



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

Janaine Cavalcanti Carvalho da Silva

**Papel da exposição neonatal a bromocriptina (agonista dopaminérgico  
tipo 2) sobre o perfil hormonal e metabólico de ratos**

Rio de Janeiro

2016

Janaine Cavalcanti Carvalho da Silva

**Papel da exposição neonatal a bromocriptina (agonista dopaminérgico tipo 2) sobre o perfil hormonal e metabólico de ratos**

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.

Orientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Rio de Janeiro

2016

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

S586 Silva, Janaine Cavalcanti Carvalho da.

Papel da exposição neonatal a bromocriptina (agonista dopaminérgico tipo 2) sobre o perfil hormonal e metabólico de ratos / Janaine Cavalcanti Carvalho da Silva. – 2016.

97 f.

Orientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Lactação – Animais – Teses. 2. Transtorno da nutrição do lactante. 3. Bromocriptina. 4. Metabolismo – Regulação – Teses. 5. Leptina. 6. Tireóide – Teses. I. Moura, Egberto Gaspar de. II. Silva, Patrícia Cristina Lisboa da. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 613.24

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

---

Assinatura

---

Data

Janaine Cavalcanti Carvalho da Silva

**Papel da exposição neonatal a bromocriptina (agonista dopaminérgico tipo 2) sobre o perfil hormonal e metabólico de ratos**

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.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2016.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra Penha Cristina Barradas

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro

Universidade Estadual de Campinas

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo Augusto Reis

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais, exemplo de honestidade e determinação, educaram-me e ensinaram-me os valores éticos e humanos ao longo da vida. Essas pessoas com firmeza guiaram-me e incentivaram-me a prosseguir com humildade, respeito e perseverança. As minhas irmãs e meu sobrinho, meus pedacinhos do céu, sem os quais eu não seria completa. E ao meu esposo por todo amor, compreensão e paciência, além de ser um ótimo IC.

## AGRADECIMENTOS

É difícil descrever, em palavras, os sentimentos ao finalizar a tese, o qual foi um processo de amadurecimento pessoal, profissional e acadêmico. Em meio a muitas sensações vivenciadas nesta fase está a certeza da conquista de mais um ideal, o qual só foi possível com muita determinação, perseverança e apoio de muitas pessoas importantes, sem as quais este trabalho não seria concluído.

A Deus. Dedico a Ti por ter derramado suas bênçãos sobre mim, e permitido essa vitória em minha vida, pois, “Tudo posso Naquele que me fortalece”

Gostaria de deixar aqui os meus mais sinceros agradecimentos, em especial, ao meu orientador, professor Egberto, pela oportunidade dada, pelos ensinamentos, conselhos, pelas valiosas sugestões e pela sua preocupação em formar profissionais capacitados e éticos. A minha co-orientadora Patrícia Lisboa, por sempre me guiar quando eu parecia perdida, por todo incentivo e até pelos puxões de orelha, e não podia esquecer de agradecer por deixar nossas manhãs mais perfumadas. A professora Elaine pela paciência, amizade e pela paz que transmite.

As amigas do LFE... faltam palavras para descrever as pessoas que contribuíram para meu crescimento e amadurecimento profissional e pessoal ao longo desses anos. A Mabel, por me receber de braços abertos, pela amizade dentro e fora do laboratório e pelo exemplo de fé. A Nay, sempre convicta de seus ideais, pelo seu jeito sincero e acolhedor, pelos momentos compartilhados e ajuda mútua que tivemos ao longo desses anos, Jessica, pela sua amizade incondicional e por seus “Goooooood moooooorning” e dancinhas matinais, sempre me fazendo sorrir mesmo quando o mundo estava uma bagunça. A equipe Soka-soka (Fernanda e Camila), o que seria de mim sem a maturidade de vocês ? obrigada por todos os risos e todas as histórias compartilhadas. Vivi, exemplo de perseverança e simplicidade, com quem tive o imenso prazer de conviver durante esses anos e pelo apoio incondicional. Obrigada Vivix!!! A Vanessinha, pela presteza e simpatia, sempre pronta pra qualquer parada. A Lu, que com seu jeito calmo consegue tranquilizar qualquer pessoa. A Aninha, por toda a amizade, e por sempre está presente mesmo distante. A Cintinha, pela sua forma extrovertida e compromissada de dividir conhecimentos. A Nat e Liginha, por toda ajuda e força dadas mesmo na distância. Formamos um grande bonde !!!

Aos alunos de pós-graduação Dayse, Deysla, Ellen, Patrícia, Thamara e Xu. Foi muito, muito agradável ter trabalhado com vocês.

Aos meus amigos de longe e de perto, Thaisa, Wayde, Monique, Kyllderes, Lícia, Cynthia e Taysa, por não deixar de torcer por mim um só minuto, sempre pensando positivo e me fazendo acreditar que no final tudo dá certo.

Ao bioterista Ulisses pelo cuidado com os animais.

E por fim, agradeço aos animais do laboratório. Eles foram indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

" A cada dia Deus nos dá uma tela nova,  
quem escolhe as cores somos nós"

*Frei Clemente Kesselmeier*



## RESUMO

CARVALHO, Janaine Cavalcanti. *Papel da exposição neonatal a bromocriptina (agonista dopaminérgico tipo 2) sobre o perfil hormonal e metabólico de ratos*. 2016. 97 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A inibição de prolactina materna no final da lactação com uso de bromocriptina (BRO), aumenta a transferência de leptina através do leite e causa hiperleptinemia e desnutrição da prole ao desmame (PN21), enquanto na idade adulta (PN180) leva ao aumento da gordura visceral, dislipidemia, resistência a leptina e a insulina, hipotireoidismo, hipoprolactinemia, hipercorticosteronemia e aumento do conteúdo de catecolaminas na adrenal, NPY hipotalâmico e ansiedade. Sabendo que algumas dessas alterações são encontradas no modelo de hiperleptinemia neonatal, é concebível que algumas dessas alterações estejam associadas ao aumento da passagem de leptina através do leite. Não podemos ainda descartar o fato de que a BRO também é transferida pelo leite. Assim, o nosso primeiro objetivo (Experimento 1) foi avaliar no modelo de hipoprolactinemia materna, a presença de um segundo pico de leptina na prole em PN30, como aquele que ocorre no modelo de hiperleptinemia neonatal. O segundo objetivo da nossa pesquisa (Experimento 2) foi avaliar os efeitos à longo prazo da BRO, injetando-a diretamente nos filhotes. Experimento 1: ratas lactantes foram tratadas com bromocriptina (BRO), 0,5mg duas vezes ao dia ou metanol-salina (CON) durante os 3 últimos dias de lactação. Os animais foram sacrificados em PN22 e PN30. Experimento 2: ratos machos receberam BRO, 0,1µg uma vez ao dia, ou metanol-salina (CON), do dia pós natal 1 ao 10º ou do dia pós natal 11º ao 20º. Os animais foram sacrificados em PN180. Os animais do experimento 1 apresentaram em PN22 menor peso, ingestão, glicemia e expressão do RNAm de leptina, porém maior sensibilidade hipotalâmica a leptina. Em PN30 os animais apresentaram menor comprimento e gordura mesentérica, com maior expressão do RNAm de leptina nesse tecido acompanhada de hiperleptinemia, hiperglicemia, maior colesterol plasmático e hepático, e diminuição de HDL-c. Os animais do experimento 2 que receberam BRO em PN1-10, apresentaram aos 180 dias menor ingestão, hipoprolactinemia, maior expressão de POMC núcleo no arqueado (ARC), maior conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) na área tegmental ventral (VTA), de dopa decarboxilase (DDc), receptor D2 e receptor opióide-µ no núcleo accumbens (NAc) além de aumento de ansiedade. Observamos também menor ação da leptina, TRH, TSH, T3, Dio1, GPDm e UCP-1. Os animais que receberam BRO em PN11-20, apresentaram na idade adulta, maior ingestão alimentar e hipoprolactinemia, aumento na pressão arterial, hipercorticosteronemia, menor expressão de POMC no ARC, menor conteúdo de TH no VTA e do transportador de dopamina (DAT) no NAc além de menor ansiedade, maior OBR-b, TRH, T3, Dio2, GPDm e UCP-1. Em conclusão, semelhante ao modelo de hiperleptinemia, o pico secundário de leptina em PN30 sugere um papel crucial da leptina como fator de *imprinting* no modelo de hipoprolactinemia materna. Já a exposição direta a BRO no início da vida mostrou-se deletéria em longo prazo, causando distúrbios metabólicos, hormonais, dopaminérgico e comportamental, sendo estes dependentes do período do desenvolvimento em que o insulto é causado.

Palavras-chave: Bromocriptina. Lactação. Programação. Plasticidade. Hormônios.

## ABSTRACT

CARVALHO, Janaine Cavalcanti. *Role of neonatal bromocriptine exposure (type 2 dopaminergic agonist) upon hormonal and metabolic profiles of rats*. 2016. 97 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The maternal prolactin inhibition at the end of lactation, using bromocriptine (BRO), increases the leptin transfer through the milk and causes hyperleptinemia and malnutrition in the pups at weaning (PN21), while at adulthood (PN180) leads to higher visceral fat, dyslipidemia, leptina and insulin resistance, hypothyroidism, hypoprolactinemia, hypercorticosteronemia and increase of catecholamine adrenal content, hypothalamic NPY and anxiety. Since it is known that some of these changes are found in the model of neonatal hyperleptinemia, it is possible that these changes are associated with the higher leptin transfer via milk. Also, we cannot discard the fact that BRO is transferred through the milk. Thus, our first aim (Experiment 1) was to evaluate in the maternal hypoprolactin model, the presence of a second peak of leptin at PN30, as already showed in the model of neonatal hyperleptinemia. The second aim of our research (Experiment 2) was to evaluate the long-term effects of the BRO, directly injected in the pups. Experiment 1: lactating rats were treated with bromocriptine (BRO), 0.5mg twice a day or methanol-saline (CON) during the last 3 days of lactation. The animals was killed on PN22 and PN30. Experiment 2: male rats received BRO, 0.1µg once daily, (BRO) or methanol-saline (CON), from postnatal day 1 to 10 or from postnatal day 11 to 20, the animals was killed on PN180. The animals of experiment 1 showed at PN22 lower body mass, food intake, glycemia and leptin mRNA expression, and higher hypothalamic leptin sensitivity. At PN30 the animals showed lower body length and mesenteric fat, but with more leptin mRNA expression in this tissue, hyperleptinemia, hyperglycemia, higher plasma and hepatic cholesterol, and lower HDL-c. The animals of experiment 2 that received BRO at PN1-10, showed at PN180 lower food intake, hypoprolactinemia, higher POMC in the arcuate nucleus (ARC), higher tyrosine hydroxylase (TH) content in the VTA, higher Dopa Decarboxylase (DDc), D2R and µ-Opioid receptor in the NAc, besides more anxiety. Lower leptin action, lower TRH, TSH, T3, Dio1, mGPD and UCP-1 were also detected. The animals the received BRO at PN11-20, showed at adulthood, higher food intake and hyperprolactinemia, higher blood pressure, hypercorticosteronemia, lower POMC in the ARC, lower TH in the VTA and lower dopamine transporter (DAT) in the NAc, besides less anxiety, higher OBR-b, TRH, T3, higher Dio2, mGPD and UCP1. In conclusion, similar to the hyperleptinemia model, the secondary peak of leptin at PN30 suggests a crucial role of leptin as an *imprinting* factor in the model of maternal hypoprolactinaemia. The direct BRO exposure during neonatal life is deleterious, inducing metabolic and hormone disorders as well as dopaminergic and behavior dysfunction, which are dependent on the period of development in which the insult is caused.

Keywords: Bromocriptine. Lactation. Programming. Plasticity. Hormones.

## LISTA DE FIGURAS

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 1 –  | Vias dopaminérgicas.....   | 24 |
| Figura 2 –  | Comparação do desenvolvimento neuronal entre o ser humano e roedor e desenvolvimento pós-natal do sistema dopaminérgico.....   | 27 |
| Figura 3 –  | Modelo experimental do tratamento materno com BRO.....   | 31 |
| Figura 4 –  | Modelo experimental da exposição neonatal a BRO.....   | 32 |
| Figura 5 –  | Puchs cerebrais.....   | 37 |
| Figura 6 –  | Parâmetros biométricos em PN22 e PN30 .....  | 44 |
| Figura 7 –  | Perfil leptinêmico .....   | 45 |
| Figura 8 –  | Expressão da via da leptina e do peptídeo NPY.....   | 46 |
| Figura 9 –  | Glicemia e insulinemia .....   | 47 |
| Figura 10 – | Perfil lipídico .....  | 48 |
| Figura 11 – | Colesterol hepático e TGO .....  | 49 |
| Figura 12 – | Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO na ingestão, peso e MGV .....   | 50 |
| Figura 13 – | Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre o perfil glicídico .....  | 52 |
| Figura 14 – | Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre pressão sanguínea, batimento cardíaco, corticosterona plasmática e conteúdo e secreção de catecolaminas ..... | 53 |
| Figura 15 – | Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre a leptina plasmática e a expressão da via da leptina no ARQ e dos neuropeptídios .....                        | 55 |
| Figura 16 – | Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e os parâmetros metabólicos do hormônio da tireoide .....                 | 57 |
| Figura 17 – | Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre a expressão de TH no VTA. ....  | 58 |
| Figura 18 – | Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre a expressão da via da dopamina no NAc .....   | 59 |
| Figura 19 – | Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre a expressão da via da dopamina no NAc .....   | 61 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 20 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), na ingestão, peso e MGV .....  | 62 |
| Figura 21 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre o perfil glicídico .....   | 64 |
| Figura 22 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre pressão sanguínea, batimento cardíaco, corticosterona plasmática e conteúdo e secreção de catecolaminas..... | 65 |
| Figura 23 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre a leptina plasmática e a expressão da via da leptina no ARQ e dos neuropeptídios .....                       | 67 |
| Figura 24 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e os parâmetros metabólicos do hormônio da tireoide .....                | 69 |
| Figura 25 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre a expressão de TH no VTA .....   | 71 |
| Figura 26 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre a expressão da via da dopamina no NAc.....   | 72 |
| Figura 27 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre a expressão da via da dopamina no DS .....   | 74 |
| Figura 28 – Efeitos do tratamento com neonatal com BRO, no início (PN1-10) e no final da lactação (PN11-20) sobre o comportamento no LCE e CA .....  | 76 |

## LISTA DE TABELAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabela 1 – | Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO, sobre o perfil lipídico no plasma e no fígado em ratos machos em PN180.....    | 51 |
| Tabela 2 – | Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre o perfil lipídico no plasma e no fígado em ratos machos em PN180 ..... | 63 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|        |   |
|--------|---|
| ARC    | Núcleo arqueado                                     |
| BRO    | Bromocriptina                                       |
| CON    | Controle  |
| D1     | Receptor de dopamina D1                             |
| D2     | Receptor de dopamina D1                             |
| DAT    | Transportador de dopamina                           |
| DDc    | Dopa decarboxilase                                  |
| Dio1   | Desiodase tipo 1                                    |
| Dio2   | Desiodase tipo 2                                    |
| DNA    | Ácido desoxirribonucleico                           |
| ERK1/2 | <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>       |
| GH     | Hormônio do crescimento                             |
| GPDm   | Alfa-glicerofosfato desidrogenase mitocondrial      |
| HDL-c  | Lipoproteína de alta densidade                      |
| JAK-2  | Janus kinase 2                                      |
| NAc    | Núcleo accumbens                                    |
| NPY    | Neuropeptídeo Y                                     |
| Obr-b  | Receptor de leptina                                 |
| PN     | Pós-natal   |
| POMC   | Pró-opiomelanocortina                               |
| PRL    | Prolactina  |
| PVN    | Núcleo paraventricular                              |
| SNC    | Sistema Nervoso Central                             |
| SOCS-3 | Supressor de sinalização de citocina 3              |
| STAT-3 | Signal Transducers and Activators of Transcription  |
| T3     | Triiodotironina                                     |
| T4     | Tiroxina  |
| TDAH   | Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade |
| TH     | Tirosina hidroxilase                                |
| TOTG   | Teste de tolerância oral a glicose                  |

|       |                                    |
|-------|------------------------------------|
| TRH   | Hormônio liberador de tireotrofina |
| TSH   | Hormônio Estimulante da Tireóide   |
| UCP-1 | Proteína desacopladora 1           |
| VTA   | Área Tegumentar Ventral            |

