MC e CNA. Resultado similar foi observado quanto a proteína corporal total, gordura corporal total e MGTV que não diferiram entre os grupos (figura 16). Entretanto, o estudo morfológico identificou uma hipertrofia dos adipócitos no grupo DP quando comparado ao grupo C (+18%) e a reversão deste quadro quando submetidos ao tratamento com a bromocriptina (DP/BRO vs DP: -18%) caracterizando uma interação entre os fatores de desmame e bromocriptina, onde a droga

tornou-se o fator de maior efeito neste resultado ($F= 8,26$; $gl= 1/19$; $P= 0,0097$; two-way ANOVA) (figura 17).

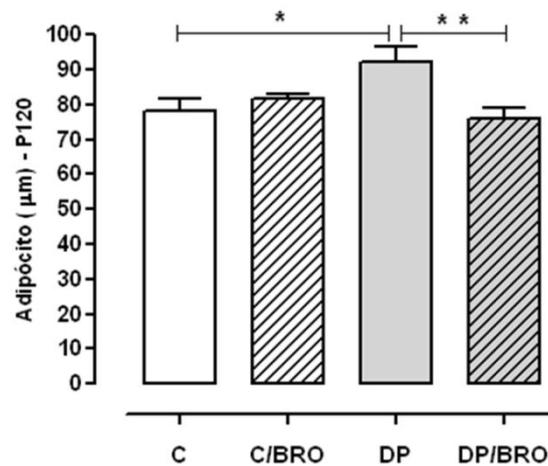
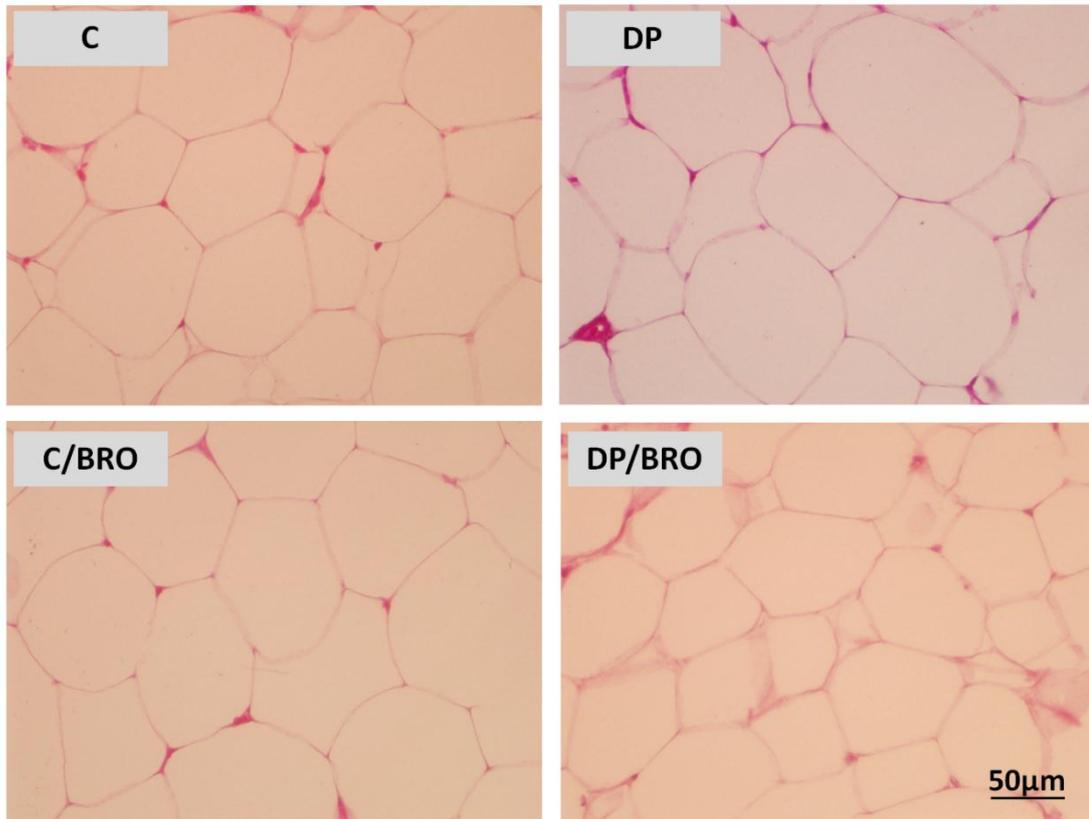
Figura 16- Biometria e adiposidade em P120



Legenda: Massa corporal (A); Proteína corporal total (B); MGV (C); Gordura corporal total (D). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina; **MGV**: massa de gordura visceral.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. $n = 10$ animais por grupo.

Figura 17 - Morfometria do tecido adiposo visceral (gordura retroperitoneal) em P120

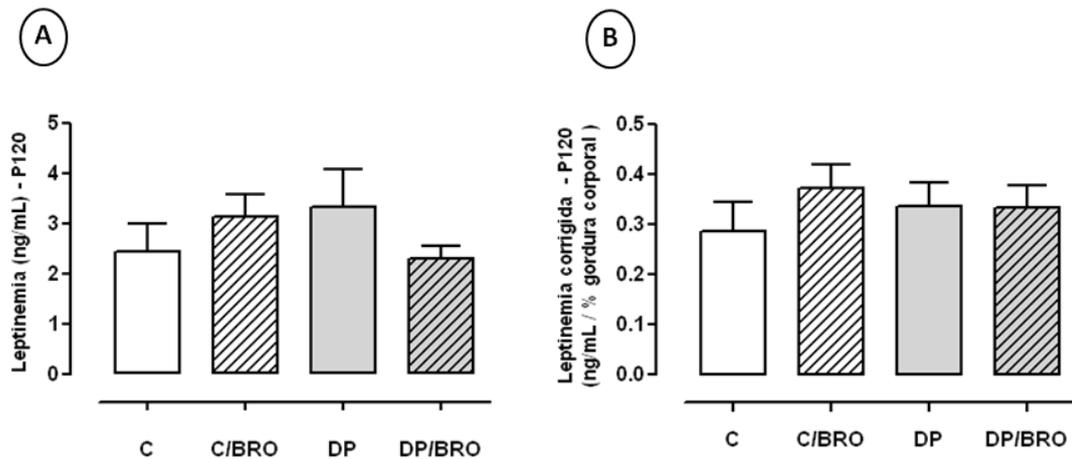


Legenda: Fotomicrografias com o mesmo aumento (objetiva de 40x) e coradas em HE. **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

Nota: Valores expressos como média ± EPM. n = 5-6 animais por grupo. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.001$.

Não foram encontradas alterações de leptina plasmática em qualquer grupo avaliado, seja como valores absolutos ou corrigidos pela gordura corporal (figura 18).

Figura 18 - Leptinemia

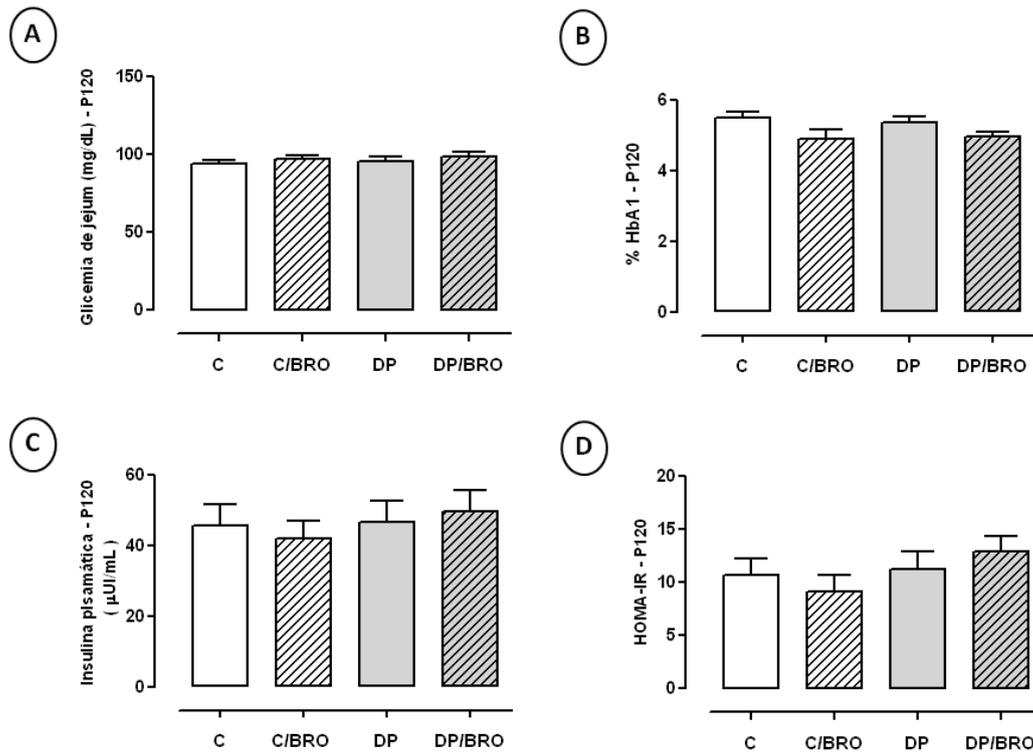


Legenda: Leptina plasmática em P120 (A); Leptina plasmática corrigida pelo % de gordura corporal total (B). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 10 animais por grupo.

Nas avaliações da homeostase glicêmica, não foram encontradas diferenças entre os grupos na glicemia de jejum, hemoglobina glicosilada, insulina plasmática e HOMA-IR (figura 19). No entanto, o grupo C/BRO ao ser submetido a uma carga glicêmica durante o TOTG, demonstrou um aumento da área sob a curva quando comparado ao grupo C (+11%) e DP/BRO (+9%), ressaltando a condição de interação entre o desmame precoce e a bromocriptina, onde o tratamento farmacológico exerceu maior influência na modulação deste parâmetro (figura 20).

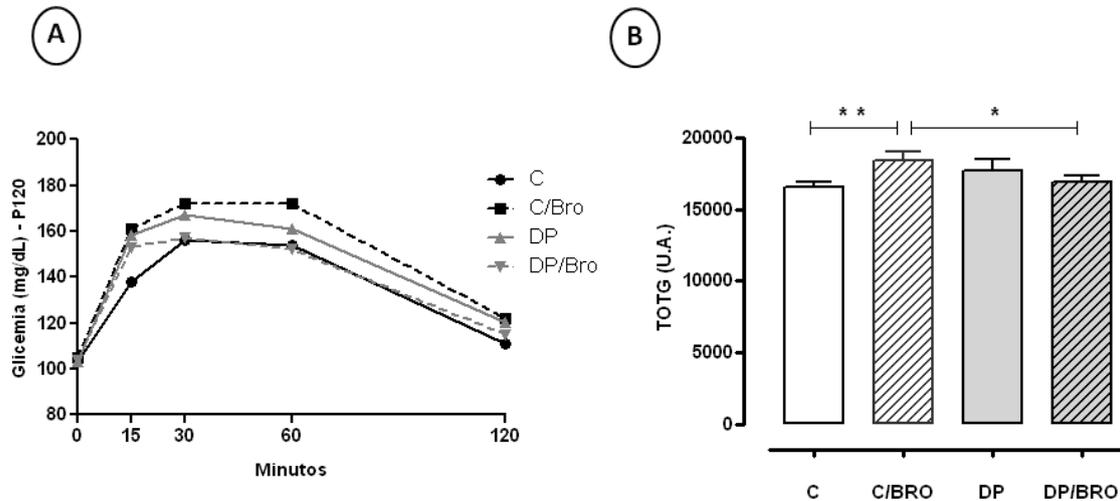
Figura 19- Perfil glicêmico em P120



Legenda: Glicemia de jejum (A); % de hemoglobina glicosilada (B); Insulinemia (C); HOMA-IR (D). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 10 animais por grupo.

Figura 20 - Avaliação do teste oral de tolerância a glicose – TOTG em P120

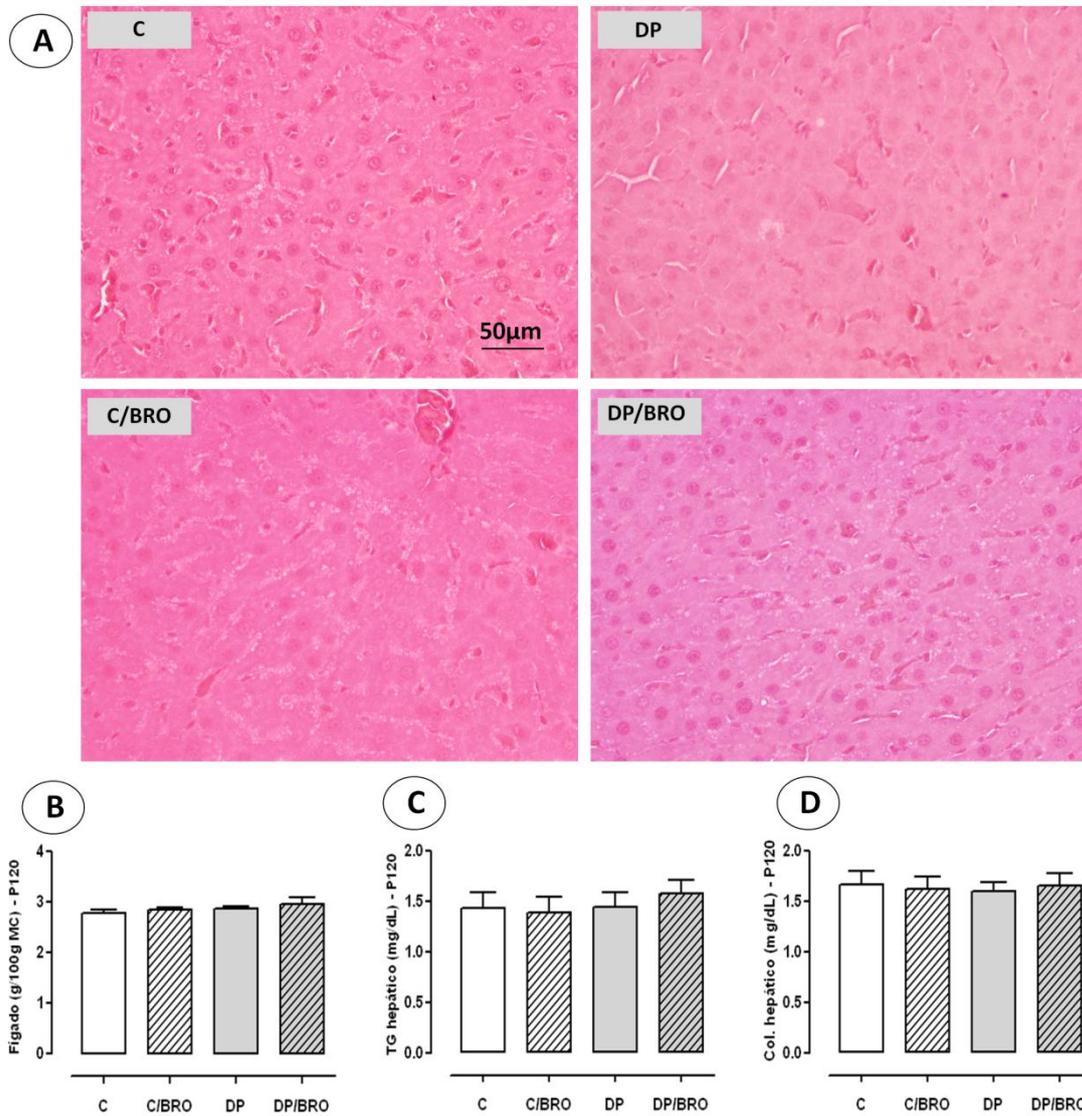


Legenda: Evolução da curva glicêmica (A); Área sob a curva referente ao TOTG (B). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. $n = 10$ animais por grupo. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.001$.