## SUMÁRIO

|        |  |    |
|--------|--|----|
|        | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 17 |
| 1      | <b>REVISAO DE LITERATURA</b> .....   | 19 |
| 1.1    | <b>Programação Metabólica</b> .....  | 19 |
| 1.2    | <b>Modelo experimental de programação pela hipoprolactinemia materna.</b>  | 21 |
| 1.3    | <b>Sistema dopaminérgico</b> .....   | 22 |
| 1.4    | <b>Agonista dopaminérgico: bromocriptina (BRO)</b> .....   | 24 |
| 1.5    | <b>Breve comparação entre os períodos críticos de desenvolvimento do sistema nervoso entre humanos e roedores</b> .....    | 26 |
| 2      | <b>JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....   | 28 |
| 2.1    | <b>Relevância do estudo e objetivo geral</b> .....   | 28 |
| 2.2    | <b>Objetivos específicos</b> .....   | 28 |
| 3      | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 30 |
| 3.1    | <b>Modelo experimental</b> .....   | 30 |
| 3.2    | <b>Biometria e controle da ingestão alimentar</b> .....  | 33 |
| 3.3    | <b>Testes comportamentais</b> .....  | 33 |
| 3.3.1  | <u>Labirinto em cruz elevado (LCE)</u> .....   | 33 |
| 3.3.2  | <u>Campo aberto (CA)</u> .....   | 34 |
| 3.4    | <b>Aferição da pressão arterial</b> .....  | 35 |
| 3.5    | <b>Teste de tolerância oral a glicose (TOTG)</b> .....   | 35 |
| 3.6    | <b>Eutanásia</b> .....   | 36 |
| 3.6.1  | <u>Isolamento das regiões cerebrais</u> .....  | 36 |
| 3.7    | <b>Massa de Gordura Visceral (MGV)</b> .....   | 37 |
| 3.8    | <b>Dosagem hormonal</b> .....  | 38 |
| 3.9    | <b>Dosagem do perfil lipídico</b> .....  | 38 |
| 3.10   | <b>Dosagem hepática de triglicérido e colesterol</b> .....   | 39 |
| 3.11   | <b>Dosagem do conteúdo e da secreção de catecolaminas: experimento 2</b> .....   | 39 |
| 3.11.1 | <u>Dosagem de catecolaminas totais</u> .....   | 39 |
| 3.11.2 | <u>Secreção de catecolaminas</u> .....   | 40 |
| 3.12   | <b>Determinação da atividade <math>\alpha</math>-glicerofosfato desidrogenase mitocondrial (GPDm): experimento 2</b> ..... | 40 |



|       |   |           |
|-------|---|-----------|
| 3.13  | <b>Análise do conteúdo das proteínas por Western Blotting: experimento 2 ...</b>            | <b>41</b> |
| 3.14  | <b>Análise de expressão gênica por RT-PCR .....</b>   | <b>42</b> |
| 3.15  | <b>Análise estatística .....</b>  | <b>43</b> |
| 4     | <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>44</b> |
| 4.1   | <b>Experimento 1: tratamento materno com BRO nos três últimos dias de lactação .....</b>    | <b>44</b> |
| 4.2   | <b>Experimento 2: tratamento neonatal com BRO durante a lactação .....</b>                  | <b>49</b> |
| 4.2.1 | <u>Animais tratados com BRO no início da lactação (PN1-10).....</u>                         | <b>49</b> |
| 4.2.2 | <u>Animais tratados com BRO no final da lactação (PN11-20).....</u>                         | <b>62</b> |
| 4.2.3 | <u>Efeito do tratamento com BRO no final da lactação sobre o sistema dopaminérgico.....</u> | <b>70</b> |
| 4.3   | <b>Efeito do BRO-tratamento no comportamento .....</b>                                      | <b>75</b> |
| 5     | <b>DISCUSSÃO .....</b>  | <b>77</b> |
|       | <b>CONCLUSÃO .....</b>  | <b>83</b> |
|       | <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>84</b> |

## INTRODUÇÃO

Durante os períodos de desenvolvimento considerados críticos, como as fases fetal e pós-natal, mudanças nutricionais, hormonais ou ambientais podem atuar como fatores de *imprinting* que através de modificações epigenéticas têm o potencial de causar alterações fenotípicas a longo prazo; tal fenômeno é denominado programação metabólica ou plasticidade ontogenética (Lucas, 1994; Barker, 1993; Moura & Passos, 2005; Gluckman & Hanson, 2007). Caso o fator de *imprinting* perdure ao longo da vida, o indivíduo se tornará melhor adaptado. Do contrário, se o estímulo inicial for transitório, poderá resultar em um indivíduo mais propício ao desenvolvimento de doenças na vida adulta. Dentre esses períodos considerados críticos, destaca-se a lactação, que em roedores é quando ocorre seu desenvolvimento cognitivo e neurológico (de Moura e Passos, 2005).

A desnutrição materna causa hipoprolactinemia e hiperleptinemia na mãe durante a lactação (Lisboa et al, 2006) e programa a prole adulta para desenvolver hiperleptinemia, resistência a leptina e alguns parâmetros da síndrome metabólica (Passos et al, 2000; 2004). Um fenótipo semelhante é observado pelo tratamento com bromocriptina (BRO), um agonista dopaminérgico inibidor de prolactina (PRL) (Moura et al, 2009; Bonomo et al, 2005; 2007). A hiperleptinemia nos 10 primeiros dias de vida também programa a prole para hiperleptinemia com resistência ao seu efeito anorexigênico aos 30 e 180 dias de idade, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia (Toste et al, 2006; 2009), sendo tais efeitos evitados quando aos 30 dias de idade, a hiperleptinemia foi bloqueada pelo tratamento com o seu anticorpo (Trotta et al, 2011).

Uma vez que tanto os modelos de hipoprolactinemia materna pelo uso de BRO quanto o modelo de hiperleptinemia neonatal são caracterizados por um aumento de leptina ao desmame com fenótipos semelhantes na idade adulta (sobrepeso, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hiperleptinemia), é possível que aos 30 dias, a prole de mães tratadas com BRO, também apresente hiperleptinemia, assim como ocorre no modelo de hiperleptinemia neonatal. Tendo isso em vista, decidimos então tratar as mães com BRO durante os 3 últimos dias de lactação e avaliar a prole aos 30 dias, visto o papel crucial da leptina como fator de *imprinting*. Não podemos ainda descartar o fato de que a BRO é transferida pelo leite e que também possa estar exercendo efeito direto sobre a prole ao estimular a via dopaminérgica, sendo também um possível fator de *imprinting*. Para isolar o efeito direto da BRO na prole, decidimos injetá-la diretamente no filhote durante a lactação,

dividindo esse período em dois: início (PN 1-10) e final (PN11-20) de acordo com a maturação do sistema dopaminérgico.

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Programação Metabólica

Alterações nutricionais, hormonais e ambientais em fases iniciais da vida, como gestação e lactação, que são consideradas fases de grande plasticidade, atuam como fatores de *imprinting* levando a modificações epigenéticas capazes de influenciar no desenvolvimento endócrino-metabólico futuro. A esse fenômeno é dado o nome de programação metabólica, (Cotrell & Ozanne, 2008). Este termo foi introduzido na literatura por Dörner em 1974, um pioneiro nos estudos da neuroendocrinologia.

David Barker (1993) postulou a hipótese da “origem fetal das doenças” onde observou que existia uma associação entre o baixo peso ao nascer, consequente a um ambiente intra-uterino adverso (desnutrição materna grave), e um maior risco de desenvolver doença crônica não transmissível na idade adulta. Existe hoje um grande numero de estudos demonstrando que alterações nutricionais, hormonais e ambientais no início da vida repercutem no desenvolvimento de doenças na vida adulta (Moura & Passos, 2005; Moura *et al*, 2008; Langley-Evans & McMullen, 2010; Lee, 2015; Chu, 2015; Paes et al, 2015; Tomar et al, 2015; Ralevski e Horvath, 2015).

Atualmente é bem aceito que os diferentes fatores de *imprinting* levam a modificações na atividade genômica e que apesar de não alterar a sequência do DNA, podem produzir alterações fenotípicas estáveis e transgeracionais. As alterações epigenéticas, em particular, a metilação do DNA e acetilação/metilação das histonas, fornecem uma "memória" em respostas ao momento de grande plasticidade dos períodos críticos e são fundamentais para a geração de um fenótipo, e da estabilidade deste, ao longo da vida (Portha et al, 2014; Panchenko et al, 2015), resultando numa remodelação da estrutura e funcionalidade dos tecidos (Langley- Evans, 2015).

Nosso laboratório possui vasta experiência em diferentes fatores de *imprinting* no início da vida pós-natal (lactação). Vários são os agentes capazes de atuar no processo de programação: 1. fatores nutricionais, tais como: restrição proteica (Passos et al, 2000; Fagundes et al, 2007, Lisboa et al, 2006;2012); desmame precoce (Lima et al, 2011, Franco et al, 2012, Nobre et al, 2012, Younes-Rapozo et al, 2012, Lima et al, 2013), supernutrição (Conceição et al, 2012, Conceição et al, 2013) e utilização de linhaça (Figueiredo et al, 2012;

Troina et al, 2012); 2. fatores hormonais: tais como hipoprolactinemia materna pelo uso da BRO (Bonomo et al, 2005; Peixoto-Silva et al, 2014; Carvalho et al, 2014; Younes-Rapoza et al, 2015), hiperleptinemia neonatal (Toste et al, 2006; Trevenzoli et al, 2007, Fraga-Marques et al, 2010) e hipertireoidismo (Moura et al, 2008); e 3. fatores ambientais, tais como: exposição à fumaça do cigarro (Santos-Silva et al, 2012;2013 Pinheiro et al, 2015) e a nicotina isoladamente (Oliveira et al, 2009;2010; 2011; Santos-Silva et al, 2010; Pinheiro et al, 2015).

Demonstramos que a desnutrição materna, durante a lactação, programa para aumento da massa e da gordura corporal, aumento de leptina, hiperinsulinemia, aumento da corticosterona e a diminuição da função tireoidiana na prole na idade adulta (Passos et al, 2002; Teixeira et al, 2002; Lisboa et al, 2006). Estas ratas lactantes apresentam uma diminuição da massa corporal e da PRL plasmática, bem como aumento de leptinemia e maior concentração de gordura no leite (Passos et al, 2000; Lisboa et al, 2006). A PRL é um hormônio polipeptídico que estimula a produção de leite, tem efeito sobre comportamento materno, reprodução, imunorregulação, crescimento, desenvolvimento e metabolismo energético, aumentam colesterol total e triglicérido e o apetite (Pelkonen et al, 1982; Sauvé e Woodside, 2000; Goffin et al, 2002; Chen e Smith, 2004).

A leptina, produto do gene *Ob* (Zhang et al, 1994) é um hormônio proteico de 16 kDa conhecido como um regulador da ingestão alimentar e do gasto energético com efeitos mediados pelo eixo hipotalâmico (Schwartz et al, 1999). O principal local de produção da leptina é o tecido adiposo branco, mas este hormônio tem também vários outros efeitos periféricos adicionais, com ação sobre angiogênese, metabolismo de lipídios e carboidratos, além de efeitos sobre o sistema endócrino, com destaque para a função tireoidiana e reprodução, sistemas cardiovascular e imune (Wauters et al, 2000; Casabiell et al, 1997; Houseknecht et al, 1997; Smith-Kirwin et al, 1998). Assim, alterações nas concentrações plasmáticas de leptina ou na sua ação têm implicações fisiológicas importantes. A falta de leptina em roedores (como evidenciado em camundongos *ob/ob*) ou disfunção no seu receptor (camundongos *db/db* e ratos *fa/fa*) resulta em obesidade e complicações metabólicas como a resistência à insulina (Schwartz et al, 1996).

Por estar envolvida em diferentes processos endócrino-metabólicos, a leptina vem despertando interesse significativo como um potencial fator de programação. Alterações da leptinemia no início da vida estão associadas a maior risco de desenvolvimento de obesidade e doenças metabólicas na vida adulta. Alguns estudos demonstraram que leptina é capaz de estimular a liberação de PRL, tanto *in vivo* quanto *in vitro* e parte dessa estimulação é através

da ERK1/2 (Yu et al, 1997; Gonzalez et al, 1998; Tipsmark et al, 2008). Por outro lado, PRL também estimula síntese e secreção de leptina no tecido adiposo (Hardie et al, 1996; Mantzoros e Moschos, 1998; Gualillo et al, 1999).

## 1.2 Modelo experimental de programação pela hipoprolactinemia materna.

Sabe-se que a desnutrição na mãe lactante causa hipoprolactinemia materna, e a fim de isolar este fator de *imprinting*, desenvolvemos um modelo de programação onde tratamos mães lactantes com 1 mg de bromocriptina/dia, um agonista dopaminérgico, nos três últimos dias de lactação. Os filhotes ficaram desnutridos devido a redução significativa da produção do leite materno, semelhante aos filhotes cujas mães foram desnutridas na lactação. Em ambos os modelos de *imprinting* foi observado maior conteúdo de leptina no leite o que acarreta no filhote uma hiperleptinemia, mostrando assim um papel crucial da leptina na programação destes filhotes (Bonomo et al, 2005; Passos et al, 2002).

A hipoprolactinemia materna programou os filhotes, aos 180 dias, para maior massa corporal, adiposidade, hipertrofia dos adipócitos, hiperglicemia, hipoadiponectinemia, aumento de catecolamina e corticosterona, hipotireoidismo, diminuição da secreção de TSH, resistência ao efeito anorexigênico da leptina, aumento de NPY no ARC e no PVN e inflamação hipotalâmica (Bonomo et al, 2007;2008; de Moura et al, 2009; Peixoto-Silva et al, 2014; Younes-Rapozo et al, 2015). Esses animais ao serem submetidos a diferentes testes comportamentais apresentaram maiores níveis de ansiedade, menor aprendizado e memória (Fraga et al, 2011).

Como tanto as mães lactantes desnutridas quanto aquelas que receberam BRO no final da lactação apresentaram maior conteúdo de leptina no leite, foi desenvolvido um modelo onde foi injetada leptina na prole nos primeiros 10 dias de lactação para melhor entender o papel da leptina como fator de *imprinting*. Na idade adulta, a prole desenvolveu hiperinsulinemia, hipertrigliciridemia, hiperleptinemia e resistência ao efeito anorexigênico da leptina, bem como diminuição da expressão dos seus receptores hipotalâmicos (Toste et al, 2006). Aos 30 dias de vida, estes animais já apresentavam hiperinsulinemia, hipoadiponectinemia, hiperleptinemia resistência ao seu efeito caracterizada por uma menor expressão hipotalâmica de OBR-b e maior de SOCS-3, (Passos et al, 2009). Trotta e colaboradores (2011) ao bloquear essa hiperleptinemia aos 30 dias reverteram a maioria das

desordens metabólicas, como aumento de triglicérido, peso e gordura visceral, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipoadiponectinemia.

Sabemos que a BRO é um agonista dopaminérgico e que a dopamina diminui a expressão do gene *Ob* e a secreção de leptina (Alvarez-Aguilar et al, 2013), e que, por outro lado a leptina exerce efeito sobre o sistema dopaminérgico, porém de maneira ainda controversa (Leinninger et al, 2009; Perry et al, 2010; van der Plasse et al, 2015). Como a BRO é transportada através do leite materno, no modelo de programação por tratamento com BRO, não se sabe se os efeitos são consequências de alterações secundárias as alterações maternas ou se ocorrem via efeito direto da BRO na prole. Além disso, seus efeitos podem ser tanto pela via dopaminérgica como resultante de modificações na síntese ou ação da leptina, um fator de *imprinting* já bem conhecido, e que tem sua passagem aumentada através do leite quando a mãe recebe BRO.