Nas avaliações hepáticas não foram encontradas diferenças entre os grupos no peso do fígado, assim como do conteúdo de triglicerídeo e colesterol hepático. Nas análises das fotomicrografias observou-se que todos os grupos avaliados apresentam uma preservação na citoarquitetura, porém com minúsculos vacúolos que se assemelham a gotículas lipídicas presentes no citoplasma (análise qualitativa) (figura 21).

Figura 21 - Avaliações hepáticas em P120



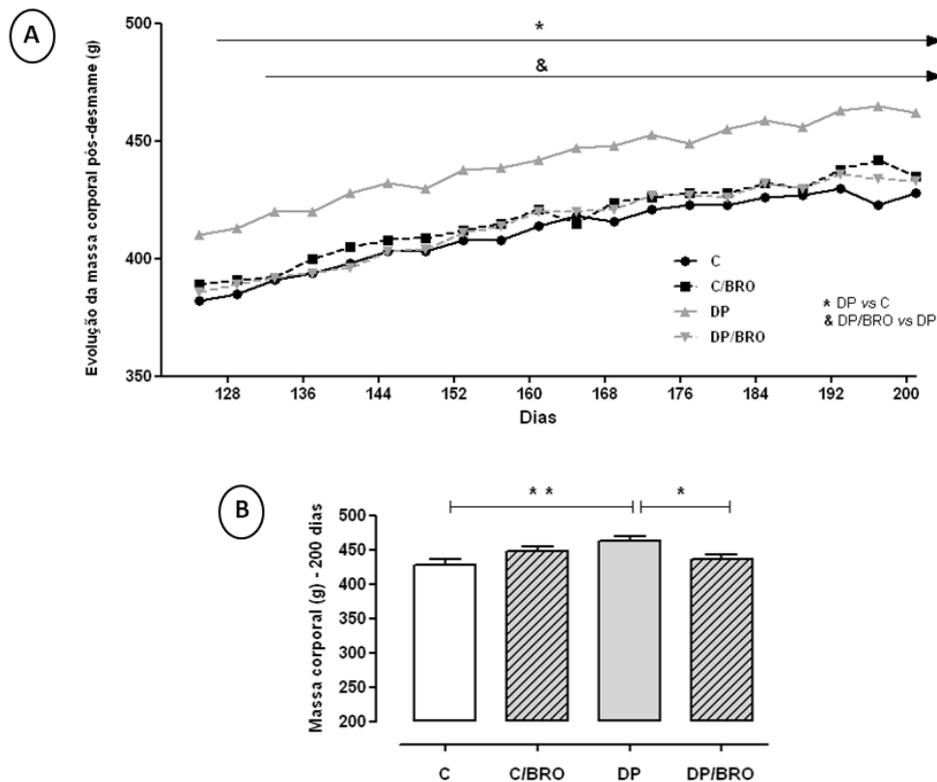
Legenda: Fotomicrografias do tecido hepático com o mesmo aumento (objetiva de 40x) e coradas em HE (A); Peso do fígado corrigido pela massa corporal (B); Conteúdo de triglicerídeo hepático pelo ensaio bioquímico (C); Conteúdo de colesterol hepático pelo ensaio bioquímico (D). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 10 animais por grupo.

8.3 Dados pós-desmame P200 - Avaliações do experimento 1 (grupos submetidos a dieta padrão) e experimento 2 (grupos submetidos a dieta hiperlipídica a partir de P130)

Após os 120 dias de vida, o grupo DP apresentou maior MC quando comparado ao grupo C até o final do experimento (DP vs C em P200 = +8%). Contudo, o tratamento neonatal com bromocriptina foi capaz de evitar esse ganho de MC como observado no grupo DP/BRO (DP/BRO vs DP em P200 = -5,7%) (figura 22).

Figura 22- Massa corporal de P120 até P200 - Experimento 1

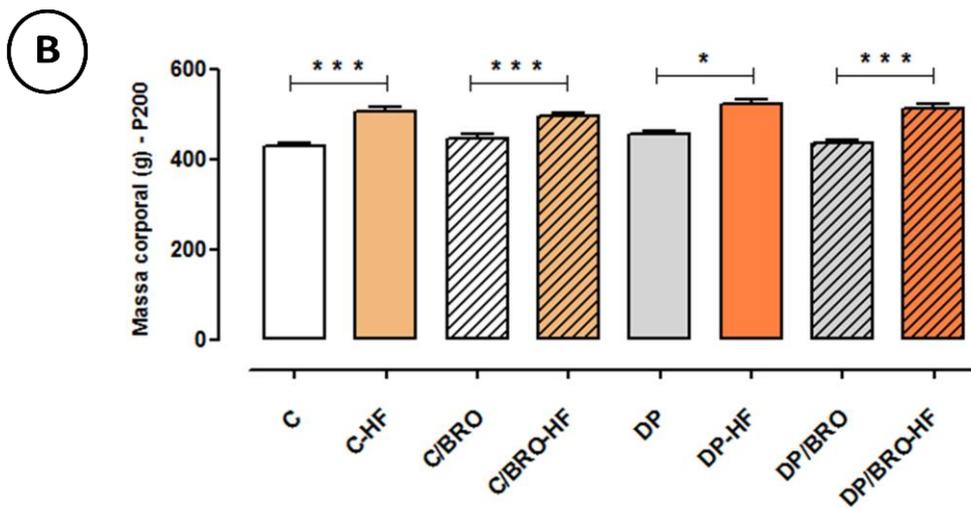


Legenda: Evolução da massa corporal de P120 até P200 (A); Massa corporal correspondente somente a P200 (B). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 10 ninhadas por grupo. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.001$.

Quando submetidos a dieta hiperlipídica por 70 dias, todos os grupos experimentais apresentaram maior MC quando comparados a seus respectivos grupos alimentados somente com dieta padrão (C-HF: +27%; C/BRO-HF: +16%; DP-HF: +11% e DP/BRO-HF: +20%). Porém, quando avaliamos somente os grupos submetidos a esta dieta de alta densidade calórica, não detectamos diferenças entre os grupos (figura 23).

Figura 23- Massa corporal P200 - Experimento 1 e 2



Legenda: Representação dos animais submetidos a dieta hiperlipídica vs animais alimentados com dieta padrão (A); Massa corporal dos animais em P200 com fornecimento de ração hiperlipídica (HF) por 70 dias (experimento 2) em comparação a seus respectivos grupos alimentados com dieta padrão durante todo o estudo (experimento 1) (B). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado

precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo;
DP/BRO: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

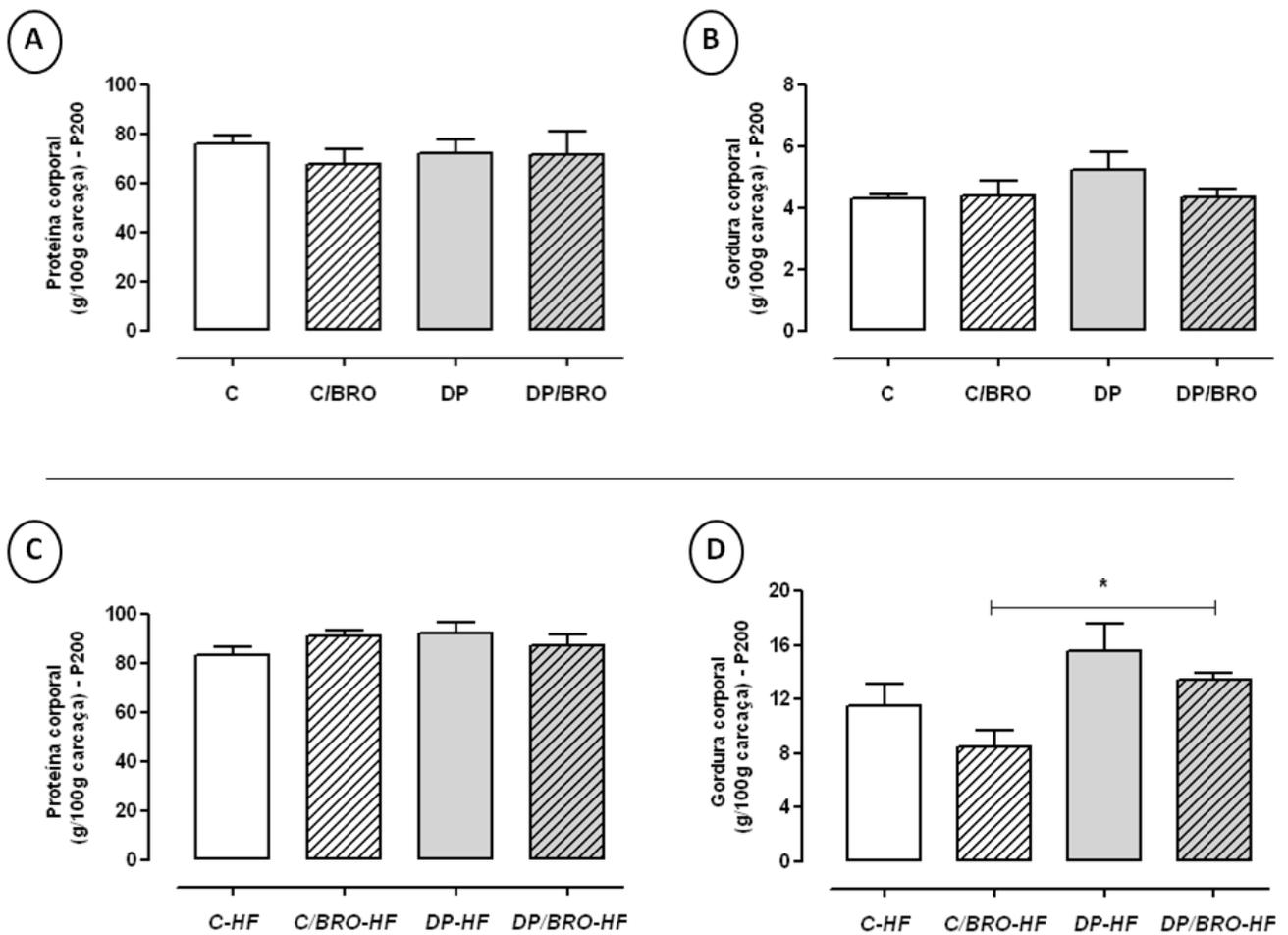
Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 10 ninhadas por grupo. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.0001$.

Nas avaliações de composição corporal não encontramos diferenças no compartimento de proteína e gordura corporal total entre os grupos do experimento 1, no entanto, verificamos uma tendência de 17% no incremento em percentuais de gordura do grupo DP quando comparado ao grupo C e o decréscimo deste parâmetro quando estes animais são submetidos ao tratamento com a bromocriptina (DP/BRO vs DP: -17%) (figura 24).

Ao avaliarmos os grupos HF (experimento 2), verificamos que a prole C/BRO-HF apresentou menor percentual de gordura corporal (-37%) quando comparado ao grupo DP/BRO-HF. Quanto ao conteúdo de proteína corporal total, não foram encontradas diferenças entre esses grupos (figura 24).

Na comparação entre animais com diferentes padrões dietéticos (experimento 1 vs experimento 2), todos os grupos do experimento 1 quando submetidos a dieta hiperlipídica, apresentaram maior percentual de gordura corporal (C-HF: +165%; C/BRO-HF: +93%; DP-HF: +199% e DP/BRO-HF: +209%). Quanto ao conteúdo de proteína corporal, somente os grupos C/BRO-HF (+34%) e DP-HF (+28%) apresentaram aumento deste parâmetro quando comparado a seus respectivos grupos com dieta padrão (Experimento 1 - C: $75,76 \pm 3,75$; C/BRO: $67,65 \pm 5,98$; DP: $72,19 \pm 5,42$; DP/BRO: $71,57 \pm 9,61$; Experimento 2 - C-HF: $83,19 \pm 3,25$; C/BRO-HF: $90,73 \pm 2,42$; DP-HF: $92,30 \pm 4,29$; DP/BRO-HF: $86,87 \pm 4,55$).