### 1.3 Sistema dopaminérgico.

Após a descoberta da norepinefrina em 1901, a dopamina foi considerada por muito tempo apenas como um intermediário químico para a síntese de catecolaminas, desprovido de qualquer outro papel fisiológico (Sneider, 2001). Carlsson e colaboradores mostraram, pela primeira vez em 1957, que a dopamina tinha funções fisiológicas no cérebro, tornando-se hoje um importante neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC). A dopamina controla uma variedade de funções, incluindo atividade locomotora, cognição, emoção, ingestão de alimentos e integração neuroendócrina, além de papéis periféricos regulando a função cardiovascular, liberação de catecolaminas, secreção hormonal, tônus vascular, função renal e motilidade gastrointestinal (Missale et al, 1998; Wise, 2008). O sistema dopaminérgico também está envolvido com alguns distúrbios neuropsiquiátrico, tais como esquizofrenia, dependência por drogas, transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) e doença de Parkinson (Genro et al, 2010; Howes e Kapur, 2009; Melis et al, 2005). A dopamina, por ter efeito ionotrópico e vasoativo (Noori e Seri, 2012), é utilizada em casos de choque séptico neonatal, onde se observa hipovolemia, insuficiência vasorreguladora e/ou disfunção do miocárdio (Sanini et al, 2014). É conhecido que dopamina aumenta a pressão arterial pulmonar e inibe GH, PRL, TSH e gonadotrofinas (Wood et al, 2000; Seri, 1995; Liet et al, 2002; Dong et al, 2000); ao descontinuar o seu uso, os níveis desses hormônios são

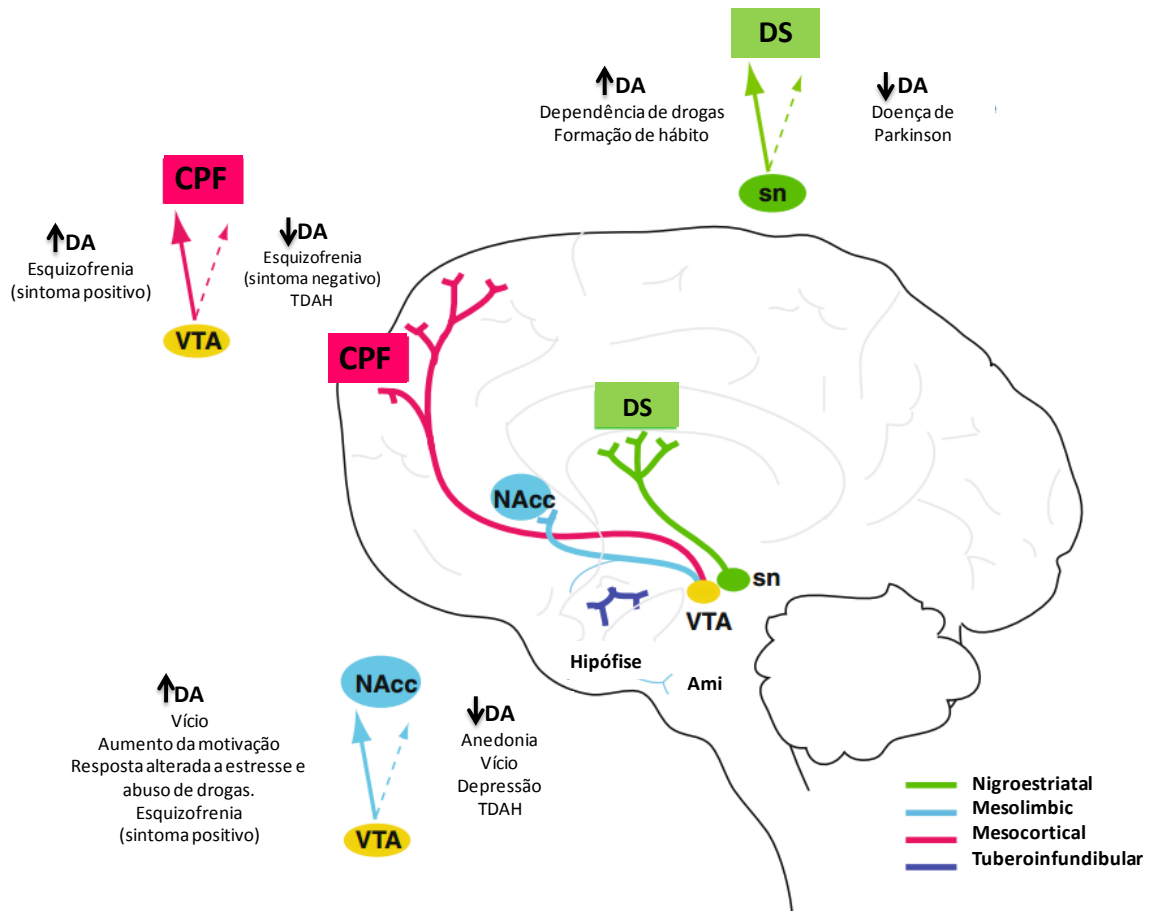
normalizados, porém não se sabe se a exposição a tais alterações hormonais em período crítico do desenvolvimento terá algum efeito a longo prazo.

A ação da dopamina é mediada por cinco subtipos de receptores pertencentes a duas famílias, que variam de acordo com os seus efeitos sobre os neurônios-alvo. A ativação dos receptores da família *D1-like* (D1 e D5) leva a ativação da adenilato-ciclase e aumento dos níveis de AMPc. Estes receptores estão presentes no córtex pré-frontal no corpo estriado, no hipotálamo e em outras regiões do córtex cerebral. A família dos receptores *D2-like* (D2, D3 e D4) inibe a atividade da adenilato-ciclase e a síntese de AMPc, tendo um papel importante sobre a homeostase energética. Os receptores *D2-like* são alvo dos fármacos antipsicóticos, o que sugere sua relação com processos cognitivos, motores e afetivos. Estão distribuídos no corpo estriado, córtex cerebral, tronco encefálico e na medula espinhal (Vallone et al, 2000; Tóth et al, 2013). Os receptores *D1-like* são expressos em nível pós-sinápticos, enquanto que os receptores *D2-like* são expressos tanto em níveis pós quanto pré-sinápticos, atuando como auto-receptores. Quando há um fluxo excessivo de dopamina, estes auto-receptores reduzem o tônus dopaminérgico diminuindo assim a síntese de dopamina (Benoit-Marand et al, 2001; Congar et al, 2002; Hahn et al, 2006).

Os neurônios dopaminérgicos são distribuídos em 3 principais vias (Figura 1): 1) Via nigroestriatal, que projeta-se da substância nigra para o estriado, esta via está envolvida na estimulação do movimento intencional e sua degeneração está ligada a doença de Parkinson (McClure et al, 2004); 2) Via mesolímbica, que parte da área tegumental ventral (VTA) e se projeta para o núcleo accumbens (NAc), esta via desempenha um papel importante na motivação e na recompensa (Erlanson-Albertsson, 2005; Berthoud 2006; Fulton, 2010) sua desregulação está ligada ao desenvolvimento da esquizofrenia (Richter et al, 2015); 3) via tuberoinfundibular, que parte do núcleo arqueado (ARC) e periventricular para a eminência mediana do hipotálamo, está ligada a liberação de PRL pelos lactótrofos da hipófise além do hormônio do crescimento (Ben-Jonathan et al, 2001; Matussek et al, 1980).



Figura 1 - Vias dopaminérgicas



Legenda: A via mesolímbica e a mesocortical partem do VTA, próximo à substância nigra (sn). A via mesolímbica projeta para o núcleo accumbens (NAcc) e amígdala (Ami). A via mesocortical projeta para o córtex pré-frontal (CPF). O trato tuberoinfundibular termina na unidade hipotálamo-hipófise. A via nigroestriatal projeta da sn para striatum (DS). Alteração no tônus dopaminérgico em cada um desses circuitos (tanto hipo quanto hiperatividade) está associada a uma condição patológica particular.

Fonte: Adaptado de Rodrigues et al, 2011.

#### 1.4 Agonista dopaminérgico: bromocriptina (BRO)

A BRO pertence à classe dos agonistas dos receptores da dopamina derivados da ergolina (agonista do receptor D2) que possui ações simpaticolíticas e é antagonista parcial do receptor D1 (Kebabian & Calne, 1979; Webster, 1996), podendo 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). A BRO inibe a secreção de PRL em modelos humano ou animal, altera os níveis de neurotransmissores

monoaminérgicos no hipotálamo, tendo impacto no metabolismo glicêmico e lipídico (De Fronzo, 2011).

É importante ressaltar que a BRO é extensivamente utilizada na prática clínica no tratamento de algumas doenças que envolvem o sistema nervoso central, como no tratamento de doença de Parkinson, a fim de reduzir o risco de complicações motoras à longo prazo, e para reduzir a mortalidade cardiovascular nos pacientes tratados com L-dopa (Franchi et al, 2001; Kondo, 2001). Devido ao seu efeito simpaticolítico, a BRO reduz a pressão arterial em animais e seres humanos hipertensos (Pijl & Edo, 2002; Gaziano et al, 2010). Recentemente vem sendo empregada como coadjuvante no tratamento da *diabetes mellitus* tipo 2 (Liang et al, 2015), melhorando o metabolismo da glicose. Seu uso mais comum é no tratamento de prolactinomas (Rascol et al, 2002), também tem sido usada para supressão da lactação (Verma et al, 2006; Bernard et al, 2015).

A manutenção da amamentação é preocupante quando a mãe está recebendo terapia com BRO, para outras indicações que não seja a supressão da lactação. No entanto, os níveis de PRL no sangue materno durante a gravidez pode não influenciar a lactação no período pós-parto, sendo possível a amamentação em mães em uso de BRO para adenoma hipofisário (Narita et al, 1985). Um estudo realizado por Zhang & Cheng (1996) mostrou que 75% das mães que estavam em terapia com BRO durante a gravidez, amamentaram com sucesso. Porém, não se tem ideia do possível efeito deste tratamento sobre sua prole a longo prazo.

A maioria das pacientes com prolactinoma apresentam infertilidade e disfunção gonadal e a BRO é considerada a primeira droga de escolha, por restaurar a ovulação, a fertilidade e reduzir o tamanho tumoral. É um fármaco utilizado mesmo durante a gravidez, pois durante este período ocorre um aumento progressivo do nível de estrogênio, levando assim a um aumento do volume tumoral (Maeda et al, 1983; Raymond et al, 1985; Krupp & Monka, 1987; Bronstein et al, 2002; Almalki et al, 2015; Lian et al, 2015). Estudos demonstram que existe um baixo índice de aborto e anormalidade congênita quando a BRO é usada durante a gravidez. Em relação a seus efeitos foi demonstrado que até os 9 anos, filhos de mães que usaram BRO não apresentaram anormalidades quanto ao desenvolvimento físico e psicomotor (Webster, 1996; Nybo Andersen et al, 2000; Gillam et al, 2006; Shibli-Rahhal & Schlechte, 2011). Em humanos, já foi demonstrado que a BRO é capaz de atravessar a placenta (Bigazzi et al, 1979) além de ser transferida através do leite (Kulski et al, 1978; Katz et al, 1985) e que a segurança à longo prazo do uso deste composto é desconhecido, e pouco se sabe sobre o seu papel num período crítico da vida.

Uma diminuição na atividade dopaminérgica leva a uma hiperprolactinemia (Mohankumar et al, 1997; Stamatelopoulos et al, 2011), mais frequente em mulheres do que em homens, às vezes é assintomática, mas quanto maior os níveis de PRL, maiores serão as manifestações clínicas. Alguns sintomas são devido ao hipogonadismo causado pelos elevados níveis de PRL, alterando o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, e outros são devido a seus efeitos diretos sobre os tecidos alvos. Consequentemente, os pacientes podem sofrer de disfunção sexual, infertilidade, amenorreia ou galactorréia (Besnard et al, 2014). A hipoprolactinemia produzida por hipofisectomia ou tratamento com agonistas dopaminérgicos, pode ocasionar uma supressão dos neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares (Eaton et al, 1993; Hentschel et al, 2000), pois a PRL parece ser essencial para manter a integridade funcional destes neurônios, em parte, pela redução do conteúdo de RNAm de tirosina hidroxilase (TH) no núcleo arqueado e na eminência mediana, além de aumentar as concentrações de norepinefrina (Demarest et al, 1985; Voogt & Arbogast, 1990).

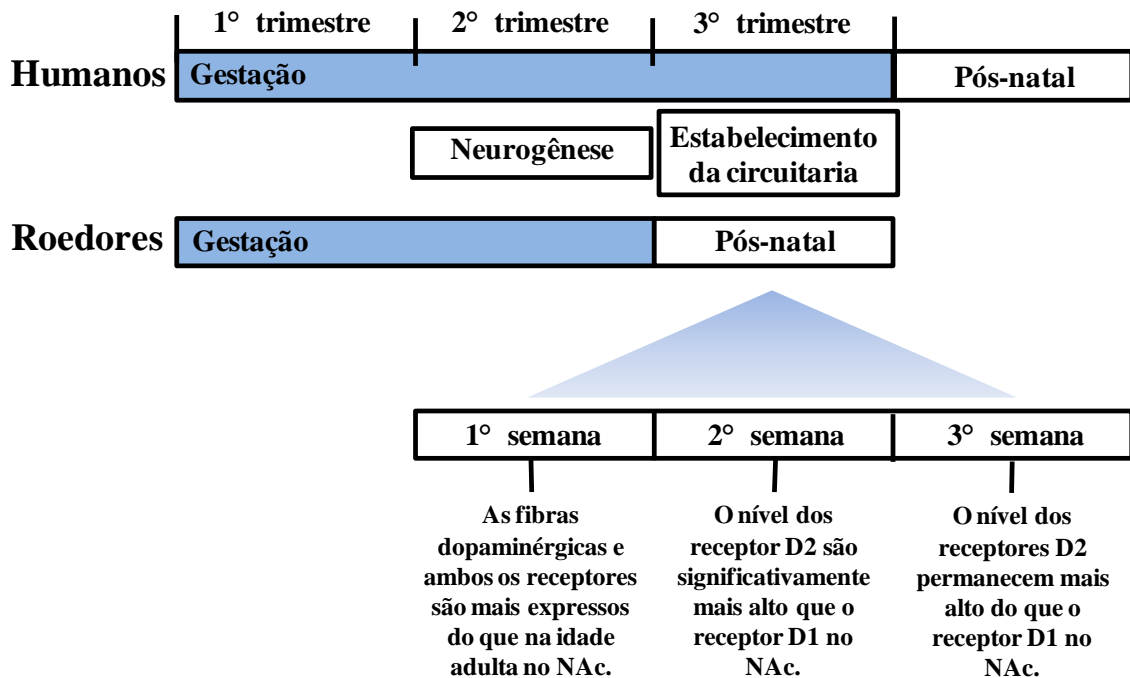
### **1.5 Breve comparação entre os períodos críticos de desenvolvimento do sistema nervoso entre humanos e roedores.**

O processo de desenvolvimento neural é diferente em humanos e roedores, sendo o terceiro trimestre de gravidez em humanos, correspondente ao período de lactação em roedores. É neste período onde ocorrem os processos de neurodesenvolvimento mais importantes, como a mielinização, organização de sistemas neurotransmissores, arborização dendrítica e gênese sináptica, os quais acontecem com maior intensidade no sistema visual e no hipocampo (Morgane et al, 1993; Saliba e Marret, 2001; Dearden & Ozanne 2015). Portanto, o cérebro é mais vulnerável a alterações nesse período onde o desenvolvimento cerebral ocorre com maior rapidez.

A lactação em roedores pode ser subdividida em dois períodos: 1º) do dia 1 ao dia 10 pós-natal, quando ocorre à proliferação neural e sinaptogênese; neste período as fibras dopaminérgicas e ambos os receptores (D1 e D2) são mais abundantes em comparação a idade adulta; 2º) do dia 11 a 20 pós-natal, quando ocorre a sinaptogênese, gliogênese, mielinização, o desenvolvimento do hipocampo e da via de recompensa, além disso, neste período, os níveis do receptor D2 são superiores ao receptor D1, sendo ainda maior que na

idade adulta. Neurônios hipotalâmicos envolvidos na regulação do balanço energético, em roedores, aparecem entre os dias embrionários 12 e 16, e a conectividade funcional entre os diferentes núcleos hipotalâmicos é estabelecida durante as primeiras quatro semanas de vida pós-natal. A figura 2 mostra a comparação da via dopaminérgica entre esses dois períodos, bem como as diferenças de desenvolvimento entre humanos e roedores (Dow-Edwards et al, 1988;1993; Hughes et al, 1991; Levitt, 1998; Wise, 1998; Ong et al, 2012).

Figura 2 - Comparação do desenvolvimento neuronal entre o ser humano e roedor e desenvolvimento pós-natal do sistema dopaminérgico.



Legenda: Durante o desenvolvimento do cérebro humano, tanto a neurogênese como o estabelecimento da circuitaria neuronal, ocorrem durante a gestação. No entanto, em roedores a conectividade sináptica completa não é estabelecida até o início do período pós-natal.

Fonte: Adaptado de Ong et al, 2012 e Dearden & Ozanne, 2015.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

### 2.1 Relevância do estudo e objetivo geral

Sabendo que existe uma semelhança entre o período de lactação em roedores com o final da gestação em humanos, e que já foi demonstrado que o tratamento materno com BRO nos três últimos dias de lactação levou a uma programação bastante semelhante ao tratamento neonatal com leptina (PN1-10), decidimos estudar o papel da leptina na programação pelo tratamento materno com BRO, analisando se ocorre uma hiperleptinemia aos 30 dias. Sabendo ainda que a BRO é transferida pelo leite e que poderia estar estimulando diretamente a via dopaminérgica da prole, o segundo objetivo do nosso trabalho foi estudar os efeitos diretos da BRO em longo prazo sobre a via dopaminérgica, comportamento associado a ansiedade e atividade locomotora, bem como perfil hormonal e metabólico de ratos programados por injeção de BRO em diferentes tempos de maturação do sistema dopaminérgico, no início (PN1-10) e no final (PN11-20) da lactação. Primeiramente, avaliar no modelo de hipoprolactinemia materna pelo tratamento com bromocriptina, a ocorrência de hiperleptinemia aos 30 dias acompanhado por resistência à leptina (experimento 1) e distúrbios metabólicos, que possam justificar as alterações encontradas na idade adulta da prole, e que se assemelham ao modelo de hiperleptinemia neonatal (PN1-10). Um segundo aspecto é avaliar as consequências em longo prazo da exposição direta da prole à bromocriptina durante a lactação (experimento 2), visto que no modelo de hipoprolactinemia materna ocorre transferência de BRO para prole, e esta pode atuar como um fator de *imprinting*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Experimento 1 (hipoprolactina materna), nas proles aos 22 dias e 30 dias de idade, estudar:
  - Ingestão alimentar, massa corporal e gordura visceral,
  - Glicemia e perfil lipídico,
  - Conteúdo hepático de colesterol e triglicerídeos.