Figura 24- Composição corporal P200 - Experimento 1 e 2



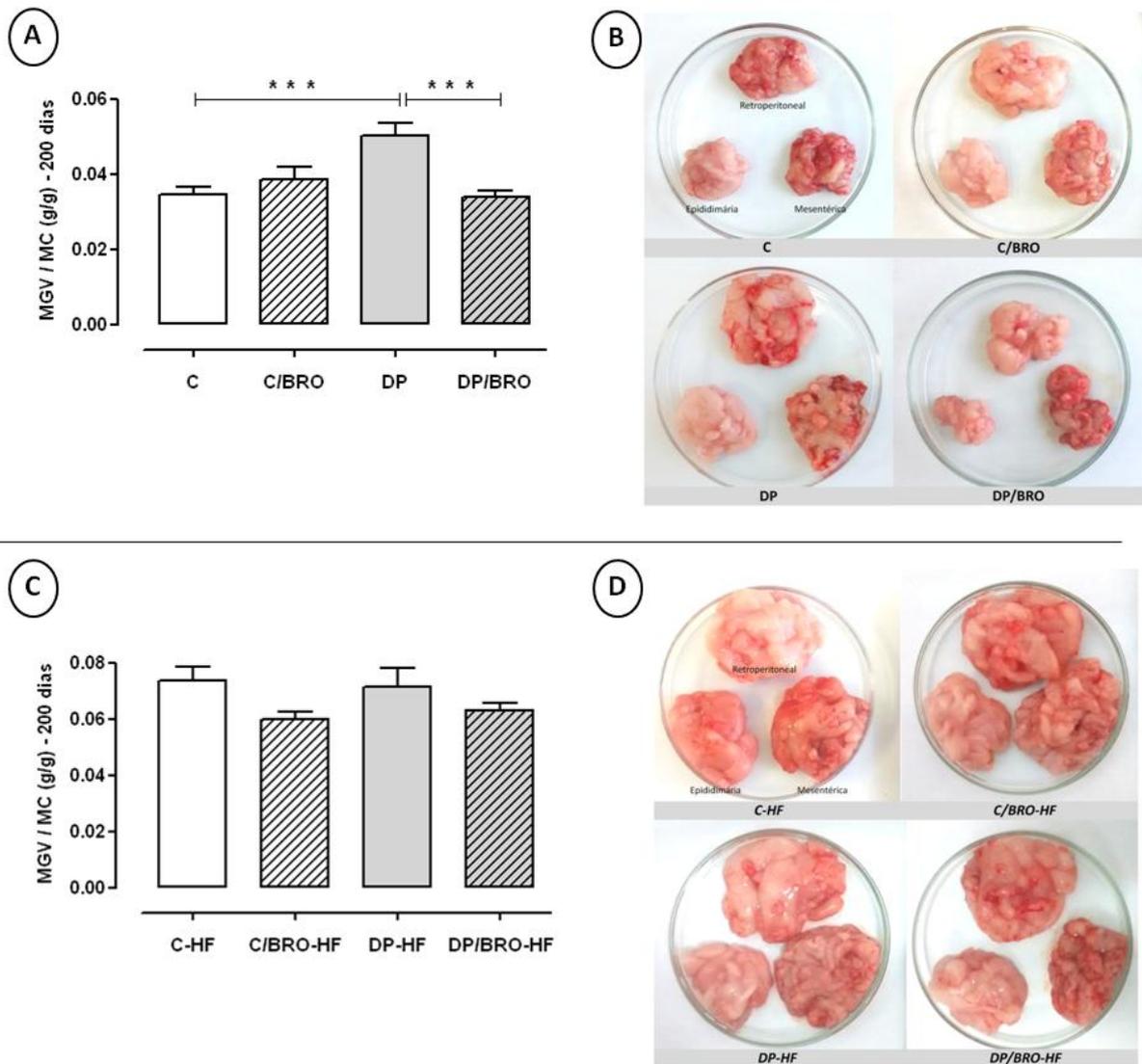
Legenda: Conteúdo de proteína corporal total do experimento 1 (dieta padrão) (A); % de gordura corporal total do experimento 1 (dieta padrão) (B); Conteúdo de proteína corporal total do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (C); % de gordura corporal total do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (D). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 10 animais por grupo. * $P < 0.05$.

Ao avaliarmos o quantitativo da MGCV corrigida pela massa corporal, observamos que no 1º experimento somente o grupo DP apresentou aumento deste compartimento quando comparado ao grupo C (+44%) e DP/BRO (+32%) (figura 25). Já no 2º experimento não encontramos diferenças entre os grupos (figura 25), porém quando fazemos a comparação entre os experimentos verificamos que os grupos com dieta hiperlipídica apresentam um

aumento significativo da MGV corrigida quando comparado a seus respectivos grupos padrões (C-HF: +111%; C/BRO-HF: +54%; DP-HF: +42% e DP/BRO-HF: +85%).

Figura 25- MGV em P200 - Experimento 1 e 2

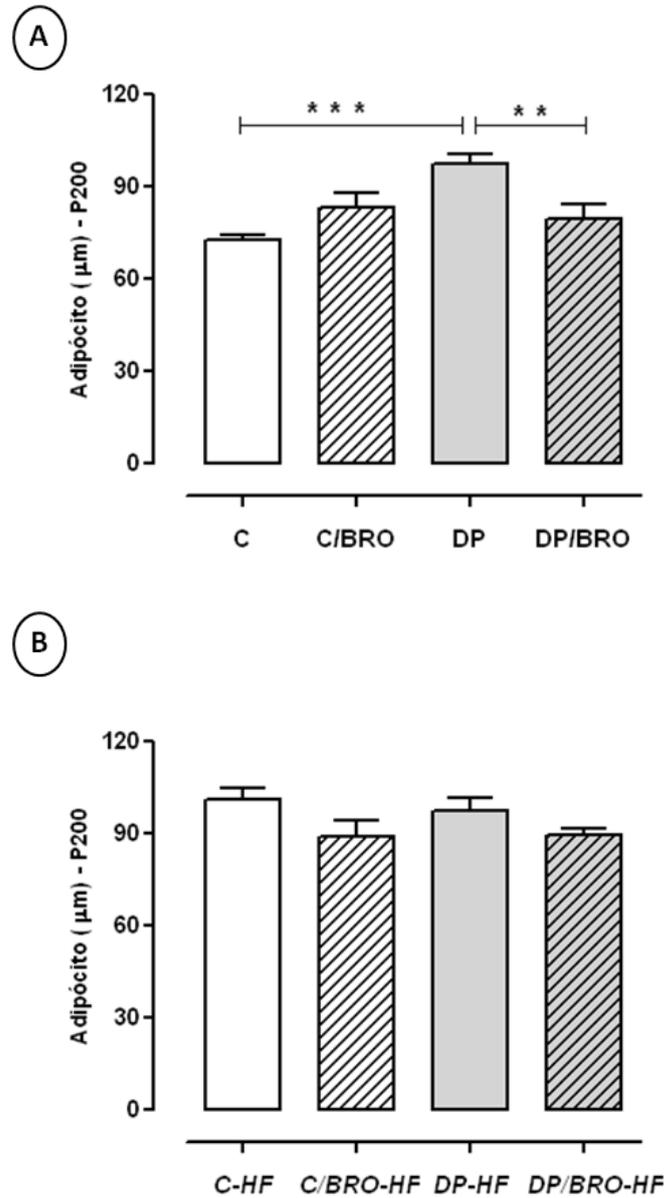


Legenda: MGV corrigida pela massa corporal do experimento 1 (dieta padrão) (A); Representação da MGV do experimento 1 (dieta padrão) (B); MGV corrigida pela massa corporal do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (C); Representação da MGV do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (D). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina; **MGV**: massa de gordura visceral.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 10 animais por grupo. *** $P < 0.0001$.

Avaliando-se a morfometria do tecido adiposo visceral observamos que o tamanho dos adipócitos corrobora o padrão quantitativo de MGV, afinal o grupo DP apresentou uma hipertrofia quando comparado ao grupo C (+33%) e uma redução do tamanho celular frente ao tratamento neonatal com bromocriptina (DP/BRO *vs* DP: -18%). Não foram encontradas diferenças entre os grupos alimentados com dieta hiperlipídica (experimento 2). Na comparação entre as proles com diferentes dietas verificou-se que somente o grupo C-HF apresentou um aumento do tamanho do adipócito quando comparado a seu respectivo grupo submetido exclusivamente a dieta padrão (C-HF *vs* C: +39%) (figura 26 e 27) (Experimento 1 - C: $72,78 \pm 0,90$; C/BRO: $83,43 \pm 2,99$; DP: $97,23 \pm 2,33$; DP/BRO: $79,48 \pm 3,30$; Experimento 2 - C-HF: $101,3 \pm 3,55$; C/BRO-HF: $88,87 \pm 5,21$; DP-HF: $97,36 \pm 4,11$; DP/BRO-HF: $89,81 \pm 1,91$).

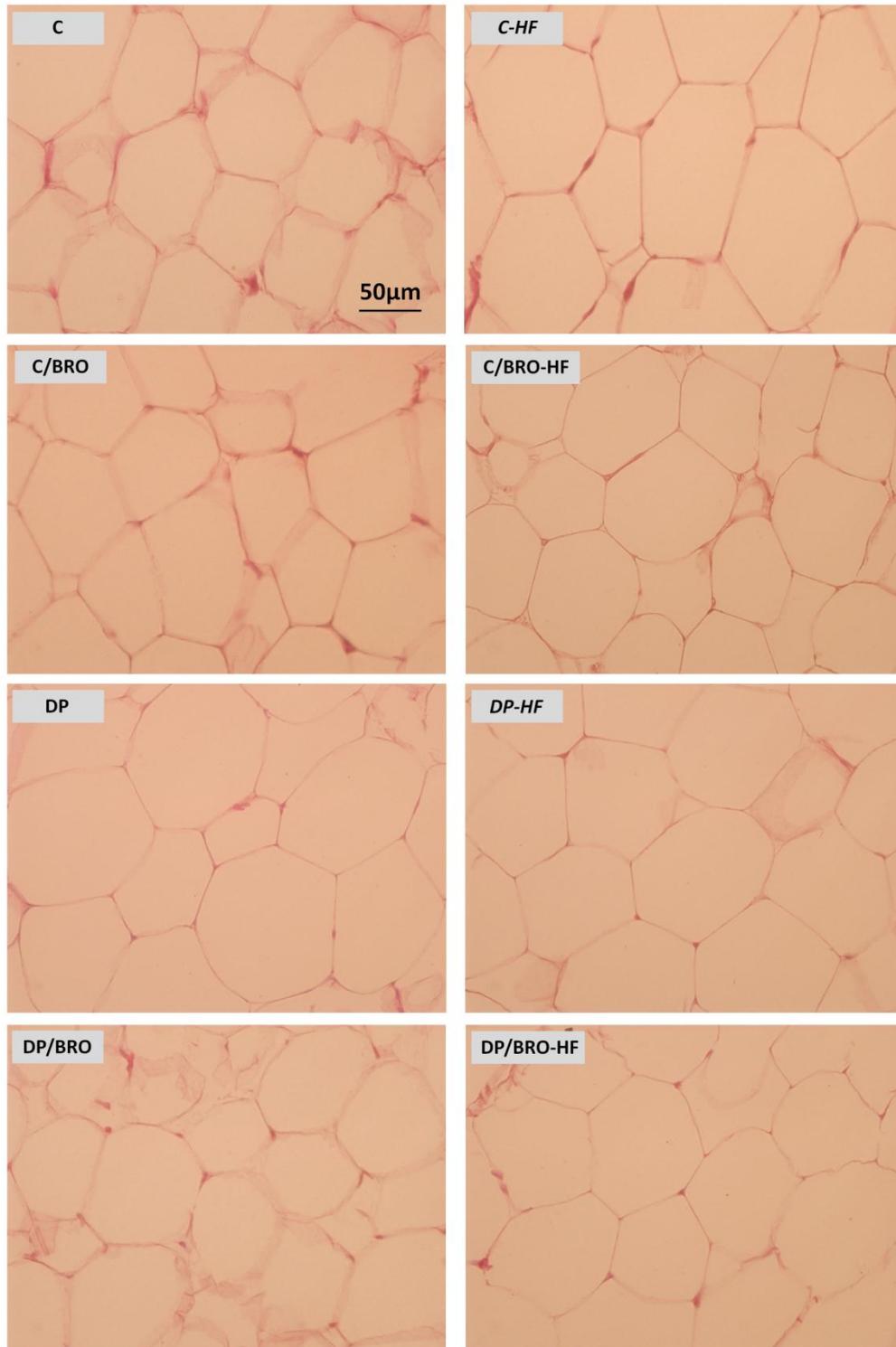
Figura 26 - Morfometria do tecido adiposo visceral (gordura retroperitoneal) em P200 - Experimento 1 e 2



Legenda: Morfometria de adipócitos do experimento 1 (dieta padrão) (A); Morfometria de adipócitos do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (B). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

Nota: Valores expressos como média ± EPM. n = 5 animais por grupo. ** $P < 0.001$ e *** $P < 0.0001$.

Figura 27 - Fotomicrografias do tecido adiposo visceral (gordura retroperitoneal) em P200-Experimento 1 e 2



Legenda: **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

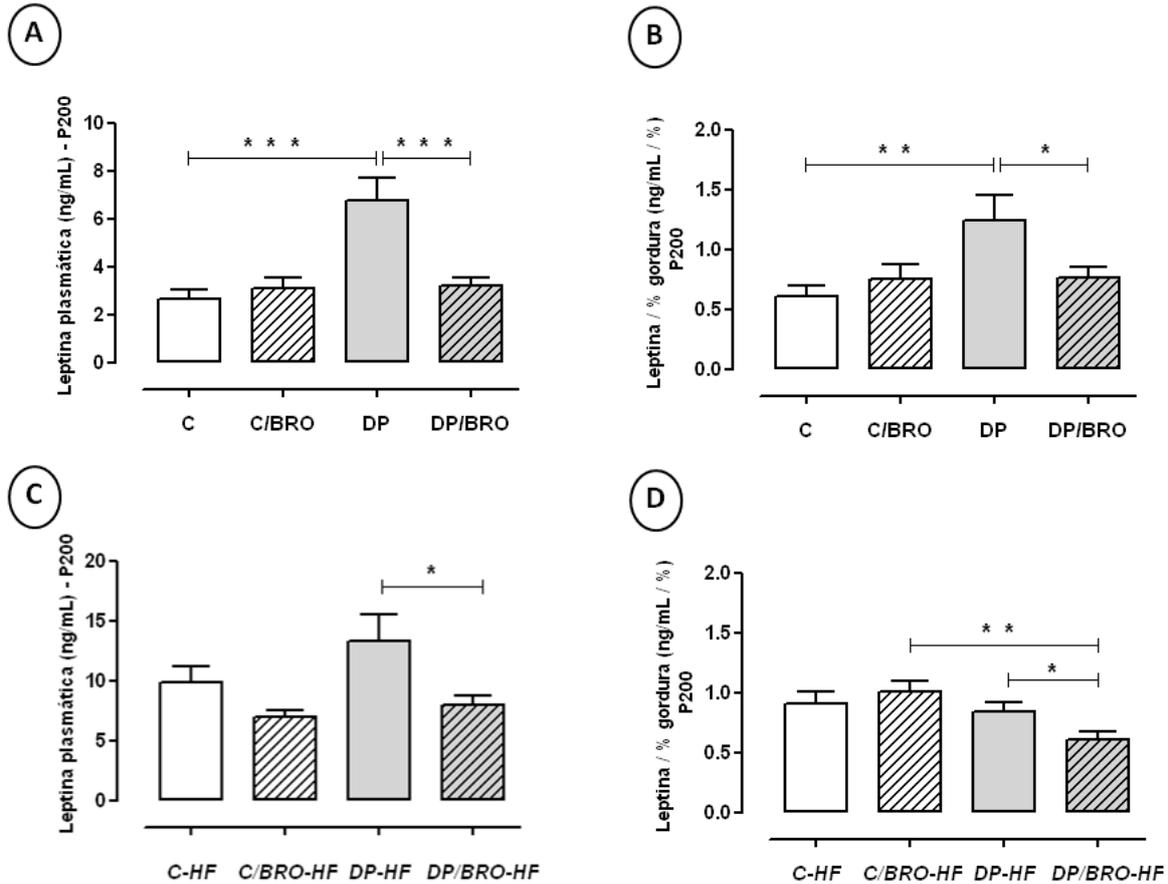
Nota: Objetiva de 40x e coloração de HE.

Quanto a leptinemia, observamos que no experimento 1, seja pela avaliação dos valores plasmáticos absolutos ou pelos seus valores corrigidos pelo percentual de gordura corporal, obtivemos o mesmo padrão de resultados, demonstrando que o grupo DP apresentou uma hiperleptinemia quando comparado ao grupo C (+106%), contrapondo-se ao grupo DP/BRO em que não houve este aumento (-38% vs. DP) (figura 28).