- Leptina e insulina plasmática.
- Expressão da leptina, da sua via de sinalização e dos neuropeptídeos NPY e POMC.

- Experimento 2 (injeção direta de BRO na prole nos 10 primeiros, PN1-10, e nos 10 últimos dias da lactação, PN11-20), avaliar aos 180 dias:

- Ingestão alimentar, massa corporal e gordura visceral,
- Glicemia e perfil lipídico,
- Conteúdo hepático de colesterol e triglicerídeos,
- Pressão arterial,
- Hormônios: leptina, insulina, corticosterona, prolactina, hormônios tireoidianos e catecolaminas,
- Via de sinalização da leptina e expressão dos neuropeptídeos NPY e POMC,
- Eixo hipotálamo-hipofise-tireoide,
- Sistema dopaminérgico de recompensa cerebral,
- Comportamentos associados a ansiedade e atividade locomotora.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Modelo experimental.

Nosso desenho experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Para Uso Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/017/2014), estando de acordo com a Lei nº. 11.794, sancionada em 2008 (Marques *et al*, 2009). Todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina do Departamento de Ciências Fisiológicas do IBRAG da UERJ.

Para o desenvolvimento do modelo experimental, 20 ratas Wistar nulíparas de três meses de idade, mantidas em biotério com temperatura ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro (7:00 - 19:00 h) controlados, foram acasaladas na proporção de 3 fêmeas para 1 um macho, recebendo livre acesso a água e a ração comercial padrão para roedores até o nascimento da prole. Ao nascimento, as ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes machos por mãe, pois este número garante o maior potencial lactotrófico.

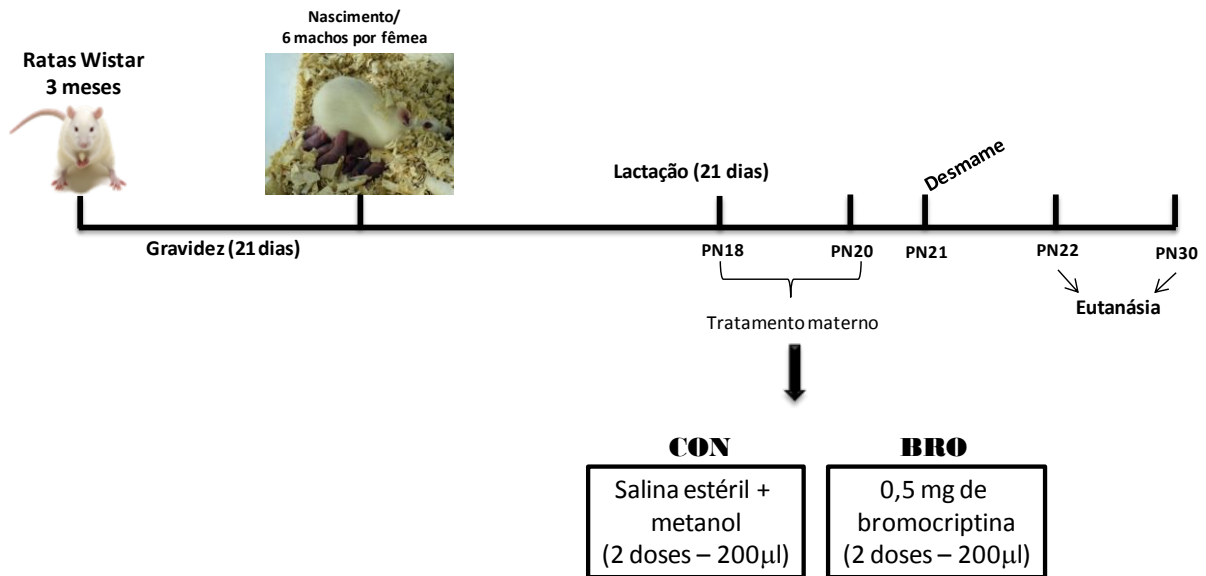
As ninhadas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais:

No experimento 1: **Grupo Bromocriptina (Bro)**: Filhotes cujas mães foram tratadas com 0,5 mg de bromocriptina (Novartis, São Paulo), dividida em duas doses por dia (volume de 200  $\mu\text{L}$  cada) e administradas intraperitonealmente do 18º dia de vida até o desmame;

**Grupo controle (Con)**: Filhotes cujas mães foram tratadas com solução salina estéril (0,9% NaCl), duas vezes por dia, intraperitonealmente do 18º dia de vida até o desmame.

O desmame ocorreu no 21º dia de vida pós-natal e os filhotes passaram a receber dieta comercial padrão para roedor, sendo acompanhados até o dia do sacrifício, que ocorreu em PN22 e PN30. O esquema do modelo experimental é demonstrado na figura 3.

Figura 3 – Modelo experimental do tratamento materno com BRO



Legenda: Ratas lactantes receberam BRO nos três últimos dias de lactação, o desmame ocorreu os 21 dias pós-natal e a eutanásia ocorreu nos dias pós-natal 22 e 30.

Fonte: A autora, 2016.

No experimento 2: ratas Wistar nulíparas de 3 meses de idade foram acasaladas (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.

Para minimizar o uso de animais, cada ninhada foi subdividida em dois grupos para que recebessem os dois tratamentos (3 filhotes recebendo salina e 3 recebendo bromocriptina), o experimento foi organizado da seguinte forma:

**Tratamento com BRO no início da lactação (PN1-10):** foram escolhidos randomicamente dois machos de cada ninhada, os animais receberam uma marcação de acordo com o seu tratamento.

**Grupo BRO:** animais marcados na pata dianteira direita e que receberam 0,1 µg bromo- $\alpha$ -ergocriptina (Novartis, São Paulo, Brazil), diluída em metanol-salina (1:1), uma vez ao dia durante o início da lactação (PN1-10).

**Grupo CON:** animais marcados na pata dianteira esquerda e que receberam metanol-salina (1:1), uma vez ao dia durante o início da lactação (PN1-10).



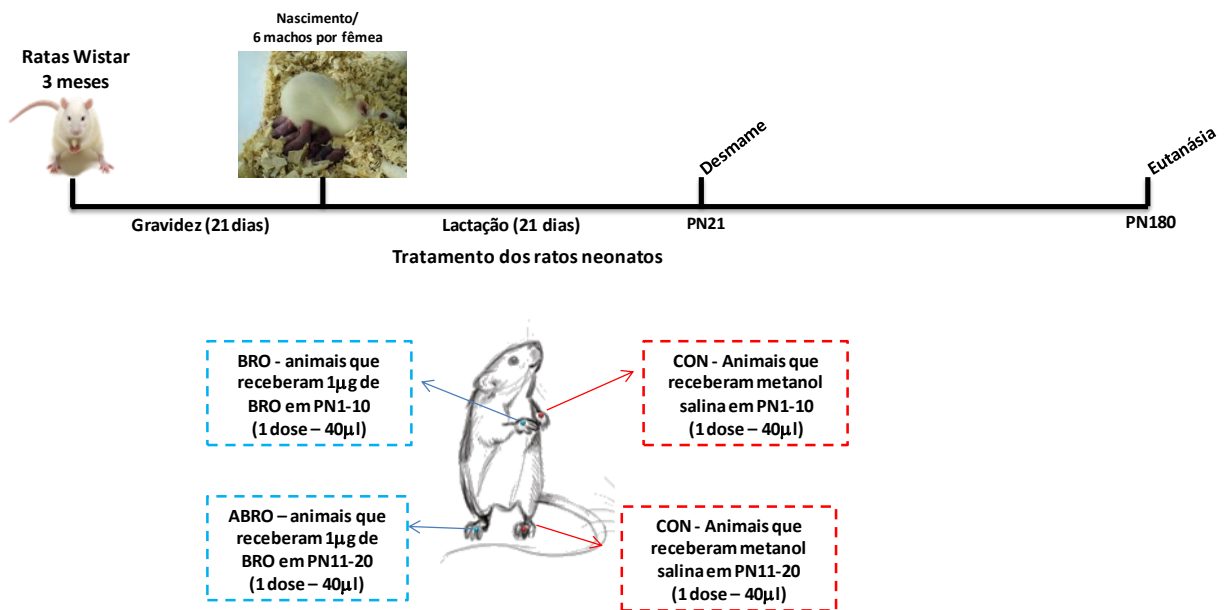
**Tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20):** foram escolhidos randomizadamente dois machos de cada ninhada, os animais receberam uma marcação de acordo com o seu tratamento.

Grupo BRO: animais marcados na pata trazeira direita e que receberam 0,1µg bromo-α-ergocriptina (Novartis, São Paulo, Brazil), diluída em metanol-salina (1:1), uma vez ao dia durante o início da lactação (PN11-20).

Grupo CON: animais marcados na pata trazeira esquerda e que receberam metanol-salina (1:1), uma vez ao dia durante o início da lactação (PN1-10).

Os outros dois animais da ninhada eram escolhidos de maneira aleatória para receber um ou outro tratamento, dessa maneira usamos os 6 animais de cada ninhada. O desenho do modelo experimental pode ser visualizada na Figura 4.

Figura 4 – Modelo experimental da exposição neonatal a BRO



Legenda: Tratamento de ratos neonatos com BRO durante o início (PN1-10) e o final (PN11-20) da lactação. O desmame foi feito aos 21 dias e a eutanásia ocorreu aos 180 dias de vida.

Fonte: A autora, 2016.

### 3.2 Biometria e controle da ingestão alimentar

A massa dos filhotes foi avaliada diariamente até o desmame e a cada 4 dias até a eutanásia, assim como o consumo de ração a partir do dia 21. A quantidade de ração ingerida foi estimada pela diferença entre o peso da ração que restou na gaiola e a quantidade total colocada, o total é dividido pela quantidade de animais da caixa.

### 3.3 Testes comportamentais

As proles do experimento 2 foram submetidas aos testes comportamentais em em PN160 e PN161. Todos os testes foram filmados e analisados posteriormente. Antes dos testes comportamentais serem iniciados, os animais foram levados à sala de testes, permanecendo por 10 minutos, a fim de promover uma ambientação no local da sala de testes, de maneira a não comprometer as análises comportamentais. No momento do teste, o animal é colocado no equipamento e permanece sozinho na sala. Após o teste, o avaliador retornava e retirava o animal do equipamento.

#### 3.3.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste do labirinto em cruz elevado é uma das formas de detecção de alterações nos níveis ansiedade, sendo o teste comportamental mais utilizado em modelo animal de ansiedade (Carobrez e Bertoglio, 2005). Para esse teste utiliza-se um equipamento que tem formato de cruz contendo dois braços abertos (BA), dois braços fechados (BF), e uma área central entre os braços. Os braços com 50cm de comprimento x 10cm de largura, e as paredes dos braços fechados com 40cm de altura. Esses braços ficam dispostos de forma perpendicular e elevados a 50cm do chão. Para dar início ao teste o animal é colocado na área central com a cabeça voltada para o braço aberto e seu comportamento é monitorado por uma câmera de vídeo durante 10 minutos. Após os 10 minutos o animal é retirado do equipamento.

Antes que outro animal seja colocado, o equipamento é limpo com papel toalha e etanol a 70%.

A partir das imagens gravadas, foram quantificados o tempo que o animal ficou em cada local do equipamento (braços abertos, braços fechados e centro), e o número de vezes que ele entrou em cada local. As variáveis utilizadas como índices de ansiedade foram o tempo que o animal permaneceu nos braços abertos (Tempo BA) e seu percentual (Tempo BA/ (Tempo BA + Tempo BF), número de entradas nos braços abertos (Entradas BA), e seu percentual (Entradas BA/ (Entradas BA + Entradas BF). (Pellow et al, 1985; Fraga-Marques e cols, 2009; Fraga-Marques e cols, 2010). A avaliação do comportamento associado à ansiedade baseia-se na observação de que o BA constitui um ambiente aversivo para o animal, onde além de desprotegido ele está sujeito à queda, assim, a permanência no BA indica que o animal se arrisca mais explorando todos os braços do aparelho, refletindo um estado de menor ansiedade (Rodgers *et al.*, 1997). A atividade locomotora foi avaliada através do número de entradas no braço fechado (Rodgers *et al.*, 1997; Fraga et al., 2011; Fraga et al., 2014), e também pelo número de entradas no BA+BF (FRAGA-MARQUES e cols, 2009; FRAGA-MARQUES e cols, 2010). Uma entrada foi contabilizada quando o animal cruzava com as quatro patas um braço. O teste foi realizado entre 13 e 18h.

### 3.3.2 Campo aberto (CA)

Utilizamos um equipamento que consiste de uma caixa de madeira branca (57 cm de comprimento X 57 cm de largura X 59 cm de altura) e seu piso foi dividido por linhas em 16 retângulos do mesmo tamanho (14,25 X 14,25 centímetros; 12 exterior e 4 interior). No início da sessão, cada rato foi colocado na periferia da arena e a sua atividade foi registrada durante 5 min. A atividade locomotora foi quantificada com base no número de retângulos atravessados pelos animais no centro (CN) e na periferia (P) (Filgueiras et al., 2009). A travessia foi considerada válida quando o animal cruza a linha com todas as quatro patas. Além disso, o número de entradas nos retângulos centrais corrigidos pelo total de deambulação [% Entradas CN:  $CN / (CN + P)$ ] foi avaliada; a atividade no centro está inversamente relacionada com os níveis de ansiedade (Pena-Oliver et al, 2010;. e Prut Belzung, 2003). No fim de cada sessão de comportamento, o CA foi limpo com toalhas de papel embebidos em etanol a 50% e secos

antes de cada ensaio. Todos os animais foram devolvidos às suas gaiolas, onde permaneceram até serem sacrificados.

### **3.4 Aferição da pressão arterial.**

Os parâmetros cardiovasculares foram medidos pelo método de *tail-cuff* (manguito de cauda) usando um medidor de pressão digital Letica LE 5000 (Bioseb, Marseille, França). Os animais do experimento 2 foram aclimatados pelo menos uma semana até que a pressão arterial tenha progressivamente estabilizada, foi utilizada uma contenção mínima, com um pedaço de pano, para reduzir o estresse durante as medições. A primeira medição de parâmetros cardiovasculares foi descartado e a média de três medições subsequentes foi gravada.

### **3.5 Teste de tolerância oral a glicose (TOTG)**

Na semana anterior ao sacrifício, os animais do experimento 2 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 (Accuchek 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.