Como era de se esperar todos os grupos HF tiveram maior leptinemia que os grupos em dieta padrão (em valores absolutos: C-HF: +269%; C/BRO-HF: +127%; DP-HF: +110% e DP/BRO-HF: +152%). Contudo, observou-se que neste 2º experimento, os animais que foram desmamados precocemente, mas que foram tratados com bromocriptina apresentaram menor leptinemia (DP/BRO-HF vs DP-HF: -28% na leptinemia corrigida pelo percentual de gordura total), tornando-se inclusive, mais hipoleptinêmico quando comparado ao grupo C/BRO-HF (DP/BRO vs C/BRO: -39%) (figura 28).

Na comparação entre os experimentos, somente o grupo C-HF quando comparado ao grupo C apresentou hiperleptinemia (C-HF vs C: +51% na leptinemia corrigida).

Figura 28- Leptinemia em P200 - Experimento 1 e 2



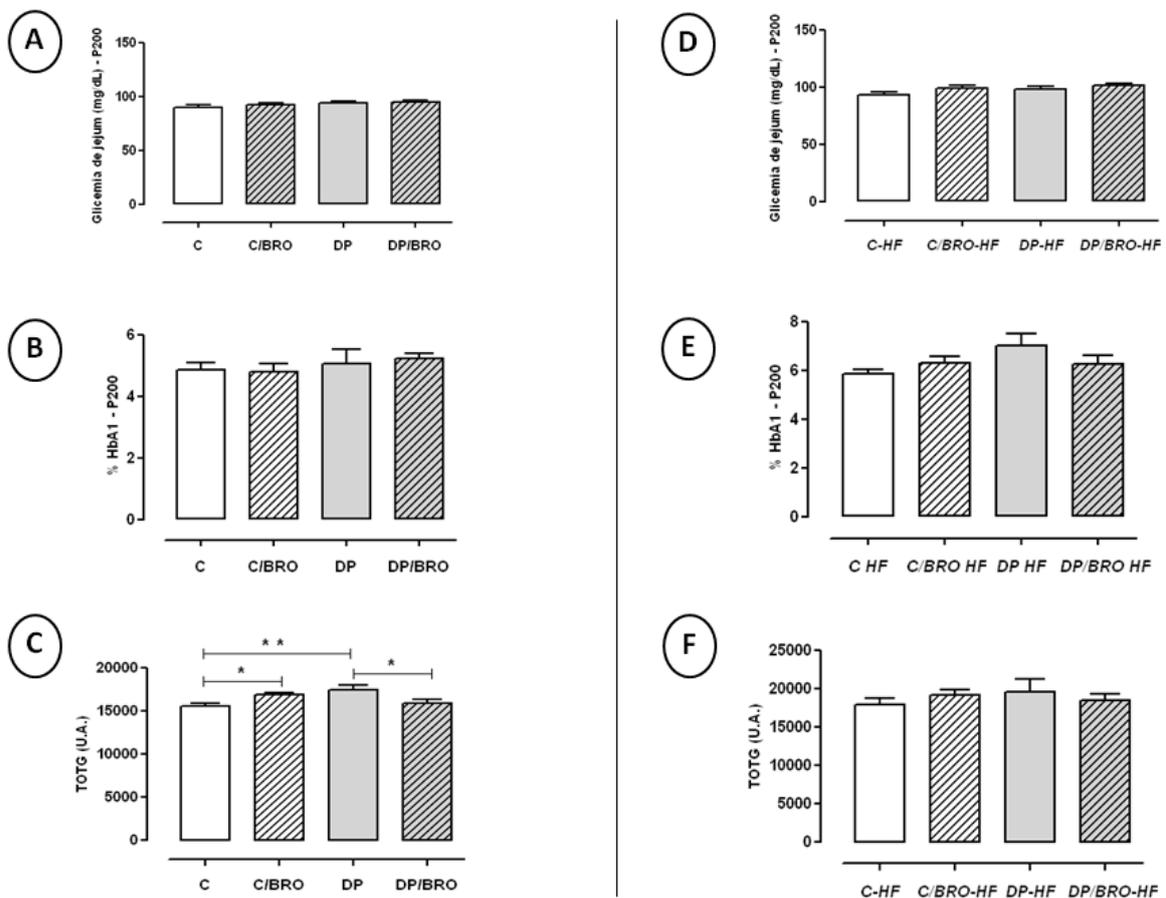
Legenda: Leptina plasmática do experimento 1 (dieta padrão) (A); Leptinemia corrigida pelo % de gordura corporal do experimento 1 (dieta padrão) (B); Leptina plasmática do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (C); Leptinemia corrigida pelo % de gordura corporal do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (D). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 10 animais por grupo. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ e *** $P < 0.0001$.

Quanto ao perfil glicêmico, animais do experimento 1 não apresentaram alterações na glicemia de jejum e hemoglobina glicosilada, no entanto, nos resultados do TOTG, observou-se que os grupos C/BRO e DP aumentaram área sob a curva quando comparado ao grupo C (+8% e +12%, respectivamente) e que o grupo DP/BRO não apresentou este tipo de resultado quando comparado a prole DP (-9%). Ao avaliarmos isoladamente os grupos que compõem o 2º experimento, não verificamos diferenças em nenhum destes parâmetros avaliados. Contudo, ao compararmos os experimentos, observamos que a dieta hiperlipídica promoveu uma hiperglicemia de jejum nos animais tratados com bromocriptina, quando comparados a

seus respectivos grupos com dieta padrão (C/BRO-HF vs C/BRO: +7% e DP/BRO-HF vs DP/BRO: +7%). Quanto aos resultados da hemoglobina glicosilada, todos os grupos HF apresentaram aumento de seus valores quando comparados aos animais do experimento 1 (C-HF: +20%; C/BRO-HF: +31%; DP-HF: +39% e DP/BRO-HF: +19%). No TOTG apenas o grupo DP-HF não apresentou uma piora da área sob a curva quando comparado aos grupos do 1º experimento (C-HF: +15%; C/BRO-HF: +13% e DP/BRO-HF: +16%) (figura 29).

Figura 29- Perfil glicêmico em P200 - Experimento 1 e 2

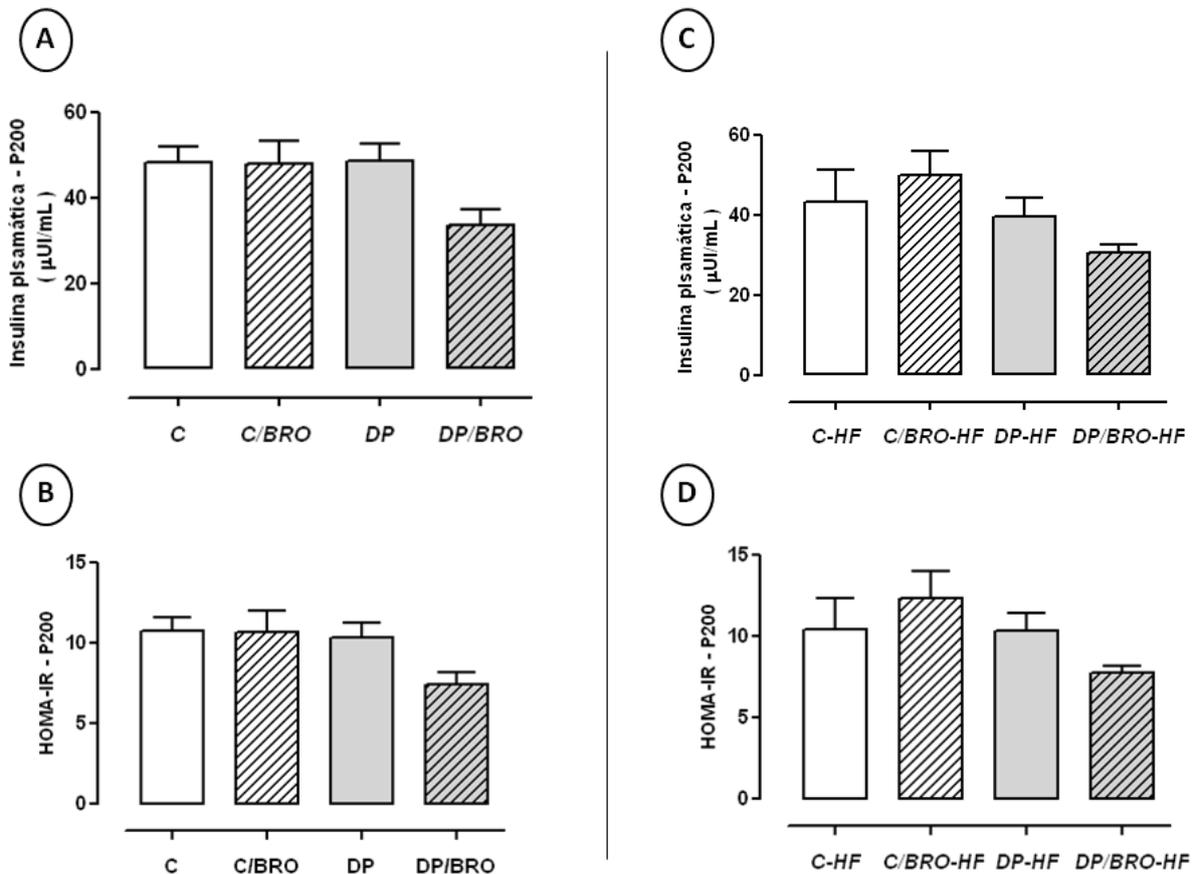


Legenda: Glicemia de jejum do experimento 1 (dieta padrão) (A); % de hemoglobina glicosilada do experimento 1 (dieta padrão) (B); Área sob a curva do TOTG do experimento 1 (dieta padrão) (C); Glicemia de jejum do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (D); % de hemoglobina glicosilada referente aos grupos do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (E); Área sob a curva do TOTG do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (F). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina; **TOTG**: teste oral de tolerância a glicose.

Nota: Valores expressos como média ± EPM. n = 10 animais por grupo. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.001$.

As avaliações da insulinemia não mostraram diferença entre os grupos em qualquer um dos experimentos e nem na comparação entre eles (figura 30). Apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa, os grupos DP/BRO independente da dieta tiveram os valores mais baixos (Experimento 1 - DP/BRO *vs* DP: -31%; DP/BRO *vs* C/BRO: -30%; Experimento 2 - DP/BRO-HF *vs* DP-HF: -22%; DP/BRO-HF *vs* C/BRO-HF: -38%).

Figura 30 - Avaliação da insulinemia e índice de resistência insulínica em P200 - Experimento 1 e 2



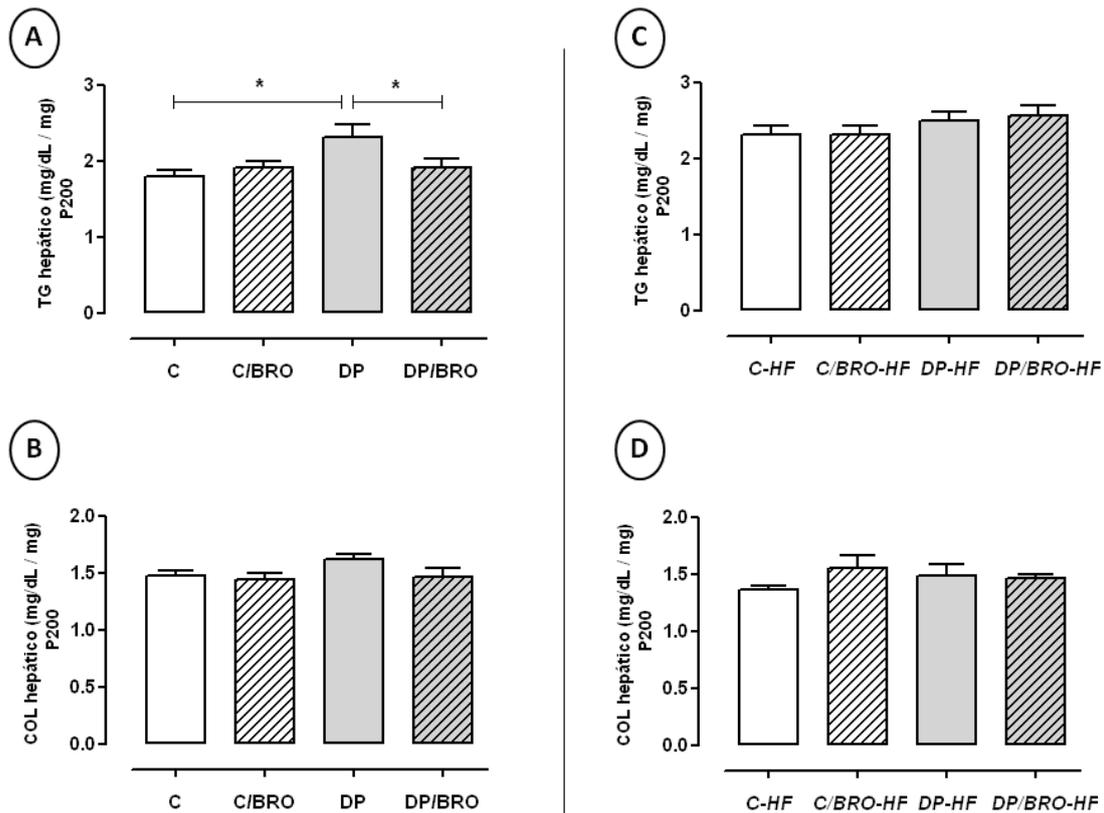
Legenda: Insulinemia do experimento 1 (dieta padrão) (A); HOMA-IR do experimento 1 (dieta padrão) (B); Insulinemia do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (C); HOMA-IR do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (D). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

Nota: Valores expressos como média ± EPM. n = 10 animais por grupo.

As avaliações hepáticas referentes aos animais do experimento 1 demonstraram um aumento no quantitativo de TG na prole DP (DP vs C: +29 %) e a sua diminuição quando submetidos ao tratamento com bromocriptina (DP/BRO vs DP: -17%). Animais com dieta hiperlipídica não apresentaram diferenças entre si na quantidade de triglicérides hepático, contudo ao serem comparados com os animais de dieta padrão verificamos que todos os grupos, com exceção da prole DP-HF, apresentaram um aumento significativo nesta análise (C-HF: +29%; C/BRO-HF: +22% e DP/BRO-HF: +34%) (figura 31).

Não foram encontradas diferenças em qualquer comparativo referente as análise de colesterol hepático (figura 31) e quantificação proteica das enzimas do sistema antioxidante e marcadores de estresse oxidativo (figura 32 e 33 respectivamente).