### 3.6 Eutanásia

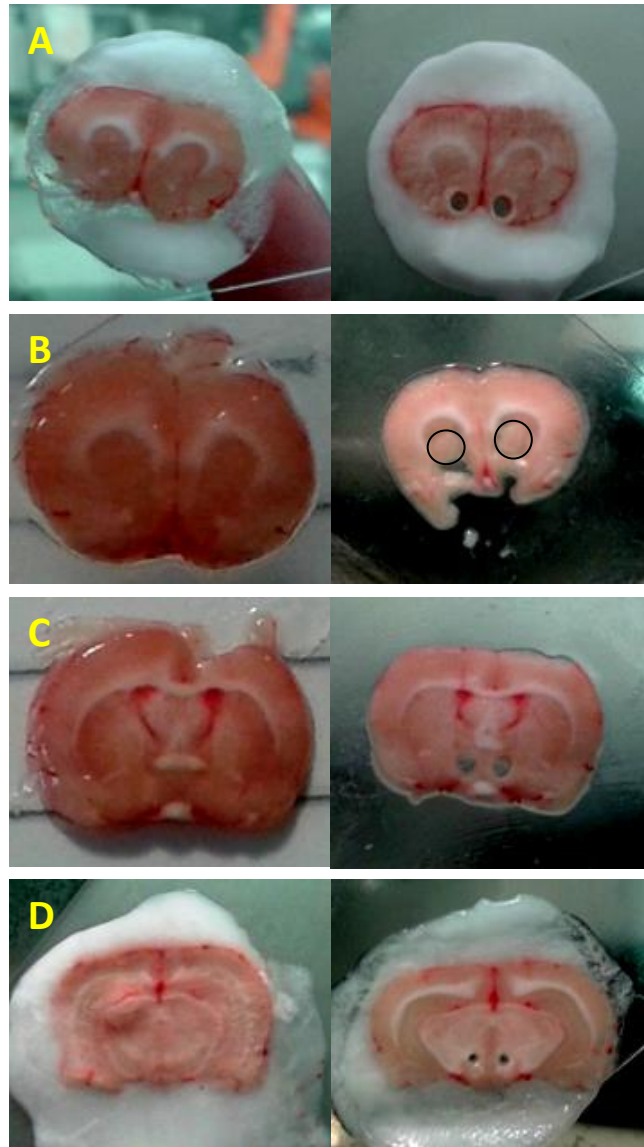
Os animais de ambos os experimentos foram anestesiados com  $55 \text{ mg (kg BW)}^{-1}$  de ketamina e  $100 \text{ mg (kg BW)}^{-1}$  de xilazina. A eutanásia foi realizada por remoção do sangue do animal pela técnica de punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubo heparinizado K3 á vácuo, e centrifugado (2.500 rpm, 25 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ) para a obtenção do plasma que foi estocado à  $-20^{\circ}\text{C}$  até as análises. Os tecidos separados para RT-PCR foram armazenados em tubos contendo *RNAlater*® e mantidos em freezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), assim como os demais tecidos. O hipotálamo total dos animais do experimento 1 foram retirados e armazenado no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para o experimento 2, foi retirado o cérebro dos inteiro foi cuidadosamente retirado e armazenado no freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para subsequente remoção das regiões de interesse.

#### 3.6.1. Isolamento das regiões cerebrais

Para os procedimentos de isolamento dos cérebros dos ratos adultos, utilizou-se como guia o atlas Paxinos e Watson (1998), utilizando-se o bregma como uma referência para a localização das secções coronais. Cortes coronais foram obtidos utilizando o criostato (Hyrax C25, Zeiss, Stuttgart Alemanha) e os punches do DS (bregma 1,70-0,48 mm), NAC (bregma 1,70-0,48 mm), ARC (bregma -1,6 a -2,6 mm), VTA (bregma -5,60 a -6,30 mm) e PVN (bregma 0.6 to  $-2.1\text{mm}$ ). As amostras foram mantidas em nitrogênio líquido e estocada em  $-80^{\circ}\text{C}$  até a utilização. Os cortes podem ser visualizados na figura 5.

Figura 5 – Puchs cerebrais



Legenda: Punchs do NAC (A); DS (B), PVN (C); ARC (D) e VTA (E).  
Fonte: A autora, 2016.

### 3.7 Massa de gordura visceral (MGV)

Para avaliar adiposidade central, dissecamos e pesamos a massa de gordura visceral (MGV), que consiste na soma dos depósitos de gordura do retroperitônio, mesentério e epidídimo (Hansen et al, 1997).

### 3.8 Dosagem hormonal

As dosagens hormonais foram medidas através de radioimunoensaio (RIE) e Elisa.

**Experimento 1:** Amostras de plasma das proles foram utilizadas para dosagem hormonais por radioimunoensaio (RIE), num ensaio único. A leptina foi medida utilizando-se kit específico para murinos (LincoResearch, Inc., Missouri, EUA). O coeficiente de variação intraensaio foi de 2,9% com 0,5 ng/mL de limite mínimo de sensibilidade e os valores foram expressos em ng/mL.

**Experimento 2:** O nível de leptina foi analisado utilizando um teste imunoenzimático (ELISA) (kit de ELISA de leptina rato). A corticosterona plasmática foi dosada utilizando um kit de RIE comercial específico (MP Biomedicals Diagnostic Division, Orangeburg, NY, USA) com um ensaio de sensibilidade de 7,7 ng/ml e um coeficiente de variação intra-ensaio de 4,4%. T3 total plasmático (T3) e tiroxina livre (T4) foram determinados por RIE (MP Biomedicals Diagnostics Division, Orangeburg, NY, EUA). O coeficiente de variação intra-ensaio para a T3 era 5,6% e o limite inferior de detecção de 25 ng/dL e para T4 foi de 5,7%, com 2 mg/dL de limite inferior de detecção. A insulina foi determinada utilizando um kit de ensaio de insulina ImmuChem™ (MP Biomedicals, LLC Diagnostics Division 29525 Fountain Parkway Solon, Ohio), com a sensibilidade de ensaio de 4,6 µIU/ml e a variação intra-ensaio de 7,1%. A concentração plasmática de PRL foi determinada por RIE duplo anticorpo utilizando um peptídeo para iodação rPRL-I6, padrão de referência rPRL-RP3 e anticorpo específico rPRL-S9 fornecido pelo Programa Nacional de Peptídios e Hormônios (Harbor-UCLA Medical Center, CA-EUA). O coeficiente de intra-ensaio de variação de PRL foi de 5,8%. O limite inferior de detecção foi de 0,09 ng / ml.

### 3.9 Dosagem do perfil lipídico

O colesterol total (mg/dL), HDL-c (mg/dL) e triglicérides (mg/dL) foram dosados através de kit comercial Biosystem® (Barcelona, Espanha) em amostras de plasma das proles.

- O LDL-c e o VLDL-c foram obtidos através da fórmula de Friedewald (1972):
- $LDL-c \text{ (mg/dL)} = \text{colesterol total} - (\text{Triglicérides}/5) - HDL-c$

- $VLDL-c \text{ (mg/dL)} = \text{Triglicerídeos}/5$   
Para o experimento 1 foi ainda obtido:
- Índice de Castelli I =  $TC / HDL$
- Índice de Castelli II =  $LDL / HDL$

### 3.10 Dosagem hepática de triglicerídeo e colesterol

Em ambos os experimentos, amostras de 50 mg de fígado foram homogeneizadas em 1 ml de isopropanol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) e centrifugadas (5900 rpm, 10 minutos, 4°C). O total de triglicerídeos e colesterol foi mensurado no sobrenadante a partir de ensaio colorimétrico utilizando kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil), seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.11 Dosagem do conteúdo e da secreção de catecolaminas: experimento 2

#### 3.11.1 Dosagem de catecolaminas totais:

As catecolaminas totais – epinefrina e norepinefrina – foram quantificadas por método fluorimétrico do trihidroxiindol (Kelner *et al.*, 1985, Trevenzoli *et al.*, 2007). A adrenal foi homogeneizada em 500µl de ácido acético 10% usando um ultrassonicador e centrifugada a 5.000rpm por 5 minutos. Utilizamos 50µl do sobrenadante para a realização do ensaio. Adicionamos 250µl de tampão fosfato 0,5 M, pH 7,0 e 25µl de ferricianeto de potássio 0,5%. A solução foi misturada e incubada por 20 minutos. A reação foi paralisada com 500µl de ácido ascórbico/NaOH 10N, na proporção de 1:19. Em seguida, adicionamos 2 ml de água destilada; a solução foi misturada e realizou-se a leitura da fluorescência (excitação: 420nm; emissão: 510nm) (Perkin Elmer, VICTOR<sub>2</sub>). Os dados foram expressos em µM de catecolaminas/mg de glândula.



### 3.11.2 Secreção de catecolaminas:

As glândulas supra-renais esquerdas foram pesadas e as medulas adrenais recentemente isoladas foram submetidas ao estímulo com cafeína. O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico é um fator limitante para a secreção de catecolaminas em células de cromafins e mobilização do estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis (Inoue et al., 2003). Assim, foi avaliada liberação de catecolaminas induzida por secretagogo. O experimento foi realizado em placas de cultura de células (96 poços) a  $25^{\circ}\text{C}$  como descrito anteriormente (Trevenzoli et al 2007; Fagundes et al, 2009). Após a dissecação as medulas foram mantidas em solução de Krebs HEPES, pH 7,2, durante 1 h. Esta solução continha (mM):  $154.26 \text{ Cl}^{-}$ ,  $143.4 \text{ Na}^{+}$ ,  $2.5 \text{ Ca}^{2+}$ ,  $1.18 \text{ Mg}^{2+}$ ,  $1.2 \text{ SO}_4^{2-}$ ,  $5.9 \text{ K}^{+}$ , 25 HEPES, 0.5 % BSA, e glicose (85 mg/dl). As medulas foram incubadas durante 5 min em 200  $\mu\text{l}$  da solução de Krebs para avaliar a secreção basal. Em seguida, medulas foram estimuladas com 25  $\mu\text{M}$  de cafeína durante 5 min (200  $\mu\text{l}$ /poço). No final da incubação, 20  $\mu\text{l}$  de ácido acético glacial foram adicionados aos poços para melhor conservação da catecolamina. Alíquotas do meio foram recolhidas e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até à medição da catecolamina pelo método de trihidroxiindol como descrito acima.

### 3.12 **Determinação da atividade $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase mitocondrial (GPDm): experimento 2**

O fígado foi homogeneizado em solução de sacarose (0,32M) -cloreto de magnésio (1mM) e centrifugado a 1.000xg para separação do precipitado nuclear. Para obter a fração mitocondrial pura realizou-se duas centrifugações do sobrenadante (8.500xg/10 min) em tampão fosfato (BPK) 0,125M pH 7,5. Após a última centrifugação, armazenou-se o precipitado (fração mitocondrial), ressuspendendo-o em 1mL de BPK no momento da dosagem da atividade enzimática (Oliveira *et al.*, 2007). A atividade GPDm foi medida pela técnica colorimétrica fundamentada no uso da fenacina metassulfato (PMS) como transportador eletrônico entre a enzima reduzida e o cloreto de iodonitrotetrazolium (INT). A fração mitocondrial foi incubada a  $30^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos com DL- $\alpha$ -glicerofosfato hexahidratado (32,4mg/ml) diluído em KCN (0,32mg/ml) em tampão BKP 0,125M, pH7,5. Adicionou-se a solução INT-PMS, com incubação de 15 - 53 - minutos a temperatura

ambiente (processo realizado no escuro), a luz branca foi acesa após adição de TCA 10%. Após acréscimo de etanol absoluto e centrifugação (1.000xg/5 min), fizemos a leitura da absorbância do sobrenadante a 500nm em espectrofotômetro (TU-1800 UV-VIS) (Oliveira *et al.*, 2007). Os dados foram expressos como absorbância/minuto/mg de proteína mitocondrial.

As proteínas mitocondriais hepáticas foram dosadas pelo método de Bradford (1976). O BSA foi usado para a construção da curva padrão, sendo a leitura da absorbância realizada a 595nm (TU-1800 UV-VIS).

### 3.13 Análise do conteúdo das proteínas por Western Blotting: experimento 2

Avaliamos o conteúdo das proteínas do hormônio tireotrófico (TSH) na hipófise; hormônio liberador de tireotrofina (TRH) no PVN; tirosina hidroxilase (TH) e a sinalização da leptina no VTA; conteúdo de TH, receptor dopaminérgico 1 (D1R), receptor de dopamina 2 (D2R), transportador dopaminérgico (DAT) e receptor  $\mu$ -opióide no NAc e DS.

Para a extração das proteínas, as amostras foram sonicadas duas vezes em um processador ultra-som durante 10 s (com um intervalo de 15 s) e amplitude de 40%, com tampão de lise (HEPES 50 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, EDTA 10 mM, e 1% Triton X-100, pH 6,4) mais inibidores de proteases (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA). Para homogeneizar a hipófise foi utilizado 500  $\mu$ l de tampão, nas regiões dos cérebros dos animais adultos, foram utilizados 15  $\mu$ L de tampão para homogeneizar o VTA, 70  $\mu$ l para o NAC e PVN e 140  $\mu$ l para o DS. As amostras foram desnaturadas (95°C, 5 min) em presença de  $\beta$ -mercaptoetanol. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE). Utilizamos 10  $\mu$ g de proteínas totais por slot do gel. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Hybond-P ECL membrane; Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA). Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas (1½ h) em T-TBS acrescido de albumina (2%, 25°C) sob agitação constante. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o respectivo anticorpo primário: Anti-TRH (rabbit, 1:500), anti- TSH- $\beta$  (mouse, 1:500); Anti-D1R (rabbit, 1:10.000); Anti-D2R (rabbit, 1:500); Anti-DAT (rabbit, 1:500); Anti-TH (mouse, 1:1.000); Anti-DDC (mouse, 1:2.000); Anti-receptor  $\mu$  opioide (rabbit, 1:3.000); Anti-actina (mouse, 1:500), overnight, 5°C.

Após este período, as membranas foram lavadas e incubadas com apropriado 2º anticorpo, conjugado à biotina por 1 h (25°C) sob agitação constante. Após mais uma seqüência de lavagens, as membranas foram incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase, na mesma concentração do anticorpo secundário utilizado (1 h, 25°C). As membranas foram lavadas novamente com T-TBS e posteriormente, as proteínas imunorreativas, presentes na membrana, foram visualizadas por quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences). As imagens das bandas foram analisadas e quantificadas com auxílio do programa Image J (media cybernetics).

### 3.14 Análise de expressão gênica por RT-PCR.

Para o experimento 1, o RNA total foi extraído a partir da gordura mesentérica e subcutânea e do hipotálamo total. Para o experimento 2, extraímos o RNA total do fígado, tecido adiposo marrom (TAM) e ARC. O procedimento foi feito sob condições livre de RNase, com o reagente TRIzol (Cat. No.15596 - 018) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e quantificadas através do NanoVue™Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Buckinghamshire). Foram utilizadas as amostras com razão de absorbância A260/A280  $\geq$  1,6.

O cDNA foi preparado a partir do RNA total, utilizando Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) para RT-PCR (Cat. No. 1158862) e Oligo(dT)15Primer (Promega, Madison, WI, EUA).

*Experimento 1:* Foram mensuradas as expressões de RNAm de leptina (F: 5'- CAT CTG CTG GCC TTC TTC AA - 3'; R: 5'- ATC CAG GCT CTC TGG CTT CTG - 3') colocar sequencia ) na gordura mesentérica e OBR-b (F: 5'-AGG CCC AGA CAT TTT TCC TT -3'; R: 5'-TTC CAA AAG CTC ATC CAA CC -3'), STAT-3 (F: 5'- AAG AGG CGG CAG CAG ATA G -3'; R: 5'- TGG CGG GTC TGA AGT TGA G -3'), SOCS-3 (F:5' - CCC CGG TTT GAC TGT CT-3'; R: 5'- GTT CCG TCG GTG GTA AAG AA-3'), POMC (F: 5'- CCC CGG TTT GAC TGT GTA CT-3'; R: 5'- GTT CCG TCG GTG GTA AAG AA-3' e NPY (F:5' - AGA GAT CCA GCC CTG AGA CA-3'; R: 5'-TCA CCA CAT GGA AGG GTC TT -3') no hipotálamo. Foram mensuradas as expressões de RNAm de leptina na gordura mesentérica e OBR-b, STAT-3, SOCS-3, POMC e NPY no hipotálamo. As amostras foram amplificadas utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, com o equipamento Applied

Biosystems 7500 Real- Time PCR System (Life Technologies Co.). Os primers foram preparados por ABI Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Foi utilizado como controle interno os primers do 36 $\beta$ -4 (F: 5'-TGT TTG ACA ACG GCA GCA TTT -3'; R: 5'- CCG AGG CAA CAG TTG GGT A -3') para todas as amostras.

*Experimento 2:* Foram mensuradas as expressões do RNAm da Dio1 (ID: Rn00572183\_m1) no fígado, Dio2 (ID: Rn00581867\_m1) e UCP-1 (ID: Rn00562126\_m1) no TAM; OBR-b (ID: Rn00571814\_m1), JAK-2 (ID: Rn00676341\_m1), STAT-3 (ID: Rn00562562\_m1) e SOCS-3 (ID: Rn00585674\_s1) no ARC, usando o TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X) no AmpErase® UNG (Catalog #: 4324018) (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, com o equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies Co.) Foi utilizado como controle interno o primer da  $\beta$ -actina (ID: Rn00667869\_m1).

Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados foram normalizados pelos níveis de expressão do RNAm da  $\beta$ -actina utilizando o método  $2^{\Delta\Delta CT}$  (Livak, *et. al.*, 2001).