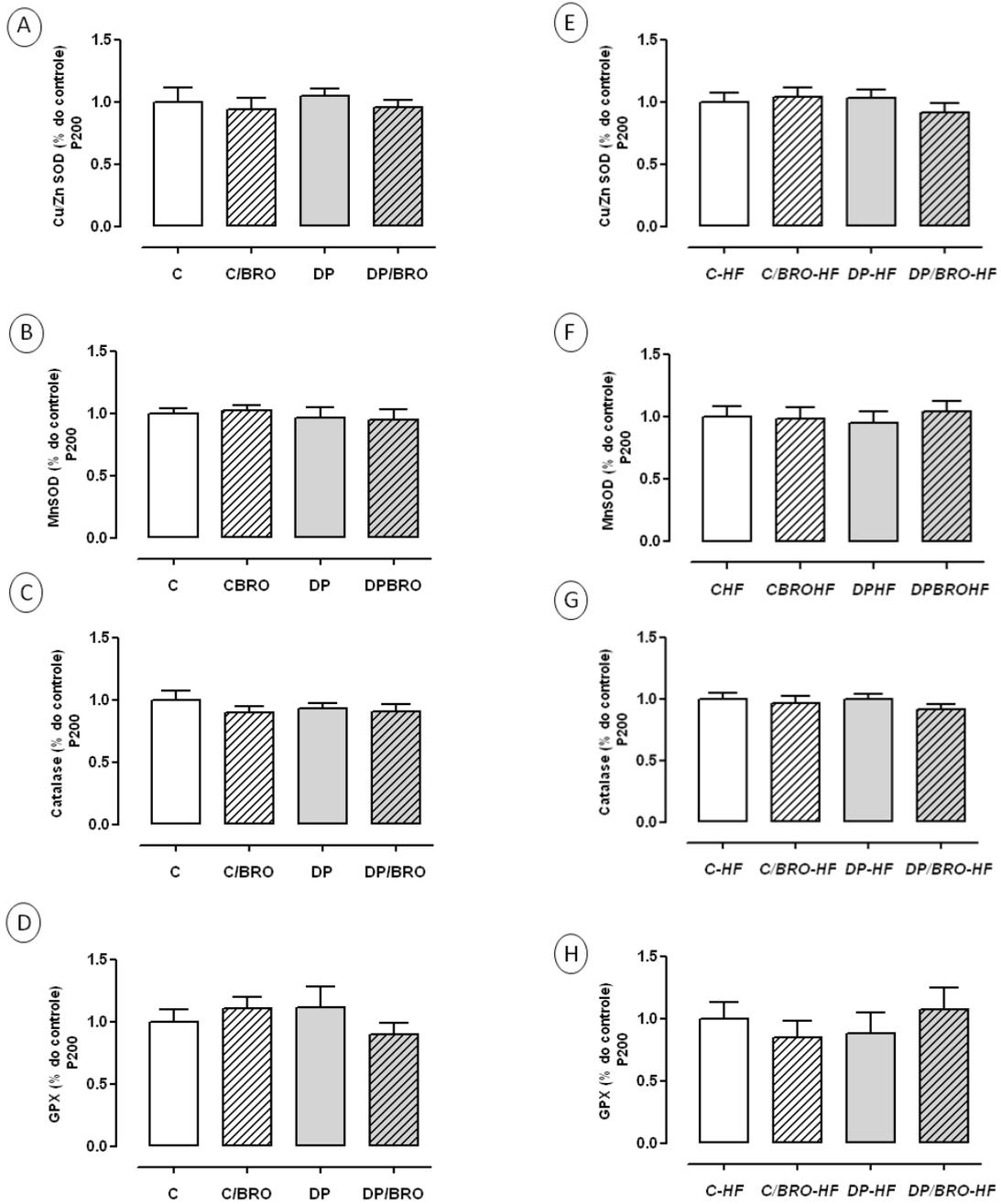
Figura 31 - Avaliação bioquímica de triglicerídeo e colesterol hepático em P200 - Experimento 1 e 2



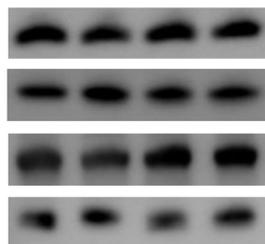
Legenda: TG hepático do experimento 1 (dieta padrão) (A); COL hepático do experimento 1 (dieta padrão) (B); TG hepático do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (C); COL hepático do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (D). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina; **TG**: triglicerídeo; **COL**: colesterol.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 10 animais por grupo. * $P < 0.05$.

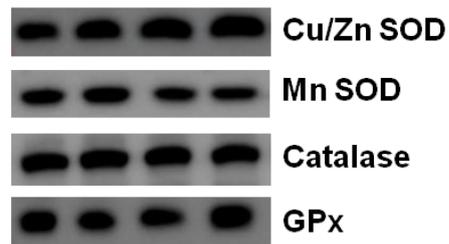
Figura 32 - Quantificação proteica por western blotting das enzimas do sistema antioxidante presentes no tecido hepático em P200 - Experimento 1 e 2



Experimento 1
(C / C/BRO / DP / DP/BRO)



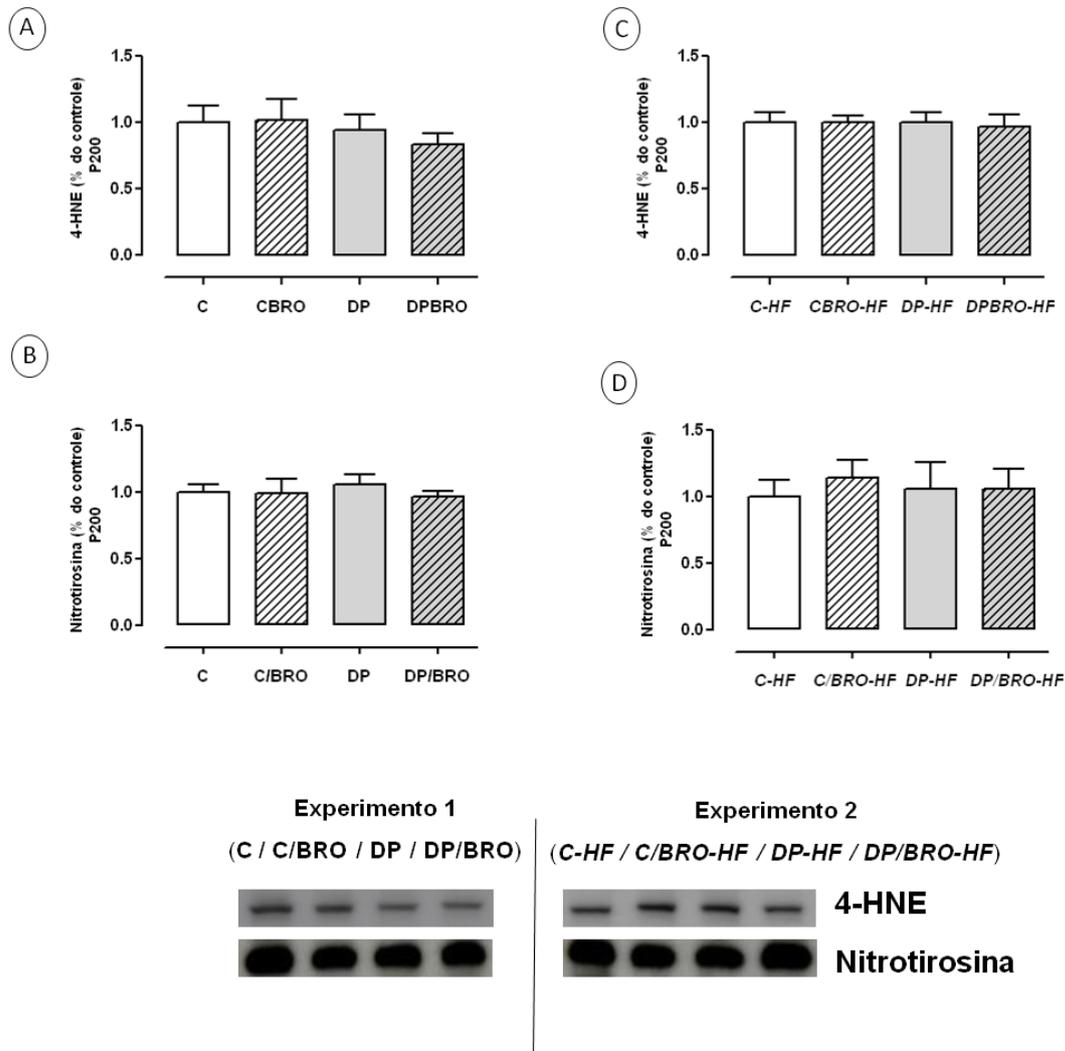
Experimento 2
(C-HF / C/BRO-HF / DP-HF / DP/BRO-HF)



Legenda: Cu/ZnSOD (SOD1) do experimento 1 (dieta padrão) (A); MnSOD (SOD2) do experimento 1 (dieta padrão) (B); Catalase do experimento 1 (dieta padrão) (C); GPx do experimento 1 (dieta padrão) (D); Cu/ZnSOD (SOD1) do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (E); MnSOD (SOD2) do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (F); Catalase do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (G); GPx do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (H); Representação das bandas imunomarcadas dos experimentos 1 e 2 (abaixo). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina; **SOD**: superóxido dismutase; **GPx**: glutathione peroxidase.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 7 animais por grupo.

Figura 33 - Quantificação proteica por western blotting dos marcadores de estresse oxidativo em P200 - Experimento 1 e 2



Legenda: 4-HNE do experimento 1 (dieta padrão) (A); Nitrotirosina do experimento 1 (dieta padrão) (B); 4-HNE do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (C); Nitrotirosina do experimento 2 (dieta hiperlipídica - HF) (D); Representação das bandas imunomarcadas dos experimentos 1 e 2 (abaixo). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

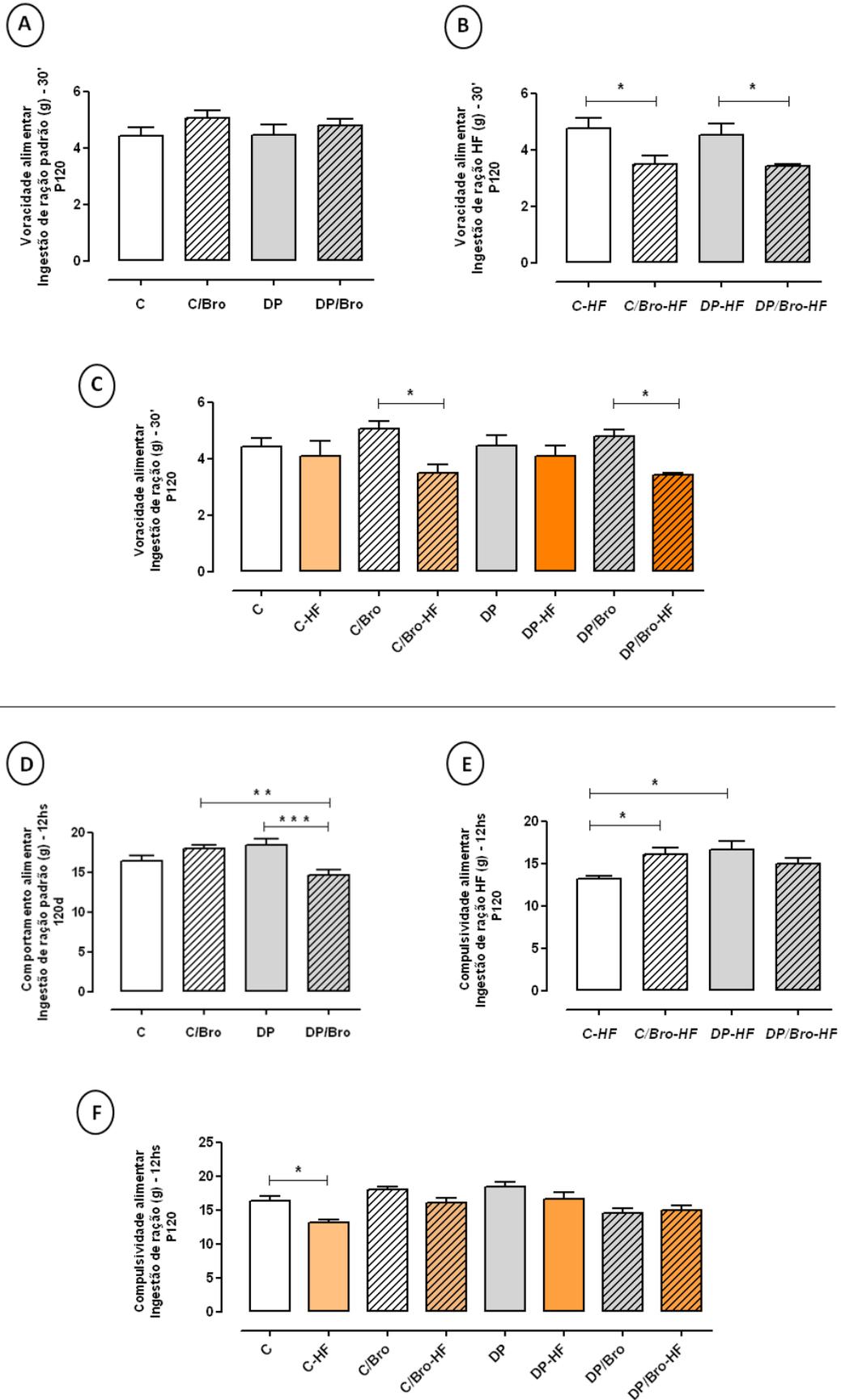
Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 7 animais por grupo.

8.4 Comportamento alimentar

Não foram encontradas diferenças na ingestão alimentar acumulada até os 130 dias de vida (ponto de corte onde ocorre a subdivisão dos grupos) (C: $2269 \pm 47,24$; C/BRO: $2406 \pm 40,49$; DP: $2340 \pm 35,23$ e DP/BRO: $2320 \pm 35,30$).

No entanto, durante a realização do teste de comportamento alimentar em P120, somente as proles tratadas com bromocriptina no período neonatal, ao serem apresentadas a dieta hiperlipídica, reduziram a ingestão desta ração de alta palatabilidade aos 30 minutos (tempo onde se avaliou a voracidade dos animais ao consumo dietético) (C/BRO-HF *vs* C-HF: -26% e DP/BRO-HF *vs* DP-HF: -24%). Tais grupos, tiveram, inclusive, um consumo inferior aos seus respectivos grupos submetidos a dieta padrão (C/BRO-HF *vs* C/BRO: -31% e DP/BRO-HF *vs* DP/BRO: -29%). Na avaliação do período de 12 horas, observamos menor consumo de ração padrão na prole DP/BRO quando comparado ao grupo C/BRO (-19%) e grupo DP (-21%). Já em animais com oferta de dieta hiperlipídica observou-se que as proles C/BRO-HF e DP-HF consomem um quantitativo maior de ração quando comparados ao grupo C-HF (-22% e -26%, respectivamente). Comparando-se, portanto, os grupos com a diferenciação dietética, somente o grupo C-HF apresentou menor consumo alimentar dentro das 12 horas (C-HF *vs* C: -20%) (figura 34).