### 3.15 Análise estatística

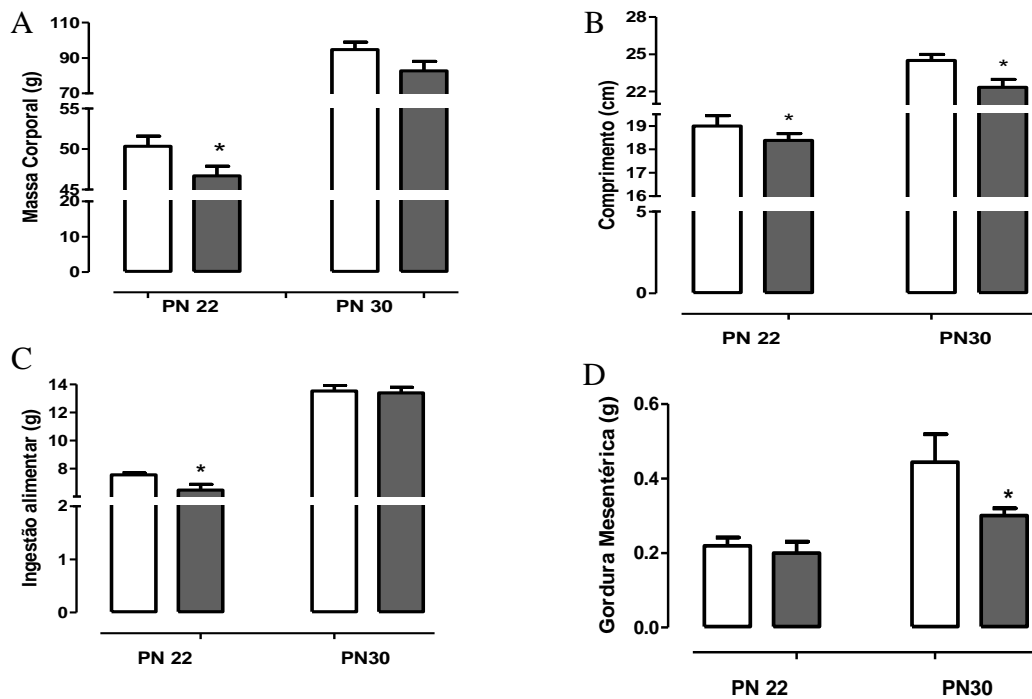
Os dados foram analisados com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 5 e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. O teste utilizado para testar a normalidade das distribuições dos dados foi o de Kolmogorov – Smirnov. Os Testes comportamentais foram analisados por ANOVA univariada. As demais análises foram analisadas pelo teste t student não pareado. O limite de significância adotado foi o de  $P < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Experimento 1: tratamento materno com BRO nos três últimos dias de lactação

As proles cujas mães receberam BRO nos 3 últimos dias de lactação apresentaram menor massa corporal em PN22 (-7,24 %,  $P < 0,05$ , Fig.6A), comprimento corporal (-5 %,  $P < 0,05$ , Fig.6B ) e consumo alimentar (-14,39 %,  $P < 0,05$ , Fig.6C), sem alterações na massa total de gordura visceral ( $C = 0,38 \pm 0,04$ ; BRO =  $0,32 \pm 0,03$ ) e gordura mesentérica ( $C = 0,22 \pm 0,02$ ; BRO =  $0,2 \pm 0,03$ ). No entanto em PN30 a prole BRO não apresentou alterações na massa corporal ( $C = 95,04 \pm 4,18$ ; BRO:  $82,65 \pm 5,434$ , Fig.6A), na ingestão alimentar ( $C = 13,40 \pm 0,5793$ ; BRO:  $13,53 \pm 0,6091$ , Fig.6C) e na massa de gordura visceral total ( $C = 0,81 \pm 0,15$ ; BRO =  $0,51 \pm 0,02$ ), apesar de menor massa de gordura mesentérica (- 32%  $P < 0,05$ , Fig.6D), e menor comprimento corporal (-8,8 % em PN30 ,  $P < 0,05$ ).

Figura 6 - Parâmetros biométricos em PN22 e PN30

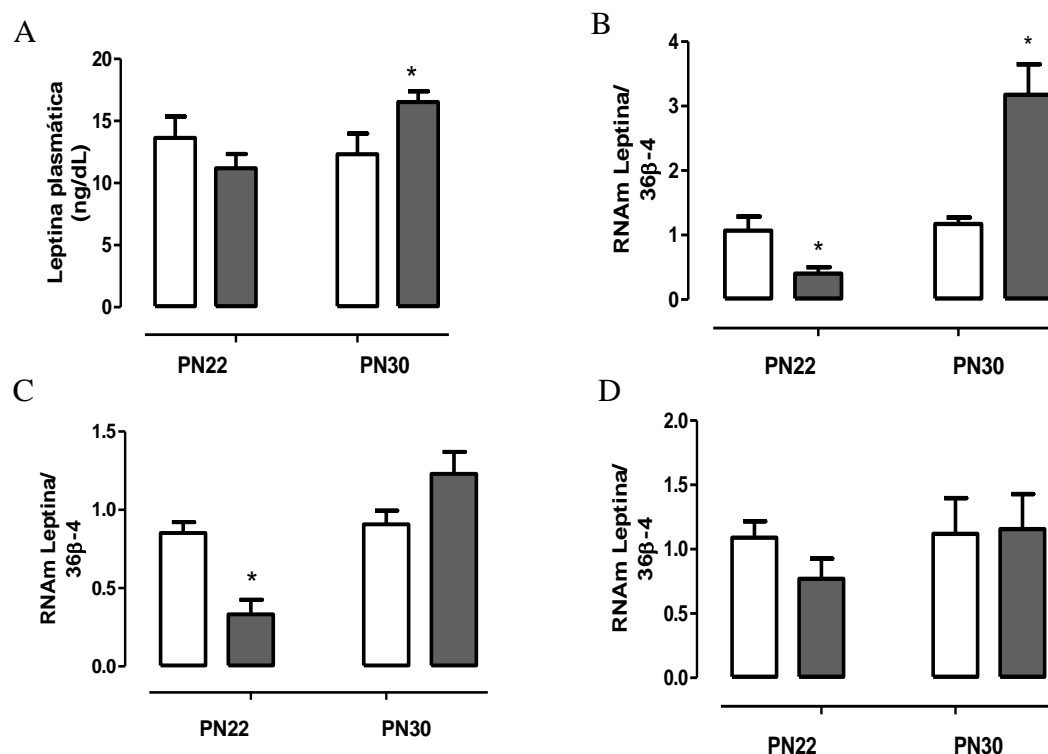


Legenda: Massa corporal (A), comprimento corporal (B), ingestão alimentar (C) e gordura mesentérica (D), de ratos cujas mães foram tratadas com BRO (barras cheias) ou tratados com solução salina (CON, barras abertas) durante os últimos 3 dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 7$ ). \* $P < 0,05$ .

Fonte: A autora, 2016.

Encontramos hiperleptinemia na prole BRO apenas em PN30 (+34 %,  $P < 0,05$ ; Fig.7A). O grupo BRO apresentou menor expressão do RNAm da leptina na gordura mesentérica (-62 %,  $P < 0,05$ ; Fig.7B) e subcutânea (-60%,  $P < 0,05$ ; Fig. 7C) em PN22 e maior expressão de leptina na gordura mesentérica em PN30 (170 %,  $P < 0,003$ ; Fig. 7B) sem mudança na gordura subcutânea (Fig.7C). Não foi observado modificação da expressão de leptina no músculo sóleo em ambas as idades estudadas (Fig.7D).

Figura 7 – Perfil leptinêmico



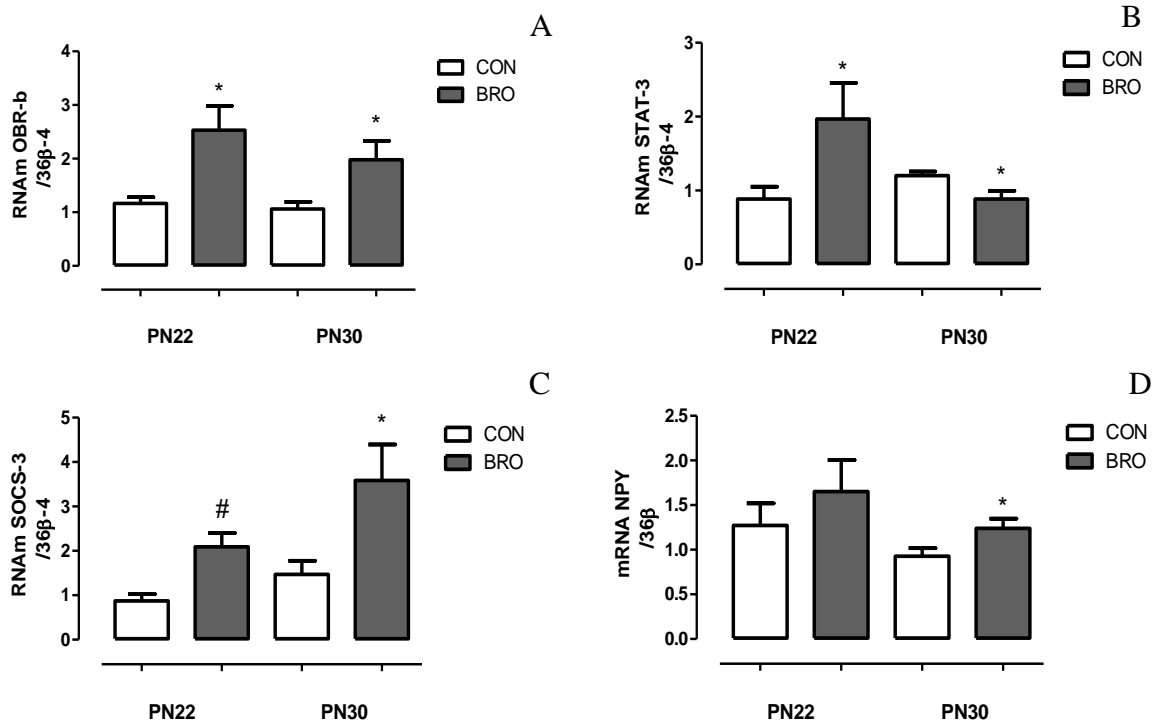
Legenda: Leptina plasmática (A), expressão do RNAm de leptina na gordura mesentérica (B), expressão do RNAm de leptina na gordura subcutânea (C) e expressão do RNAm de leptina no músculo sóleo (D) em PN22 e PN30, de ratos cujas mães foram tratadas com BRO (barras cheias) ou tratadas com solução salina (CON, barras abertas) durante os últimos 3 dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 7$ ). \* $P < 0,05$ .

Fonte: A autora, 2016.

Em PN22, encontramos maior expressão de OBR-b (+118%,  $P < 0,05$ ; Fig.8A), STAT-3 (+122,7 %,  $P < 0,05$ ; Fig.8B) e SOCS-3 (139 %,  $P < 0,05$ ; Fig.8C) nos animais do grupo BRO. Não houve mudanças na expressão de POMC (CON:  $1,06 \pm 0,23$ ; BRO:  $0,1 \pm 0,20$ ) e NPY (CON:  $1,06 \pm 0,23$ ; BRO:  $1,00 \pm 0,2$ ). Em PN30, foi encontrada uma maior expressão de OBR -b (+98,57 %,  $P < 0,05$ , Figura 8A) e menor de STAT-3 (-26,32 %,  $P < 0,05$ ; Figura 8B), além de expressão mais alta de SOCS-3 (+143,57 %,  $P < 0,05$ ; Fig. 8C) e NPY (+33,6 %

$P < 0,05$ ; Fig.8D). No entanto, POMC não diferiu do controle (CON:  $1,13 \pm 0,13$ ; BRO:  $1,05 \pm 0,16$ ).

Figura 8 - Expressão da via da leptina e do peptídeo NPY

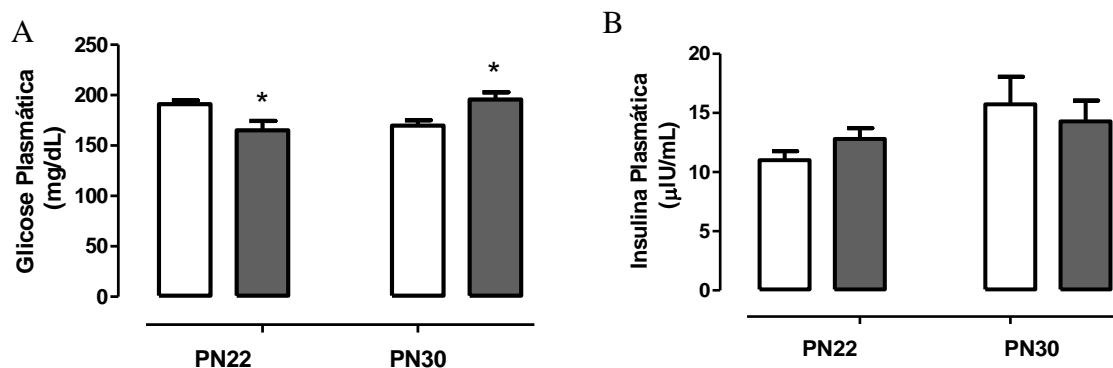


Legenda: Expressão do RNAm de OBR-b (A), STAT-3 (B), SOCS3 (C) e NPY (D) em PN22 e PN30, de ratos cujas mães foram tratadas com BRO (barras cheias) ou com solução salina (CON, barras abertas) durante os 3 últimos dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 7$ ). \* $P < 0,05$ ; P #  $< 0,003$ .

Fonte: A autora, 2016.

O grupo BRO em PN22 apresentou uma menor glicemia (-13,5 %,  $P < 0,05$ ; Fig.9A) enquanto que em PN30 apresenta uma maior glicemia (15 %,  $P < 0,05$ ; Fig.9A). No entanto, a insulina plasmática não foi diferente nos dois períodos (Fig. 9B).

Figura 9 – Glicemia e insulinemia



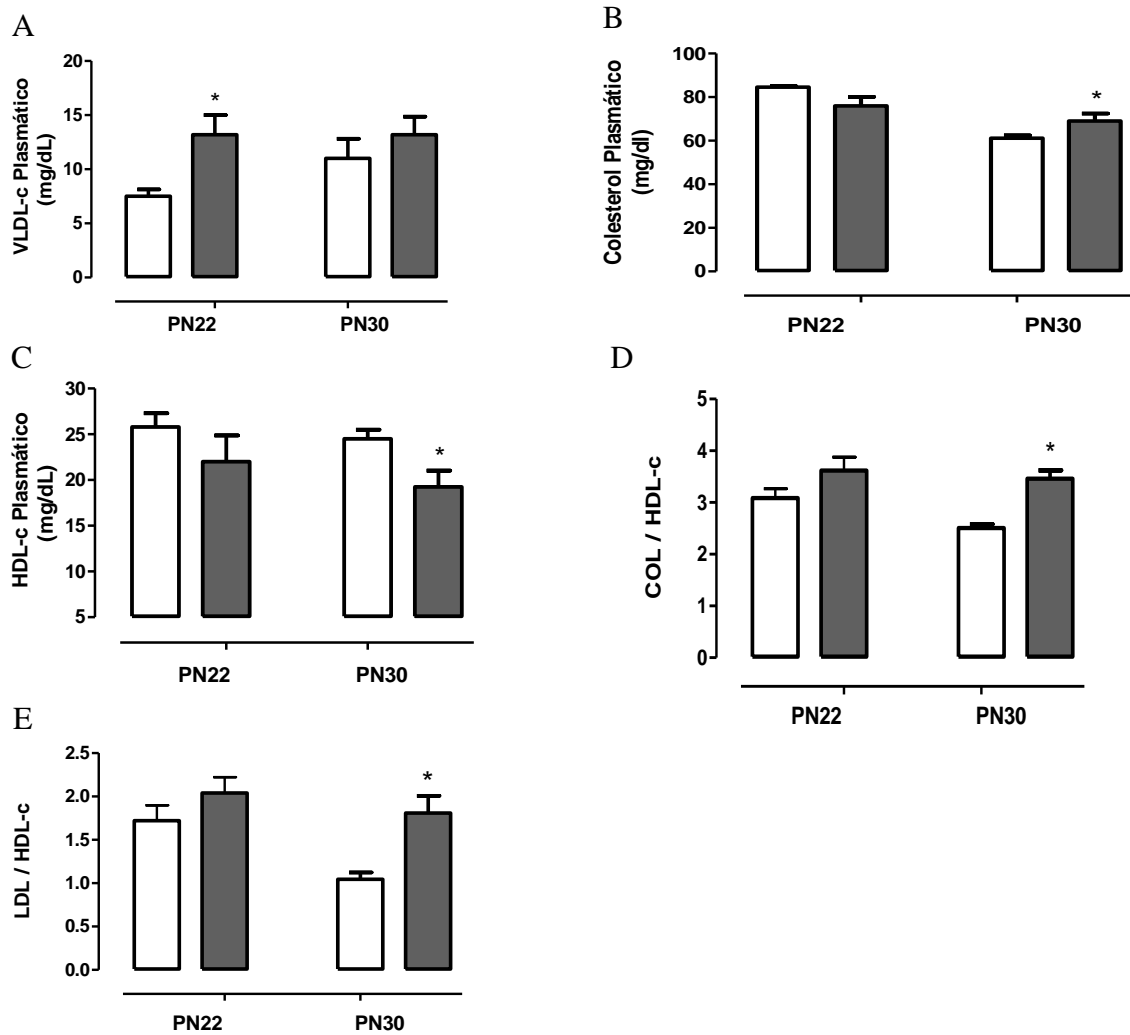
Legenda: Glicose plasmática (A) e insulina plasmática (B) em PN22 e PN30, de ratos cujas mães foram tratadas com BRO (barras cheias) ou com solução salina (CON, barras abertas) durante os últimos 3 dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7). \*P < 0,05.

Fonte: A autora, 2016.

A prole BRO em PN22 apresentou apenas VLDL-c plasmático maior (+76 %, P < 0,05; Fig.10A). No entanto, em PN30 a prole BRO apresentou maior colesterol total plasmático (+12,9 %, P < 0,002; Fig.10B), menor HDL-c (-21,4 %, P < 0,05; Fig.10C) e nenhuma mudanças nos triglicerídeos plasmáticos (C=51,5 $\pm$ 5,5; BRO: 56,4 $\pm$ 4,5), VLDL-c (Fig.10A) e LDL-c (C=26,1 $\pm$ 2; BRO 32,8 $\pm$ 4). O Índice de Castelli foi maior em PN30 (I:38 % P < 0,0003 e II:73 %, P < 0,003 Fig.10D e 10E, respectivamente).



Figura 10 - Perfil lipídico



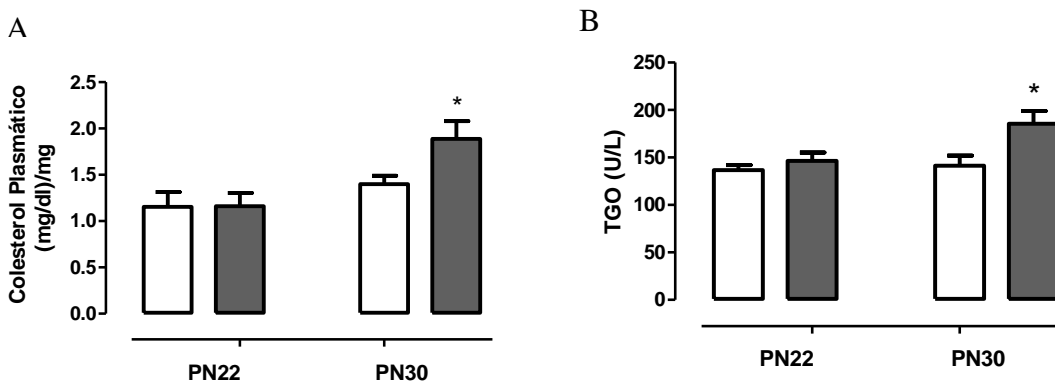
Legenda: VLDL plasmático (A), colesterol plasmático (B), HDL-c (C), índice de Castelli I (D) e II (E) em PN22 e PN30, de ratos cujas mães foram tratadas com BRO (barras cheias) ou tratados com solução salina (CON, barras abertas) durante os últimos 3 dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7). \*P < 0,05; P # < 0,003.

Fonte: A autora, 2016.

O grupo BRO apresentou maior conteúdo de colesterol hepático e *transaminase glutâmica oxalacética (TGO)* (+31 % P < 0,05; Fig.11B) apenas em PN30 (+35 %, p<0,05; Fig.11A). O conteúdo de triglicerídeos hepáticos não foi modificado em ambas as idades (C = 1,04  $\pm$  0,23; BRO = 1,4  $\pm$  0,35 em PN22 e C = 0,54  $\pm$  0,07; BRO: 0,42  $\pm$  0,06 no PN30).

Figura 11 – Colesterol hepático e TGO

B



Legenda: Colesterol hepático (A) e TGO (B) em PN22 e PN30, de ratos cujas mães foram tratadas com BRO (barras cheias) ou tratados com solução salina (CON, barras abertas) durante os últimos 3 dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7). \*P <0,05

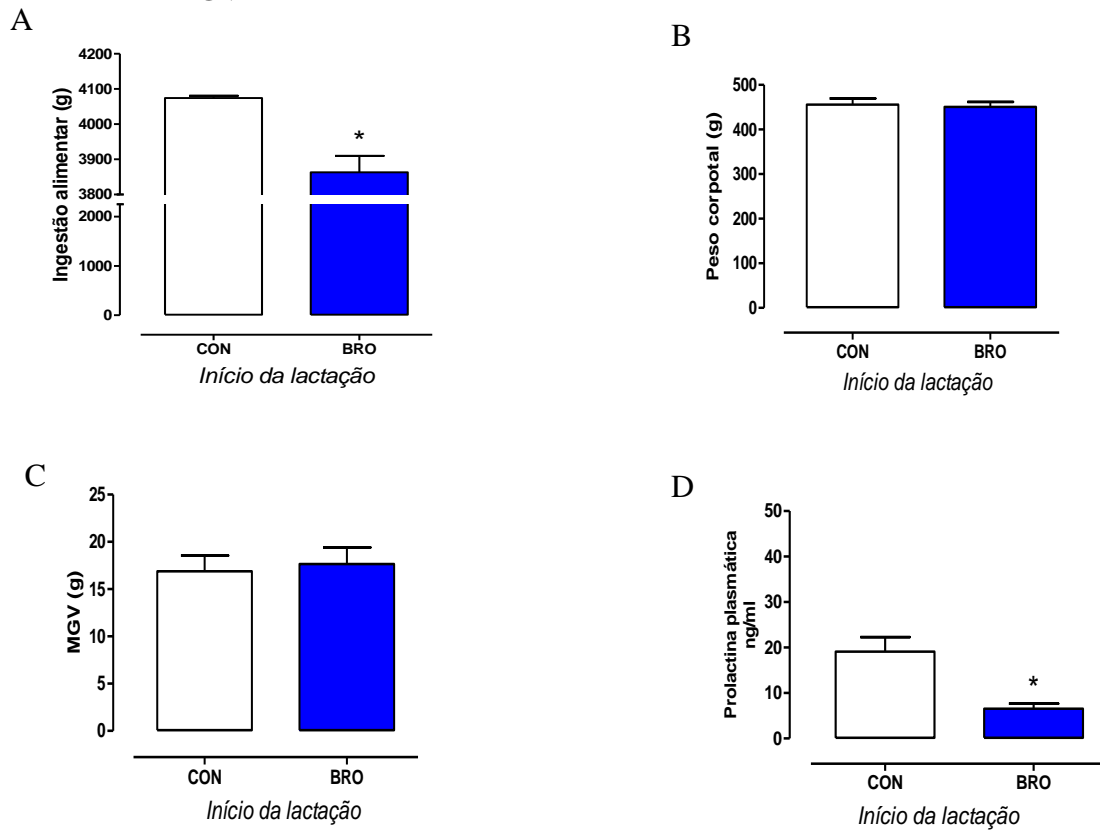
Fonte: A autora, 2016.

## 4.2 Experimento 2: tratamento neonatal com BRO durante a lactação

### 4.2.1 Animais tratados com BRO no início da lactação (PN1-10)

Os animais que receberam BRO nos 10 primeiros dias de lactação (PN1-10), apresentaram menor ingestão de ração aos 180 dias (-5%, P <0,05, a Fig. 11A), no entanto apresentaram massa corporal (Fig. 12B) e MGV (Fig. 12C) normais. Os animais tratados com o agonista dopaminérgico também apresentaram hipoprolactinemia (-66%, P <0,05, Fig.12D).

Figura 12 – Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO na ingestão, peso e MGV



Legenda: Ingestão de alimentos (A), massa corporal (B), MGV (C) e prolactina plasmática (D) aos 180 dias. Animais tratados com BRO (BRO- barras azuis) ou metanol-salina (COM - barras abertas) durante os 10 primeiros dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$ ,  $n = 8-10$  animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

A tabela 1 mostra o perfil lipídico desses animais, tanto o colesterol total plasmático, quanto o HDL, LDL, TGL, LDL, colesterol e TGL hepáticos, foram semelhantes ao grupo controle. A figura 12 mostra o perfil glicídico, animais tratados com BRO apresentaram insulina plasmática (Fig.13A), glicemia (Fig.13B) a curva da glicemia (Fig.13C) e TOTG (Fig.13D) normais.

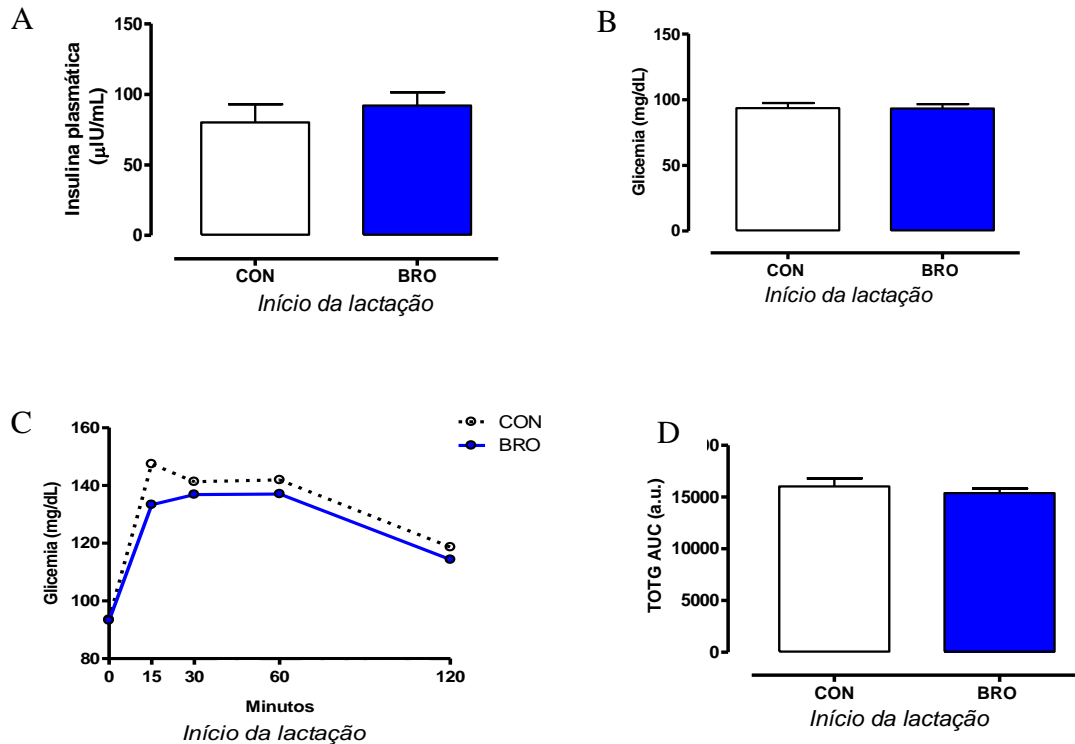
Tabela 1 - Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO, sobre o perfil lipídico no plasma e no fígado em ratos machos em PN180.

| <b>Início da lactação (PN1-10)</b>   |              |              |
|--------------------------------------|--------------|--------------|
|                                      | <b>CON</b>   | <b>BRO</b>   |
| <b>Colesterol plasmático (mg/l)</b>  | 60,80 ± 3,28 | 63,13 ± 4,64 |
| <b>HDL-c plasmático (mg/l)</b>       | 25,20 ± 1,45 | 26,88 ± 0,89 |
| <b>LDL-c plasmático (mg/l)</b>       | 22,00 ± 2,19 | 18,70 ± 2,94 |
| <b>TGL plasmático (mg/l)</b>         | 49,75 ± 7,28 | 41,70 ± 3,58 |
| <b>VLDL-c plasmático (mg/l)</b>      | 10,13 ± 1,46 | 8,40 ± 0,72  |
| <b>Colesterol hepático (mg/l)/mg</b> | 2,16 ± 0,23  | 3,03 ± 0,35  |
| <b>TGL hepático (mg/l)/mg</b>        | 3,72 ± 0,43  | 3,46 ± 0,45  |

Legenda: CON: ratos controle; BRO: ratos tratados com BRO; PN: dia pós-natal; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; TG: triglicerídeos. Os valores são apresentados como média ± E.P.M. \* P <0,05. n = 8-10 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

Figura 13 – Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre o perfil glicídico

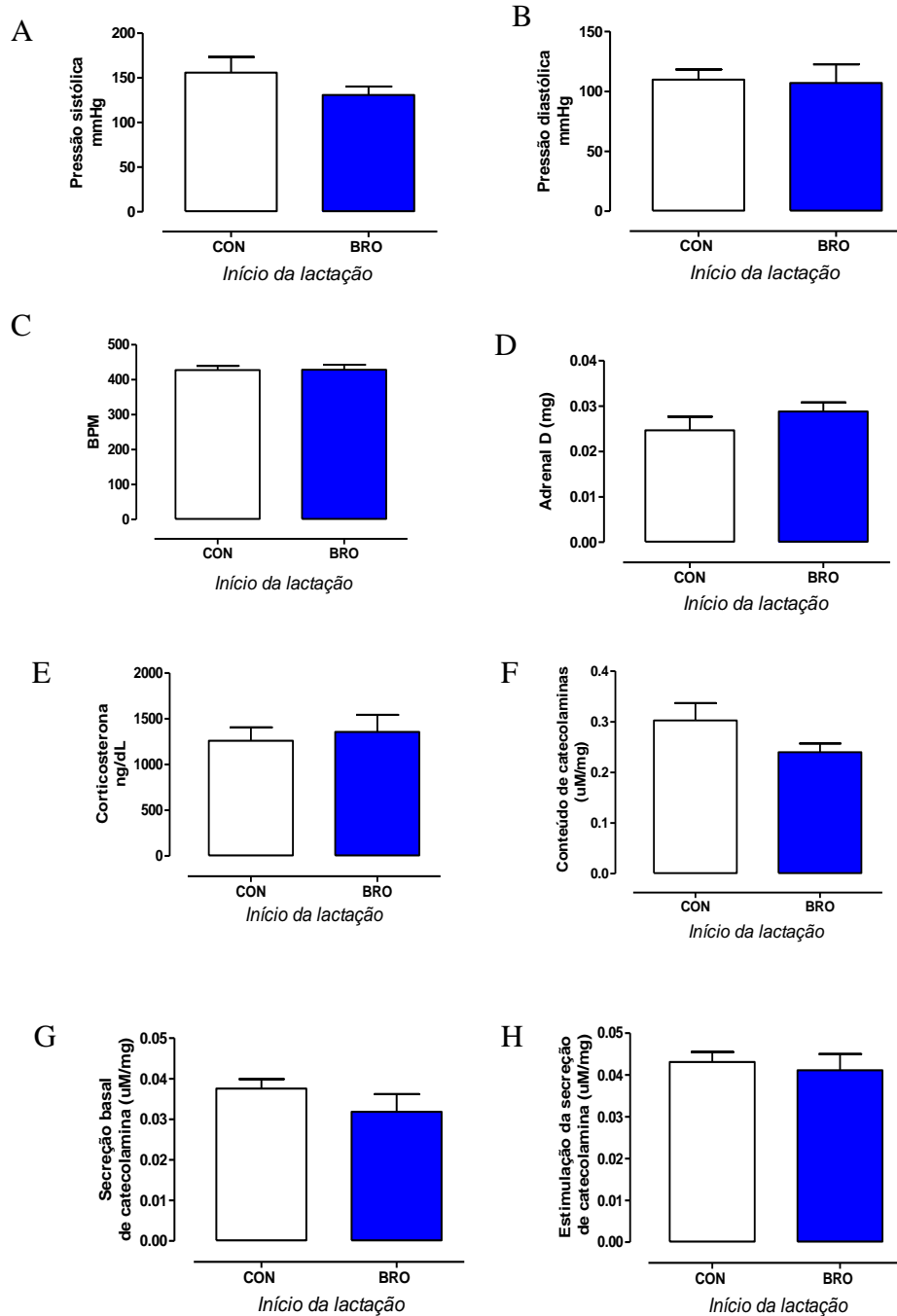


Legenda: Insulina plasmática (A), glicemia de jejum (B), curva glicêmica (C) e Teste de tolerância oral a glicose (TOTG) (D). Animais tratados com BRO (BRO - barras azuis) ou metanol-salina (COM - barras abertas) durante os 10 primeiros dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$ ,  $n = 8-10$  animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

Os animais que receberam BRO no início da lactação apresentaram, na idade adulta, pressão sistólica (Fig.14A), pressão diastólica (Fig.14B) e taxa batimento cardíaco (Fig.14C) normais. Ao analisar o peso da adrenal direita (Fig.14D), a corticosterona plasmática (Fig.14E) e o conteúdo (Fig.14F) e secreção basal e estimulada (Fig.14G e 14H) de catecolaminas, também não encontramos diferença.