Figura 34 - Teste de comportamento alimentar em P120

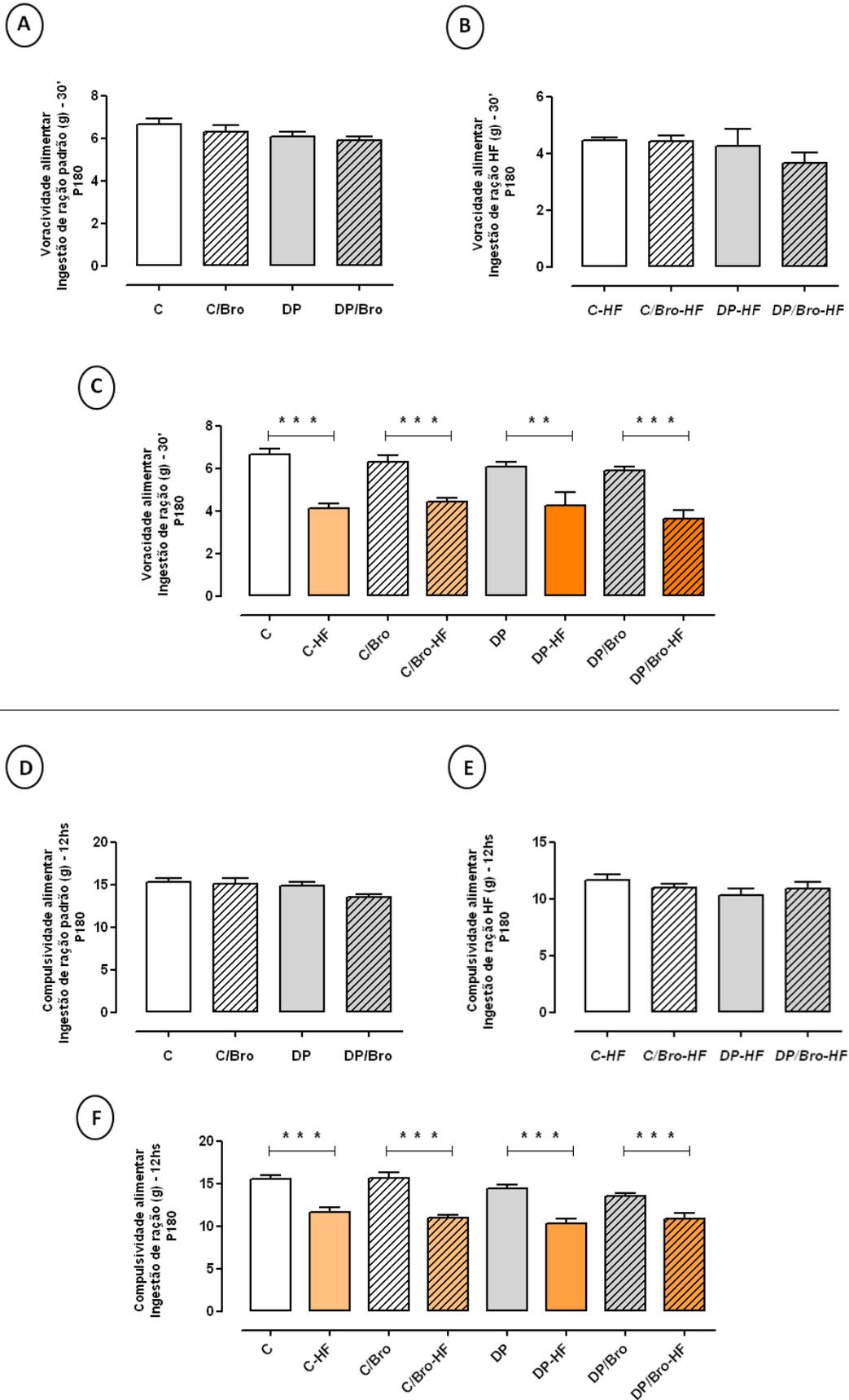


Legenda: Avaliação de 30 minutos em grupos com dieta padrão (A); Avaliação de 30 minutos em grupos com dieta hiperlipídica-HF (B); Comparativo entre os grupos com dietas diferenciadas (padrão vs hiperlipídica) no tempo de 30 minutos (C); Avaliação de 12 horas em grupos com dieta padrão (D); Avaliação de 12 horas em grupos com dieta hiperlipídica -HF (E); Comparativo entre os grupos com dietas diferenciadas (padrão vs hiperlipídica) no tempo de 12 horas (F). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 10 ninhadas por grupo.

Com a repetição do teste em P180 não foram encontradas diferenças entre os grupos quando avaliamos o tipo de dieta separadamente, tanto na avaliação de 30 minutos quanto em 12 horas. Entretanto ao compararmos os padrões dietéticos observamos que todos os grupos reduziram o consumo alimentar quando comparados a seus respectivos grupos submetidos a dieta padrão, em ambos tempos avaliados (em 30 minutos: C-HF vs C: -38%; C/BRO-HF vs C/BRO: -30%; DP-HF vs DP: -30% e DP/BRO-HF vs DP/BRO: -38%; em 12 horas: C-HF vs C: -25%; C/BRO-HF vs C/BRO: -29%; DP-HF vs DP: -28% e DP/BRO-HF vs DP/BRO: -20%) (figura 35).

Figura 35- Teste de comportamento alimentar em P180



Legenda: Avaliação de 30 minutos em grupos com dieta padrão (A); Avaliação de 30 minutos em grupos com dieta hiperlipídica - HF (B); Comparativo entre os grupos com dietas diferenciadas (padrão vs hiperlipídica) no tempo de 30 minutos (C); Avaliação de 12 horas em grupos com dieta padrão (D); Avaliação de 12 horas em grupos com dieta hiperlipídica - HF (E); Comparativo entre os grupos com dietas diferenciadas (padrão vs hiperlipídica) no tempo de 12 horas (F). **C**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com solução veículo; **C/BRO**: grupo com livre aleitamento materno e tratado com bromocriptina; **DP**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com solução veículo; **DP/BRO**: grupo desmamado precocemente através de bandagem adesiva ao corpo materno e tratado com bromocriptina.

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. n = 10 ninhadas por grupo.

Quanto ao consumo alimentar acumulado no período de P130 a P200 somente observamos diferença no experimento 1, onde o grupo DP se mostrou mais hiperfágico (+9% no quantitativo em g de ração consumida) quando comparado ao grupo C (C: $1752 \pm 31,78$; C/BRO: $1826 \pm 40,45$; DP: $1905 \pm 34,39$ e DP/BRO: $1800 \pm 25,20$). No 2º experimento, apesar de não haver diferenças entre os grupos (C-HF: $1295 \pm 34,28$; C/BRO-HF: $1262 \pm 30,99$; DP-HF: $1273 \pm 39,72$ e DP/BROHF: $1282 \pm 40,20$), todas as proles apresentaram menor consumo alimentar quando comparados a seus respectivos grupos padrões (C-HF vs C: -26%; C/BRO-HF vs C/BRO: -31%; DP-HF vs DP: -33% e DP/BRO-HF vs DP/BRO: -29%).

9 DISCUSSÃO

O presente estudo procurou avaliar o impacto do tratamento neonatal com bromocriptina (desmame precoce farmacológico) e verificar seus possíveis efeitos de interferência na programação, visto que neste modelo de desmame precoce esta droga poderia passar para a prole através do leite materno e promover efeitos tecido-específicos de proteção ao tecido hepático através da modulação do *status* redox (Peixoto-Silva et al., 2014). Portanto, partindo de um modelo de desmame precoce não-farmacológico, onde já foram identificados efeitos hepáticos a longo prazo (microesteatose e aumento do estresse oxidativo tecidual), realizamos o tratamento com a bromocriptina, diretamente nos filhotes, nos três últimos dias de lactação.

Durante o desenvolvimento neonatal, confirmamos a importância do aleitamento materno, mesmo na fase final da lactação, através da redução do peso corporal dos filhotes DP. Entretanto, o uso da bromocriptina, também desencadeou uma diminuição de peso dos filhotes, mesmo quando amamentados livremente, tornando-se inclusive, mais intensa quando os animais eram submetidos a restrição do aleitamento. A administração deste fármaco já se mostrou eficaz na redução da ingestão alimentar (Cincotta et al., 1989, 1993; Scislawski et al., 1999; Davis et al., 2006) e acreditamos que os efeitos na modulação do comportamento alimentar associada a adaptação forçada a alimentos sólidos, fazem com que a prole DP/BRO torne-se de maior risco nutricional, o que provavelmente contribuiu para o menor CNA em P21.

Nesta mesma idade, o tratamento farmacológico também foi capaz de desencadear uma queda na glicemia das proles C/BRO e DP/BRO, ou seja, sem que houvesse diferença entre o fato de estarem ou não consumindo o leite materno. Tem sido demonstrado os efeitos hipoglicemiantes da bromocriptina, sendo hoje, uma droga com grandes possibilidades terapêuticas no tratamento do DM tipo II (Weiland & Hilaire, 2013; Yogendra, 2010). Em seres humanos, a bromocriptina é capaz de reduzir os níveis glicêmicos (de jejum e pós-prandial) (Pijl et al., 2000), provando ser um possível tratamento para a restauração da homeostase glicêmica, quando usada de forma isolada ou como uma droga coadjuvante no tratamento com glipizida (ambos em doses sub-terapêuticas) (Kumar et al., 2013).

Passado o período da lactação, os animais que apresentaram um prejuízo no seu desenvolvimento biométrico no início da vida, tiveram uma compensação no crescimento e, em P120, não foram encontradas diferenças na MC e no CNA dos animais. Entretanto, as

avaliações de P200 corroboraram o fato do modelo de desmame precoce não-farmacológico aumentar o risco para a instalação do sobrepeso (Lima et al., 2014). De forma inédita, demonstramos os efeitos a longo prazo do tratamento com bromocriptina que impediu o excessivo ganho de peso ponderal, uma vez que as proles C/BRO e DP/BRO apresentaram uma média de peso corpóreo similar ao grupo C.

É possível que os efeitos da bromocriptina durante o período do desenvolvimento neonatal perdurem em função de um processo adaptativo, desencadeado em resposta a interferência precoce na modulação do tônus dopaminérgico, onde a bromocriptina já mostrou favorecer, no adulto, o controle do peso corporal através da regulação do balanço energético (Cincotta et al., 1997). Entretanto, ressalta-se que diante de um agravo metabólico representado pelo consumo de dieta hiperlipídica (experimento 2), a bromocriptina torna-se ineficaz neste controle do peso corporal, uma vez que não foram encontradas diferenças entre os animais HF e que todas estas proles tiveram maior peso quando comparadas a seus respectivos grupos com dieta padrão.

Considerando a composição corporal, verificamos que em P120 não foram encontradas diferenças nos compartimentos corporais (proteína e gordura total), inclusive nos depósitos viscerais. No entanto, observamos uma diferenciação quanto ao tamanho das células adiposas no grupo DP, mostrando que este grupo já apresenta uma hipertrofia dos adipócitos e que, principalmente, o tratamento com a bromocriptina foi capaz de reverter esta condição, tornando as células adiposas dos animais DP/BRO equiparáveis aos demais grupos. Em P200, observamos que o percentual de gordura corporal total tende a se elevar, contribuindo para o aumento de massa corporal observado nos animais do grupo DP, afinal estes animais apresentaram uma evidente tendência ao aumento deste compartimento, sendo muito provavelmente justificado pelo aumento da gordura visceral em detrimento da gordura subcutânea, comprovado inclusive, pela constatação do mecanismo de hipertrofia dos adipócitos da gordura retroperitoneal. Assim, como nos dados favoráveis de massa corporal, o tratamento com bromocriptina também se mostrou relevante na prevenção da adiposidade, afinal a gordura corporal, a MGV e o tamanho dos adipócitos dos grupos C/BRO e DP/BRO apresentaram resultados bastante semelhantes aos animais C.

Recentemente, foi demonstrado em células adiposas da linhagem 3T3-L1, que a bromocriptina possui um importante efeito anti-obesogênico através da atuação em receptores α -2 adrenérgicos. Seus efeitos seriam baseados na modulação negativa de diferentes genes envolvidos no mecanismo de lipogênese e a alteração da via metabólica intracelular, através do aumento de pAMPK1, que conseqüentemente, atenua a via de síntese de triacilglicerol,

favorecendo o mecanismo de beta-oxidação. Ademais, a bromocriptina reduziu a adipogênese através da inibição de fatores de crescimento específicos como PPAR γ , CEBP α e PPAR α (Mukherjee et al., 2013).

Entretanto, ao avaliarmos a descompensação no acúmulo de gordura oriunda do consumo de uma dieta hiperlipídica, observamos que todos os animais apresentam um aumento da adiposidade, mostrando que neste caso, a bromocriptina já não consegue prevenir o avanço do sobrepeso/obesidade. Através da análise morfológica, concluímos que diante da dieta hiperlipídica, todos os grupos (exceto o grupo C), tiveram aumento da adiposidade por hiperplasia, pois na comparação entre os grupos com diferentes dietas não visualizamos um aumento do tamanho da célula gordurosa nestes grupos. Neste caso, animais programados, independente se pelo desmame precoce ou pelo uso da bromocriptina, quando expostos a um novo agravo metabólico como a dieta, parecem desencadear uma resposta diferenciada, representada pela hiperplasia, na tentativa de minimizar as disfunções decorrentes da expansão da adiposidade. A sobreposição do mecanismo de hipertrofia em detrimento do crescimento celular (hiperplasia), como o que ocorreu em animais C, está mais relacionada ao decréscimo da sensibilidade insulínica; hipóxia tecidual e aumento do estresse intracelular, da apoptose e da inflamação (Klötting & Blüher, 2014). De alguma forma, tanto a bromocriptina, mas surpreendentemente o próprio desmame precoce, parecem proteger deste mecanismo fisiológico que a longo prazo pode se tornar deletério.

Apesar de sabermos que a adiposidade interfere diretamente na leptinemia, não foram encontradas diferenças nos valores plasmáticos de leptina em P120, assim como já mencionamos para a adiposidade. Porém aos 200 dias observamos que a prole DP se mostra hiperleptinêmica e que o seu tratamento com a bromocriptina conseguiu prevenir esta alteração, mesmo quando submetida a dieta hiperlipídica. A relação leptina/massa de tecido adiposo tem sido proposta por Paz-Filho et al. (2009) como um indicador da descompensação da Síndrome Metabólica. Quanto menor esta relação maior o número de componentes da Síndrome Metabólica estão presentes de uma forma mais grave. Assim, uma relação alta pode significar uma tentativa de atenuar as doenças associadas a Síndrome. No caso da dieta padrão, a resposta segue o padrão da leptinemia, ou seja o grupo DP apresenta a maior relação, enquanto os outros grupos não apresentam diferença, inclusive o DP/BRO. Isto se explica porque estes 3 grupos não apresentaram aumento da adiposidade que só foi verificada no grupo DP. Porém, quando submetidos a uma dieta hiperlipídica, todos os animais ficam com o mesmo grau de adiposidade, mas os animais controle apresentam um aumento na relação leptina/massa de tecido adiposo, quando comparamos aos grupo C em dieta controle.

Os outros grupos não apresentaram diferença estatística, mas curiosamente o grupo DP-HF teve a menor proporção em relação ao DP em dieta padrão. Quanto ao grupo DP/BRO-HF houve uma menor queda em relação ao grupo DP-BRO em dieta padrão. Porém, este grupo foi o único que apresentou a menor relação leptina/massa de tecido adiposo entre os 4 grupos estudados em dieta HF. Assim, a hipertrofia dos adipócitos parece estar relacionada com a sua capacidade de produzir mais leptina por massa de tecido adiposo, o que foi verificado nos grupos C-HF e no grupo DP.

Quanto ao estudo da homeostase glicêmica aos 120 dias de vida, somente evidenciamos uma intolerância a glicose em animais do grupo C/BRO. Condição esta, que permaneceu aos 200 dias, sendo seguido por animais do grupo DP que passaram a apresentar esta disfunção. Aqui se reforça mais uma vez, a condição benéfica do tratamento com a bromocriptina que possibilitou a melhora desta intolerância visualizado nos animais DP/BRO. Apesar da significância no teste estatístico do TOTG, ressaltamos que os demais resultados referentes aos parâmetros glicêmicos do grupo C/BRO encontram-se dentro da normalidade e equiparáveis aos valores dos animais C.

Quanto aos possíveis mecanismos de ação da bromocriptina no controle glicêmico, sugere-se uma melhora dos níveis de dopamina no núcleo supraquiasmático e ventromedial hipotalâmico, sendo esta normalização importante para o aumento da sensibilidade insulínica. Considerando, que mamíferos em situações de privação alimentar apresentam um estado de resistência insulínica e/ou intolerância a glicose para favorecer a sobrevivência, poderíamos considerar que o tratamento com a bromocriptina poderia ter se tornado mais eficaz na atenuação desta programação justamente na prole que apresentou maior risco nutricional durante o desenvolvimento neonatal (Defronzo, 2011). Entretanto, ressaltamos a necessidade de novos experimentos para comprovarmos este mecanismo.

A dieta hiperlipídica não permite a continuidade dos efeitos favoráveis da bromocriptina, pois ao comparamos os dois experimentos, todos os animais HF apresentam aumento do percentual de hemoglobina glicosilada e maior intolerância a glicose (exceto o grupo DP-HF que não apresentou aumento da área sob a curva no TOTG). Na glicemia de jejum as proles tratadas com bromocriptina foram as únicas a apresentar uma diferença estatística quando comparadas aos seus respectivos grupos com dieta padrão apresentando um discreto aumento da glicemia. Estes resultados demonstram a importância da composição dietética e refletem os efeitos deletérios da maior ingestão de lipídeos. Já foi descrito que o consumo deste macronutriente por ratos durante um período de 10 semanas consegue alterar de forma mais significativa a adiposidade e a homeostase glicêmica, do que quando estes

animais são submetidos a uma maior ingestão de carboidrato (especificamente frutose) (Zaman et al., 2011). Quanto a ineficiência da bromocriptina na melhora destes parâmetros frente a uma desajuste dietético, demonstramos que um possível tratamento para a obesidade e o *diabetes mellitus* deverá ser baseado em uma ação conjunta com as modificações no estilo de vida do indivíduo, ressaltando a recomendação da agência americana FDA que liberou o uso da bromocriptina para pacientes diabéticos como um co-adjuvante ao controle dietético e a prática de atividades físicas (Keche, 2010; Quianzon & Cheikh, 2012).

Consideramos que o uso da ração hiperlipídica se configurou como um importante diferencial, uma vez que a bromocriptina já se mostrou benéfica na redução da ingestão alimentar (Davis et. al, 2009; Thanos et. al, 2011). Numa outra etapa do nosso trabalho, propomos a realização de um desafio alimentar na idade adulta, onde encontramos interessantes resultados. Aos 120 dias de vida, não observamos diferenças no consumo de dieta padrão por um curto espaço de tempo, contudo ao serem desafiados com uma ração hiperlipídica, somente os animais tratados com bromocriptina se mostraram menos vorazes ao consumo desta dieta mais palatável. Na avaliação do consumo dentro de um ciclo escuro completo (12h), as proles tratadas com bromocriptina não mais exibiram esta redução no consumo alimentar de dieta hiperlipídica. Como houve um menor consumo da ração mais palatável no grupo C-HF, na comparação entre os experimentos, consideramos que a maior saciedade promovida pela dieta hipercalórica é uma justificativa para o seu comportamento alimentar. Como não foi observado comportamento semelhante nas proles programadas, sugerimos que estes animais, independente do tratamento com a bromocriptina, por não apresentarem uma redução no consumo alimentar, demonstram um comportamento mais compulsivos na continuidade de um estímulo.

Como a administração da droga pode interferir de maneira muito precoce nos receptores dopaminérgicos, sugerimos que mais estudos sobre a interferência da bromocriptina no sistema de recompensa cerebral devam ser executados, afinal comportamentos que se relacionam com atividades compulsivas, como a dependência a drogas, obesidade, entre outros, podem ser derivados de uma redução dos efeitos da dopamina. O foco neste tema é importante pois abre caminho para o tratamento da obesidade através da melhora da resposta a dopamina, ressaltando o mecanismo pelo qual a bromocriptina pode se comportar como um agente anorexigênico (Doknic et al., 2002).

Em P180, a saciedade se torna uma condição mais marcante no desafio alimentar, pois na avaliação entre as dietas observamos que todos os grupos experimentais, seja na avaliação a curto e longo prazo, apresentam uma redução do consumo de dieta hiperlipídica. Neste caso,

acreditamos que diferentemente do que ocorre em P120 onde os animais são expostos a dieta hiperlipídica pela primeira vez, em P180 observamos que a constante oferta desta da dieta pode promover uma redução na compulsividade ou na busca por novidades, limitando portanto, a avaliação do teste.

Considerando que alterações na homeostase glicêmica nos reportam a tecidos sensíveis à insulina, o presente estudo evidenciou que aos 120 dias de vida, não foram encontradas alterações no tecido hepático que representassem qualquer tipo de injúria, visto neste momento os animais ainda não demonstram grandes alterações metabólicas. No entanto, com o decorrer do experimento, observamos um aumento do conteúdo de TG hepático (avaliação bioquímica) somente no grupo DP e que a administração da dieta hiperlipídica favorece esse acúmulo em todos os grupos experimentais, com exceção do grupo DP. Apesar da modificação encontrada, não foram evidenciadas alterações no quantitativo das enzimas do sistema antioxidante e de marcadores do estresse oxidativo. Ressaltamos assim, a limitação deste estudo que não avaliou a atividade destas enzimas, assim como a histologia hepática para a total elucidação do efeito da bromocriptina na proteção hepática a doença não alcoólica do fígado gorduroso.

Portanto, a bromocriptina pode ser considerada um fator que pode influenciar a programação do metabolismo, atenuando, principalmente em animais com maior risco nutricional, alguns parâmetros metabólicos como o ganho de peso corporal, a adiposidade e leptinemia que contribuiriam para uma proteção das co-morbidades associadas a obesidade como as disfunções hepáticas. Contudo, devemos considerar que o controle dietético continuará sendo uma base fundamental no tratamento da obesidade e/ou síndrome metabólica uma vez que não conseguimos extrapolar as vantagens identificadas com a bromocriptina em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Reconhecemos as limitações técnicas do nosso estudo quanto a avaliação da atividade enzimática do sistema antioxidante e a avaliação histológica do tecido hepático, mas consideramos que este possa abrir novas perspectivas para realização de novos estudos, principalmente no pós-desmame imediato, que possibilitarão conhecer os potenciais terapêuticos desta droga no combate a obesidade e *diabetes mellitus*.

CONCLUSÃO

A primeira parte da Tese consistiu na execução de um protocolo experimental de desmame precoce farmacológico, no intuito de compreendermos a importância deste fator de *imprinting* no desencadeamento de doenças hepáticas associadas ao sobrepeso, já que o desmame precoce não-farmacológico apresenta esteatose hepática e aumento do estresse oxidativo. Evidenciamos que a transferência da bromocriptina pelo leite materno atenua a programação pelo desmame precoce não-farmacológico em relação a função hepática. Além disso, estes animais demonstraram uma modulação favorável do *status* redox no fígado e no plasma, contribuindo conseqüentemente, para o não desenvolvimento de esteatose hepática.

Na segunda parte da Tese, estabelecemos o tratamento neonatal com bromocriptina em filhotes que foram submetidos ao protocolo de desmame precoce não-farmacológico. Adicionalmente, investigamos se os possíveis efeitos benéficos permaneceriam frente a um novo agravo metabólico (consumo de dieta hiperlipídica na idade adulta). Novamente encontramos resultados que apontam para um efeito protetor da bromocriptina. Observamos que o tratamento neonatal com este fármaco impediu o ganho de peso corporal excessivo, a adiposidade, a hiperleptinemia e demonstramos a inibição do acúmulo de triglicerídeos no tecido hepático. No entanto, verificamos que tais efeitos não prevalecem frente a uma dieta hiperlipídica.

Assim, nosso estudo enfatiza a importância do aleitamento materno no intuito de minimizarmos o surgimento de doenças crônicas na idade adulta. Ademais, corroboramos o conceito de que a bromocriptina apresenta importante potencial terapêutico como um coadjuvante no tratamento de obesidade e/ou diabetes e pela primeira vez, sugerimos seu possível papel na prevenção da programação da obesidade pelo desmame precoce.

REFERÊNCIAS

- Agostoni C, Baselli L, Mazzoni MB. Early nutrition patterns and diseases of adulthood: a plausible link ?. *Eur J Intern Med.* 2013. 24(1):5-10.
- Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet.* 1986. 1:1077-81.
- Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MC, Alves SB, Reis AM, de Moura EG. Prolactin inhibition at the end of lactation programs for a central hypothyroidism in adult rat. *J Endocrinol.* 2008. 198(2): 331-37.
- Bonomo IT, Lisboa PC, Pereira AR, Passos MC, de Moura EG. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *J Endocrinol.* 2007. 192(2): 339-44.
- Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MC, Pazos-Moura CC, Reis AM, Moura EG. Prolactin inhibition in lactating rats changes leptin transfer through the milk. *Horm Metab Res.* 2005. 37: 220-25.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976. 72: 248-54.
- Buqué X, Aspichueta P, Ochoa B. Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis. *Rev Esp Enferm Dig.* 2008. 100(9): 565-78.
- Casimiro-Lopes G, Lisboa PC, Koury JC, Boaventura G, Passos MC, Moura EG. Maternal prolactin inhibition during lactation affects physical performance evaluated by acute exhaustive swimming exercise in adult rat offspring. *Horm Metab Res.* 2012. 44:123-29.
- Chaudie re J, Ferrari-Iliou R. Intracellular Antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol.* 1999. 37: 949-62.
- Cincotta AH, MacEachern TA, Meier AH. Bromocriptine redirects metabolism and prevents seasonal onset of obese hyperinsulinemic state in Syrian hamsters. *Am J Physiol.* 1993. 264(2 Pt 1): E285-93.
- Cincotta AH, Meier AH. Reductions of body fat stores and total plasma cholesterol and triglyceride concentrations in several species by bromocriptine treatment. *Life Sci.* 1989. 45(23): 2247-54.
- Concei o EPS, Franco JG, Oliveira E, Resende AC, Amaral TA, Peixoto-Silva N, Passos MC, Moura EG, Lisboa PC. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition role of insulin resistance. *J Nutr Biochem.* 2013. 24: 81-87.
- Concei o EPS, Moura EG, Trevenzoli IH, Peixoto-Silva N, Pinheiro CR, Younes-Rapozo V, Oliveira E, Lisboa PC. Neonatal overfeeding causes higher adrenal catecholamine content and basal secretion and liver dysfunction in adult rat. *Eur J Nutr.* 2013. 52(4): 1393-04.

Dabelea D, Hamman RF. Epidemiology of type 2 diabetes mellitus. In *type 2 Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. Lippincott Williams & Wilkins. 2004. 785-96.

Davis LM, Michaelides M, Cheskin LJ, Moran TH, Aja S, Watkins PA, Pei Z, Contoreggi C, McCullough K, Hope B, Wang GJ, Volkow ND, Thanos PK. Bromocriptine administration reduces hyperphagia and adiposity and differentially affects dopamine D2 receptor and transporter binding in leptin-receptor-deficient Zucker rats and rats with diet-induced obesity. *Neuroendocrinology*. 2009. 89(2):152-62.

Davis LM, Pei Z, Trush MA, Cheskin LJ, Contoreggi C, McCullough K, Watkins PA, Moran TH. Bromocriptine reduces steatosis in obese rodent model. *J Hepatol*. 2006. 45(3): 439-44.

DeFronzo RA. Bromocriptine: A Sympatholytic D2-Dopamine Agonist for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2011. 34(4): 789-94.

de Moura EG, Bonomo IT, Nogueira-Neto JF, de Oliveira E, Trevenzoli IH, Reis AM, Passos MC, Lisboa PC. Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. *J Physiol*. 2009. 587(Pt 20): 4919-29.

de Moura EG, Lisboa PC, Passos MC. Neonatal programming of neuroimmunomodulation – role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation*. 2008. 15(3): 176-88.

Dima A, Marinescu AG, Dima AC. Non-alcoholic fatty liver disease and the statins treatment. *Rom J Intern Med*. 2012. 50(1): 19-25.

Doknic M, Pekic S, Zarkovic M, Medic-Stojanoska M, Diequez C, Casanueva F, Popovic V. Dopaminergic tone and obesity: an insight from prolactinomas treated with bromocriptine. *Eur J Endocrinol*. 2002. 147(1): 77-84.

Dörner G. Environment-dependent brain differentiation and fundamental processes of life. *Acta Biol Med Ger*. 1974. 33: 129-48.

dos Santos Oliveira L, de Lima DP, da Silva AA, da Silva MC, de Souza SL, Manhães-de-Castro R. Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood. *Behav Processes*. 2011. 86(1): 75-80.

Dunmore SJ, Brown JE. The role of adipokines in β -cell failure of type 2 diabetes. *J Endocrinol*. 2013. 216: 37-45.

Fagundes ATS, Moura EG, Passos MCF, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, Trevenzoli IH, Garcia RM, Lisboa PC. Maternal low protein diet during lactation programmes the body composition and the glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr*. 2007. 98(5): 922-28.

Figueiredo MS, Passos MCF, Trevenzoli IH, Troina AA, Carlos AS, Alves Nascimento-Saba CC, Fraga MC, Manhães AC, de Oliveira E, Lisboa PC, de Moura EG. Adipocyte morphology and leptin signaling in rat offspring from mothers supplemented with flaxseed during lactation. *Nutrition*. 2012. 28(3): 307-15.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984. 105: 114-21.

Fraga-Marques MC, Moura EG, Silva JO, Claudio-Neto S, Pereira-Toste F, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. Effects of maternal hyperleptinaemia during lactation on memory/learning, anxiety-like and novelty-seeking behavioural traits of adult male rats. *Behav Brain Res.* 2010. 206(1): 147-50.

Fraga MC, Moura EG, Silva JO, Bonomo IT, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. Maternal prolactin inhibition at the end of lactation affects learning / memory and anxiety-like but not novelty-seeking in adult rat progeny. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011. 100(1): 165:73.

Franco JG, Lisboa PC, Lima NS, Amaral TA, Peixoto-Silva N, Resende AC, Oliveira E, Passos MC, Moura EG. Resveratrol attenuates oxidative stress and prevents steatosis and hypertension in obese rats programmed by early weaning. *J Nutr Biochem.* 2013. 24(6): 960-66.

Friis ML, Paulson OB, Hertz MM. Transfer of bromocriptine across the blood-brain barrier in man. *Acta Neurol Scand.* 1979 59: 88-95.

Gillman MW, Mantzoros CS. Breast-feeding, adipokines and childhood obesity. *Epidemiology.* 2007. 18(6): 730-32.

Gluckman PD, Hanson MA. Developmental plasticity and human diseases: research directions. *J Intern Med.* 2007. 261(5): 461-71.

Horta B, Bahl R, Martines J. Evidence of the long-term effects of breastfeeding - Systematic reviews and analyses. [Internet] [acesso em 2015 maio 7]. Disponível em: <www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9241595230/en/index.html >

Jang S, Lee CH, Choi KM, Lee J, Choi JW, Kim KA, Park CM. Correlation of fatty liver and abdominal fat distribution using a simple fat computed tomography protocol. *World J Gastroenterol.* 2011. 17(28): 3335-41.

Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, Napper A, Curtis R, DiStefano PS, Fields S, Bedalov A, Kennedy BK. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem.* 2005. 280: 17038-45.

Kar S, Bhandar B, Kavdia M. Impact of SOD in eNOS uncoupling: a two-edged sword between hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Free Radic Res.* 2012. 46: 1496-13.

Kassab A, Piwowar A. Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes. *Biochimie.* 2012. 94: 1837-48.

Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver diseases: A manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med.* 2008. 75(10): 721-28.

Kline AE, Massucci JL, Ma X, Zafonte RD, Dixon CE. Bromocriptine reduces lipid peroxidation and enhances spatial learning and hippocampal neuron survival in a rodent model of focal brain trauma. *J Neurotrauma*. 2004. 21:1712-22.

Klötting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014. 15(4): 277-87.

Kramer MS, Kakuma R. Optimal duration of exclusive breastfeeding. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012. DOI: 10.1002/14651858.CD003517.pub2.

Kumar VSH, MBV, ANP, Aithal S, Baleed SR, Patil UN. Bromocriptine, a dopamine (D2) receptor agonist, in combination with glipizide in sub therapeutic doses to ameliorate hyperglycaemia. *J Clin Diagn Res*. 2013. 7(9): 1904-17.

Lei Federal N° 11.770. [Internet] [acesso em 2015 out 7]. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/lei/111770.htm>

Lei Federal N° 11.265. [Internet] [[acesso em 2015 maio 7]. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Lei/L11265.htm>

Leshner AI, Litwin VA, Squibb RL. A simple method for carcass analysis. *Physiology & Behavior*. 1972. 9(2): 281-82.

Lim JH, Kim KM, Kim SW, Hwang O, Choi HJ. Bromocriptine activates NQO1 via Nrf2-PI3K/Akt signaling: novel cytoprotective mechanism against oxidative damage. *Pharmacol Res*. 2008. 57(5): 325-31.

Lim JH, Kim SS, Boo DH, No H, Kang BY, Kim EM, Hwang O, Choi HJ. Protective effect of bromocriptine against BH4-induced Cath.a cell death involving up-regulation of antioxidant enzymes. *Neurosci Lett*. 2009. 451(3): 185-89.

Lima Nda S, Franco JG, Peixoto-Silva N, Maia LA, Kaezer A, Felzenszwalb I, de Oliveira O, de Moura EG, Lisboa PC. *Ilex paraguariensis* (yerba mate) improves endocrine and metabolic disorders in obese rats primed by early weaning. *Eur J Nutr*. 2014. 53(1): 73-82.

Lima NS, Moura EG, Franco JG, Pinheiro CR, Pazos-Moura CC, Cabanelas A, Carlos AS, Nascimento-Saba CC, de Oliveira E, Lisboa PC. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res*. 2013. 45(1): 22-30.

Lima NS, de Moura EG, Passos MC, Nogueira Neto FJ, Reis AM, de Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning causes undernutrition for a short period and programs some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. *British Journal of Nutrition*. 2011. 105(9): 1405-13.

Lima NS, Moura EG, Franco JG, Pinheiro CR, Pazos-Moura CC, Cabanelas A, Carlos AS, Nascimento-Saba CC, de Oliveira E, Lisboa PC. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res*. 2013. 45(1): 22-30.

- Lisboa PC, Oliveira E, Fagundes AT, Santos-Silva AP, Conceição EP, Passos MC, Moura EG. Postnatal low protein diet programs leptin signaling in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and pituitary TSH response to leptin in adult male rats. *Horm Metab Res*. 2012. 44(2): 114-22.
- Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Methods*. 2001. 25:402-08.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951. 193: 265-75.
- Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp*. 1991. 156: 38-50.
- Lucas A. Programming not metabolic imprinting. *Am J Clin Nutr*. 2000. 71(2): 602.
- Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, Gitto E, Arrigo T. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2014. 16(1): 378-00.
- Matherly SC, Puri P. Mechanisms of simple hepatic steatosis: not so simple after all. *Cin Liver Dis*. 2012. 16(3): 505-24.
- Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract*. 2013. 7(5): e330-41.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985. 28(7): 412-19.
- Metges CC. Early nutrition and later obesity: animal models provide insights into mechanisms. *Adv Exp Med Biol*. 2009. 646: 105-12.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: Promovendo a alimentação saudável. Brasília. 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. Organização Pan Americana da Saúde. Guia alimentar para crianças menores de 2 anos. Brasília. 2002
- Mirkou A, Suchovsky D, Gouraud A, Gillet A, Bernard N, Descotes J, Vial T. [Prescription of ergot derivatives for lactation inhibition in France: Current practices]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2012. 41(2):167-73.
- Mukherjee R, Yun JW. Bromocriptine inhibits adipogenesis and lipogenesis by agonistic action on α -2-adrenergic receptor in 3T3-L1 adipocyte cells. *Mol Biol Rep*. 2013. 40(5): 3783-92.

- Nade VS, Kawale LA, Todmal UB, Tajanpure AB. Effect of bromocriptine on cardiovascular complications associated with metabolic syndrome in fructose fed rats. *Indian J Pharmacol.* 2012. 44(6): 688-93.
- Nobre JL, Lisboa PC, Lima NS, Franco JG, Nogueira Neto JF, de Moura EG, de Oliveira E. Calcium supplementation prevents obesity, hyperleptinemia and hyperglycemia in adult rats programmed by early weaning. *Br J Nut.* 2012. 107(7): 979-88.
- Olefsky JM, Glass KC. Macrophages, inflammation and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010. 72: 219-46.
- Oliveira E, Moura EG, Santos-Silva AP, Pinheiro CR, Claudio-Neto S, Chistian Manhães A, Passos MC, Lisboa PC. Neonatal hypothyroidism caused by maternal nicotine exposure is reversed by higher T3 transfer by milk after nicotine withdraw. *Food Chem Toxicol.* 2011. 49(9): 2068-73.
- Passos MA, Passos MC, Oliveira E, Trotta PA, Nogueira-Neto JF, Bonomo IT, Lisboa PC, de Moura EG. Maternal prolactin inhibition during lactation is associated to renal dysfunction in their adult rat offspring. *Horm Metab Res.* 2011. 43(9): 636-41.
- Paz-Filho GJ, Volaco A, Suplicy HL, Radominski RB, Boquszewski CL. Decrease in leptin production by the adipose tissue in obesity associated with severe metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009. 53(9): 1088-95.
- Peixoto-Silva N, Conceição EP, Carvalho JC, Lima NS, Nogueira-Neto JF, de Oliveira E, Moura EG, Lisboa PC. Does bromocriptine play a role in decreasing oxidative stress for early weaned programmed obesity? *Life Sci.* 2014. 95(1): 14-21.
- Pijl H, Ohashi S, Matsuda M, Miyazaki Y, Mahankali A, Kumar V, Piper R, Iozzo P, Lancaster JL, Cincotta AH, De Fronzo RA. Bromocriptine: a novel approach to the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2000. 23(8): 1154-61.
- Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev.* 2008. 28(4): 569-31.
- Popovic M, Janicijevic-Hudomal S, Kaurinovic B, Rasic J, Trivic S. Effects of various drugs on alcohol-induced oxidative stress in the liver. *Molecules.* 2008. 13: 2249-59.
- Portal Brasil. [Internet] [acesso em 2015 maio 7]. Disponível em: <www.brasil.gov.br/saude/2011/10/amamentacao-traz-beneficios-para-a-mae-e-o-bebe>
- Quianzon CC, Cheikh IE. History of current non-insulin medications for diabetes mellitus. *J Community Hosp Intern Med Perspect.* 2012. 2(3).
- Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976. 295(7): 349-53.
- Roberts CK, Berger JJ, Barnard RJ. Long-term effects of diet on leptin, energy intake, and activity in a model of diet-induced obesity. *J Appl Physiol.* 2002. 93: 887-93.

Salvino F, Liguori SA, Fissore MF, Oggero R. Breast milk hormones and their protective effect on obesity. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2009. DOI: 10.1155/2009/327505

Sandes AR, Nascimento C, Figueira J, Gouveia R, Valente S, Martins S, Correia S, Rocha E, Da Silva LJ. [Breastfeeding: prevalence and determinant factors]. *Acta Med Port*. 2007. 20(3): 193-00.

Santos-Silva AP, Lisboa PC, Pinheiro CR, Maia LA, Peixoto-Silva N, Abreu-Villaça Y, Moura EG, Oliveira E. Maternal tobacco smoke exposure during lactation inhibits catecholamine production by adrenal medulae in adult rat offspring. *Horm Metab Res*. 2012. 44(7): 550-54.

Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970. 26: 57-60.

Sloan S, Gildea A, Stewart M, Sneddon H, Iwaniec D. Early weaning is related to weight and rate of weight gain in infancy. *Child Care Health Dev*. 2008. 34(1): 59-64.

Stansbie D, Browsey RW, Crettaz M, Denton RM. Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *The Biochemical Journal*. 1976. 160(2): 413-16.

Takamura T, Misu H, Ota T, Kaneko S. Fatty liver as a consequence and cause of insulin resistance: Lessons from type 2 diabetic liver. *Endocr J*. 2012. 59(9): 745-63.

Taveras EM, Li R, Grummer-Strawn L, Richardson M, Marshall R, Rêgo VH, Miroshnik I, Lieu TA. Opinions and practices of clinicians associated with continuation of exclusive breastfeeding. *Pediatrics*. 2004. 113(4): 283-90.

Thanos PK, Cho J, Kim R, Michaelides M, Primeaux S, Bray G, Wang GJ, Volkow ND. Bromocriptine increased operant responding for high fat food but decreased chow intake in both obesity-prone and resistant rats. *Behav Brain Res*. 2011. 217(1): 165-70.

Trevenzoli IH, Rodrigues AL, Oliveira E, Thole AA, Carvalho L, Figueiredo MS, Toste FP, Neto JF, Passos MC, Lisboa PC, Moura EG. Leptin treatment during lactation programs leptin synthesis, intermediate metabolism, and liver microsteatosis in adult rats. *Horm Metab Res*. 2010. 42(7): 483-90.

Trevenzoli IH, Valle MM, Machado FB, Garcia RM, Passos MC, Lisboa PC, Moura EG. Neonatal hyperleptinemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J Physiol*. 2007. 580: 629-37.

Troina AA, Figueiredo MS, Passos MC, Reis AM, Oliveira E, Lisboa PC, Moura EG. Flaxseed bioactive compounds change milk, hormonal and biochemical parameters of dams and offspring during lactation. *Food Chem Toxicol*. 2012. 50: 2388-96.

Vafa M, Moslehi N, Afshari S, Hossini A, Eshraghian M. Relationship between breastfeeding and obesity in childhood. *J Health Popul Nutr*. 2012. 30(3): 303-10.

Wang XC, Sun CH, Zhang XH, Zhao LJ, Zheng J. [Effects of early weaning on the blood glucose, blood lipid and hormone of rat fed a high fat diet]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2005. 34(3): 331-33.

Weibel E. *Stereological Methods. Practical methods for biological morphometry*. London: Academic Press. 1979. 415 p.

Weiland CM, Hilaire ML. Bromocriptine mesylate (Cycloset) for type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician*. 2013. 87(10):718-20.

World Health Organization (WHO). 10 facts on breastfeeding. Disponível em: <www.who.int/features/factfiles/breastfeeding/en/>2012.

Wu TC, Chen PH. Health consequences of nutrition in childhood and early infancy. *Pediatr Neonatol*. 2009. 50(4): 135-42.

Yang Z, Huffman SL. Nutrition in pregnancy and early childhood and associations with obesity in developing countries. *Matern Child Nutr*. 2013. 9(1): 105-19.

Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol*. 1982. 243(6): H941-47.

Yogendra K. Bromocriptine mesylate: Food and Drug Administration approved new approach in therapy of non-insulin dependant diabetes mellitus with poor glycemic control. *J Pharm Bioallied Sci*. 2010. 2(2): 148-50.

Yoshikawa T, Minamiyama Y, Naito Y, Kondo M. Antioxidant properties of bromocriptine, a dopamine agonist. *J Neurochem*. 1994. 62: 1034-38.

Younes-Rapozo V, de Moura EG, da Silva Lima N, Barradas PC, Manhães AC, de Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning is associated with higher neuropeptide Y (NPY) and lower cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in paraventricular nucleus (PVN) at adulthood. *Br J Nutr*. 2012. 108: 2286-95.

Younes-Rapozo V, Moura EG, Manhães AC, Peixoto-Silva N, de Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning by maternal prolactin inhibition leads to higher neuropeptide Y and astroglialosis in the hypothalamus of the adult rat offspring. *Br J Nutr*. 2015. 22:1-10.

Zaman MQ, Leray V, Le Bloc'h J, Thorin C, Ouquerram K, Nguyen P. Lipid profile and insulin sensitivity in rats fed with high-fat or high-fructose diets. *Br J Nutr*. 2011. 106(1): S206-10.