Figura 14 - Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre pressão sanguínea, batimento cardíaco, corticosterona plasmática e conteúdo e secreção de catecolaminas.

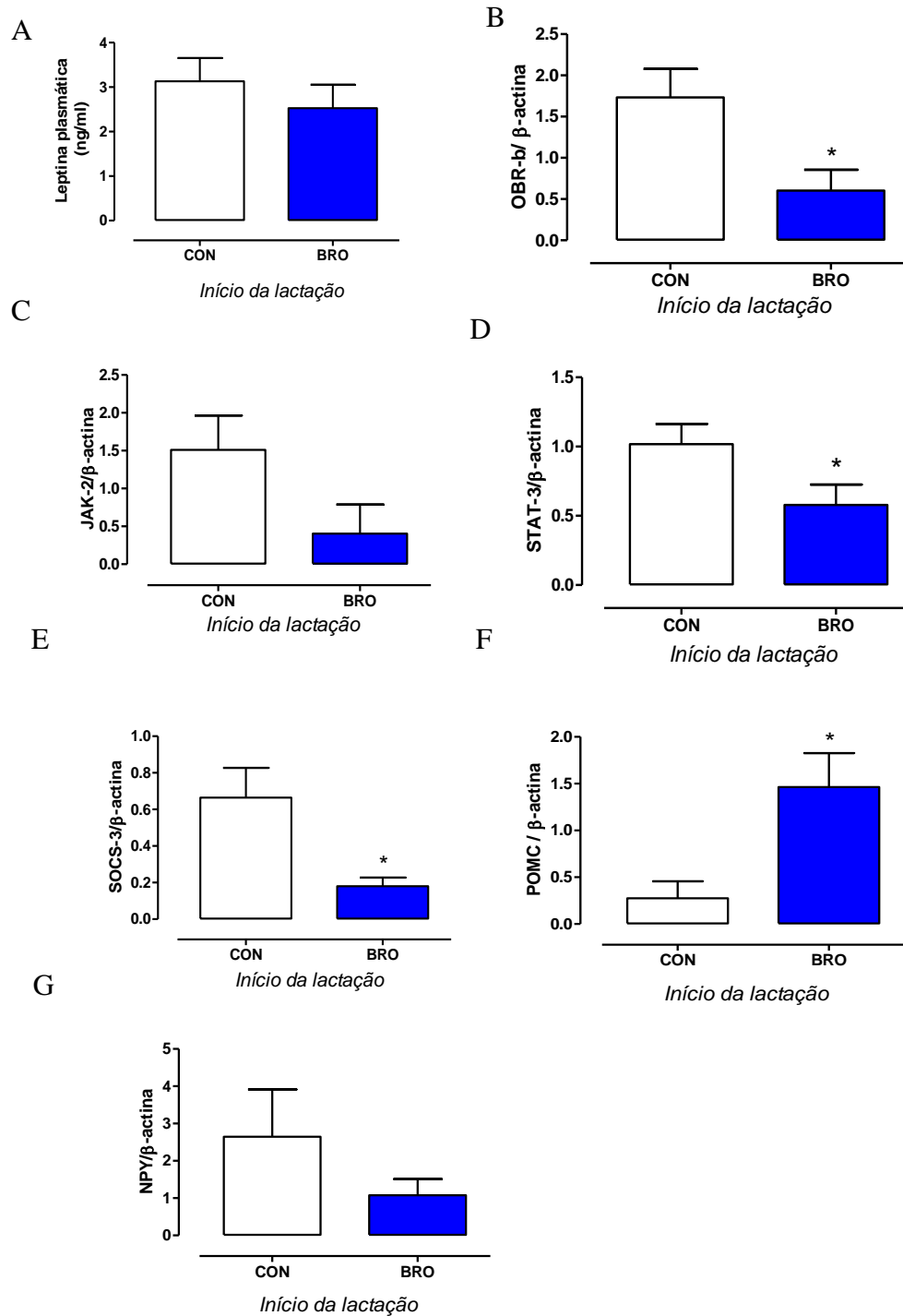


Legenda: Pressão sistólica (A), pressão diastólica (B), frequência cardíaca (C), massa da adrenal direita (D), corticosterona plasmática (E), conteúdo de catecolaminas (F), secreção basal (G) e estimulada (H) de catecolamina. Animais tratados com BRO (BRO - barras azuis) ou metanol-salina (CON - barras abertas) durante os 10 primeiros dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$ ,  $n = 8-10$  animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

A figura 14 mostra a leptina plasmática e a análise da expressão da via deste hormônio no ARC e dos neuropeptídeos NPY e POMC, os animais tratados com BRO apresentaram níveis de leptina semelhante ao grupo COM (Fig.15A), em relação a via, esses animais apresentaram diminuição da expressão do RNAm de OBR-b (-35 %,  $P < 0,05$ , Fig.15B), STAT-3 (-57 %,  $P < 0,05$ , Fig.15D) e SOCS-3 (-27 %,  $P < 0,05$ , Fig.15E) e a expressão de JAK-2 (Fig.15C) foi semelhante ao grupo controle. Encontramos aumento na expressão do RNAm de POMC (+432%,  $P < 0,05$ , Fig.15F) e não encontramos diferença na expressão de NPY (Fig.15G).

Figura 15 – Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre a leptina plasmática e a expressão da via da leptina no ARQ e dos neuropeptídeos



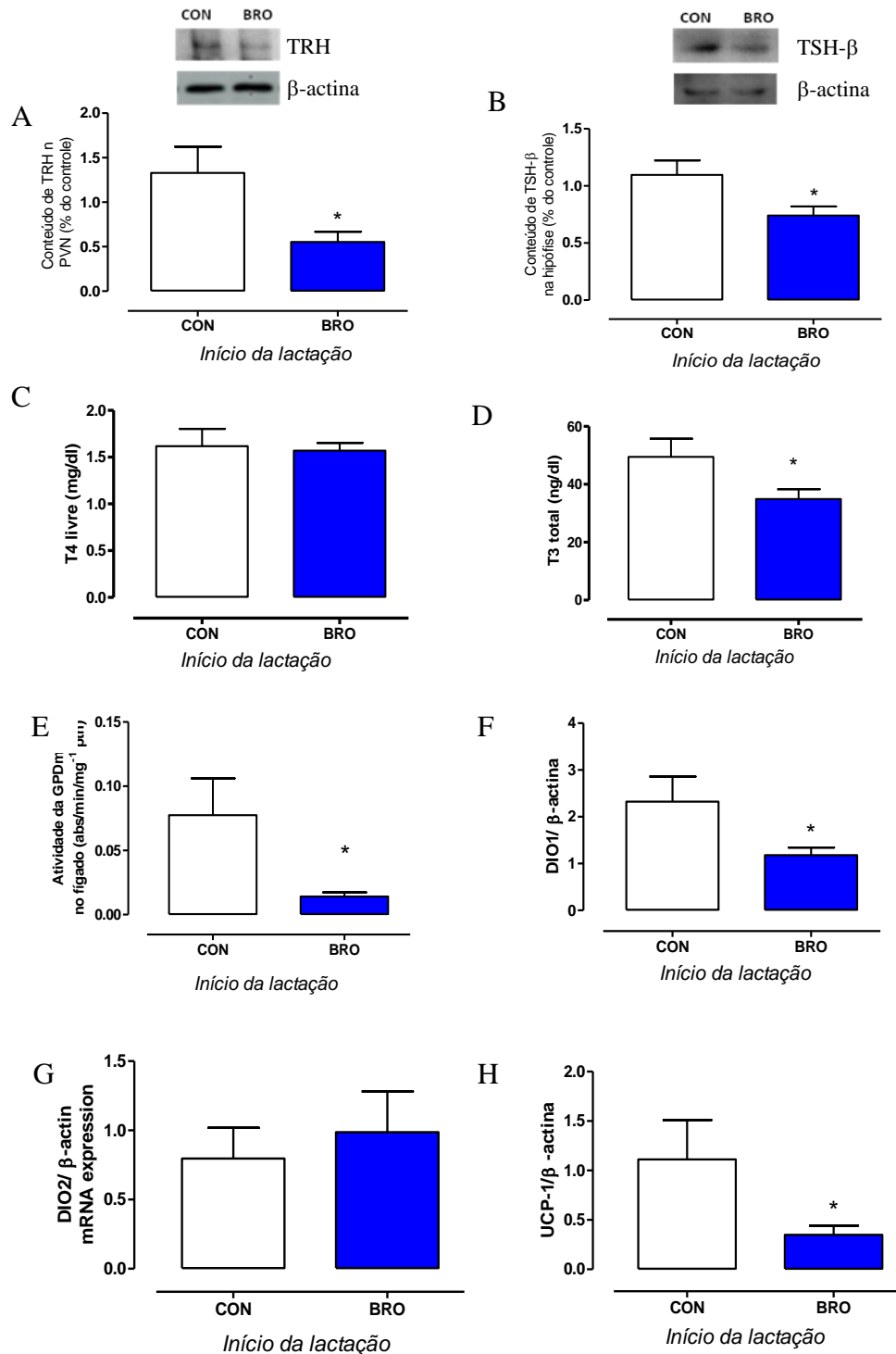
Legenda: Leptina plasmática (A), expressão do RNAm de OBR-b (B), Jak-2 (C), STAT-3 (D), SOCS-3 (E), POMC (F) e NPY (G). Animais tratados com BRO (BRO - barras azuis) ou metanol-salina (CON - barras abertas) durante os 10 primeiros dias de lactação. Os valores são apresentados como média ± E.P.M. \* P < 0,05, n = 8-10 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.



Na figura 16 é mostrada a avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e os parâmetros metabólicos do hormônio da tireoide aos 180 dias. O grupo BRO apresentou baixo conteúdo de TRH no PVN (-58%,  $P < 0,05$ , Fig.16A) e do conteúdo de TSH na hipófise (-32%,  $P < 0,05$ , Fig.16B), seguido por baixo T3 plasmático (-29%,  $P < 0,05$ , Fig.16D). No entanto, o T4 plasmático ( Fig.16C) não foi alterado, quando comparado ao grupo CON. Animais tratados com BRO apresentaram ainda baixa expressão do RNAm de UCP-1 no TAM (-34%,  $P < 0,05$ , Fig. 16H ) e de Dio1 no fígado (-49%,  $P < 0,05$ , Fig.16F), no entanto a expressão do RNAm da Dio2 no TAM, não apresentou diferença (Fig.16G) quando comparado ao grupo CON. A atividade da GPDm também foi encontrada diminuída (-81%,  $P < 0,05$ , Fig.16E).

Figura 16 – Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e os parâmetros metabólicos do hormônio da tireoide

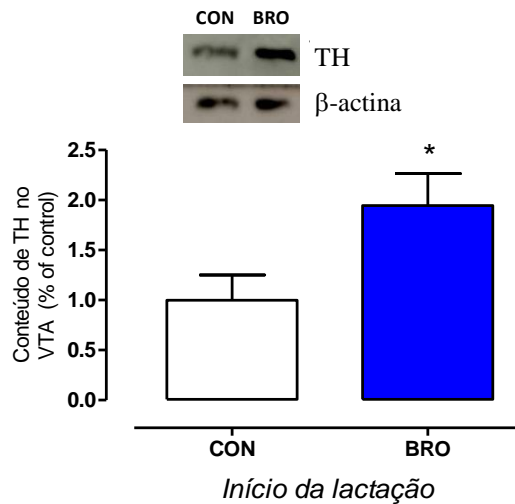


Legenda: Conteúdo de TRH no PVN (A) e de TSH na hipófise (B); T4 livre (C) e T3 total (D) plasmático; atividade hepática de GPDm (E), expressão do RNAm de Dio1 no fígado (F) e Dio 2 (G) e UCP-1 (H) no TAM. Animais tratados com BRO (BRO - barras azuis) ou metanol-salina (COM - barras abertas) durante os 10 primeiros dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \* P < 0,05, n = 8-10 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

A via dopaminérgica foi avaliada no VTA, NAc e DS. Foi encontrado aumento no conteúdo de TH no VTA (+94%,  $P < 0,05$ , Fig.17).

Figura 17 – Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre a expressão de TH no VTA

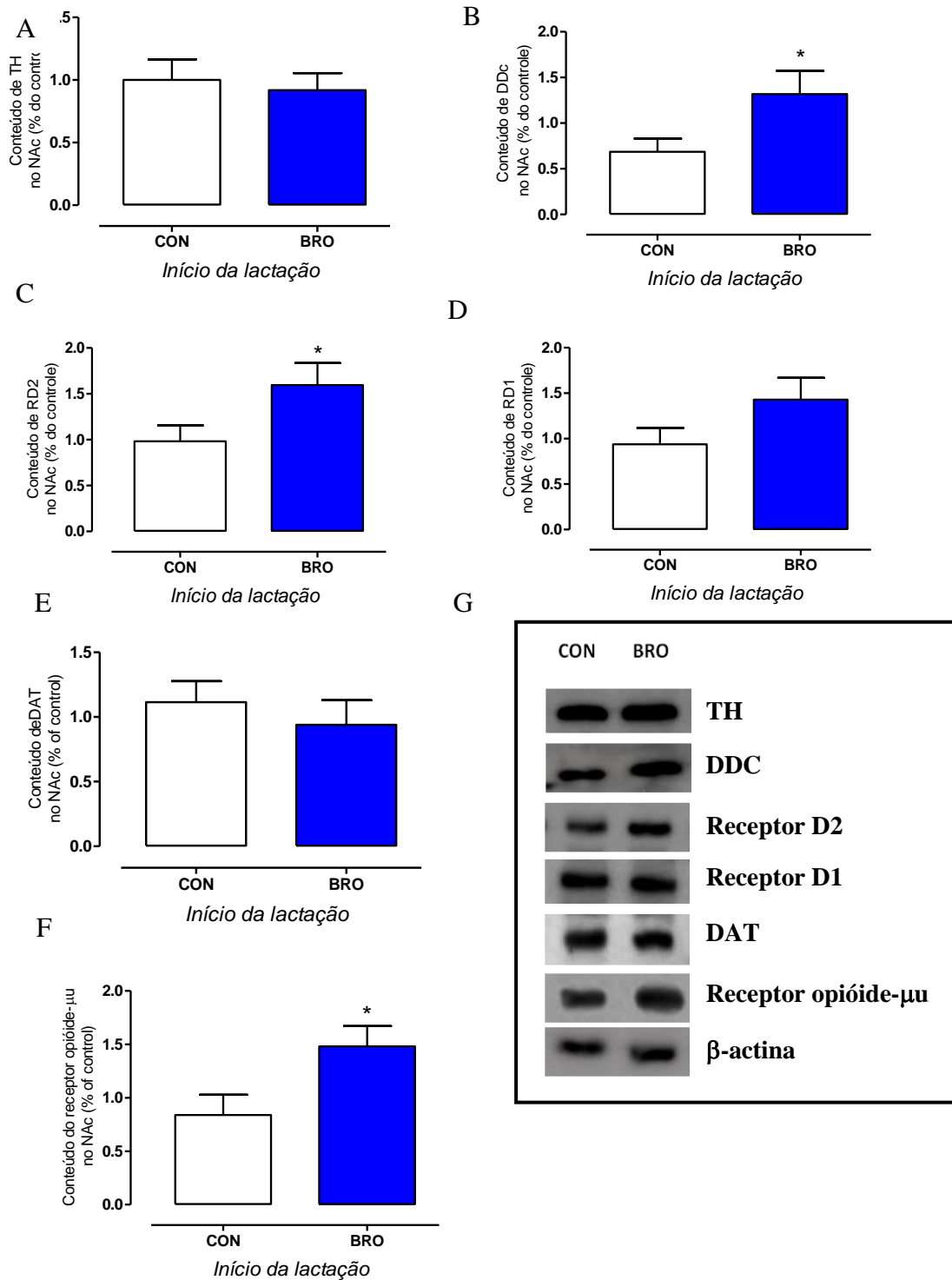


Legenda: Conteúdo de TH no VTA. Animais tratados com BRO (BRO - barras azuis) ou metanol-salina (COM - barras abertas) durante os 10 primeiros dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$ ,  $n = 6$  animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

No NAc o conteúdo de TH não foi alterado (Fig.18A), o conteúdo da DDC estava aumentado (+53%,  $P < 0,05$ , Fig.18B) assim como o conteúdo de RD2 (+62%,  $P < 0,05$ , Fig.18C). O conteúdo de RD1 teve um aumento de 52% porém não significativo (Fig.18D), enquanto que o conteúdo de DAT estava semelhante ao grupo CON (Fig.18E) e do receptor Opióide  $\mu$  estava aumentado (+76%, Fig.18F).

Figura 18 – Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre a expressão da via da dopamina no NAc

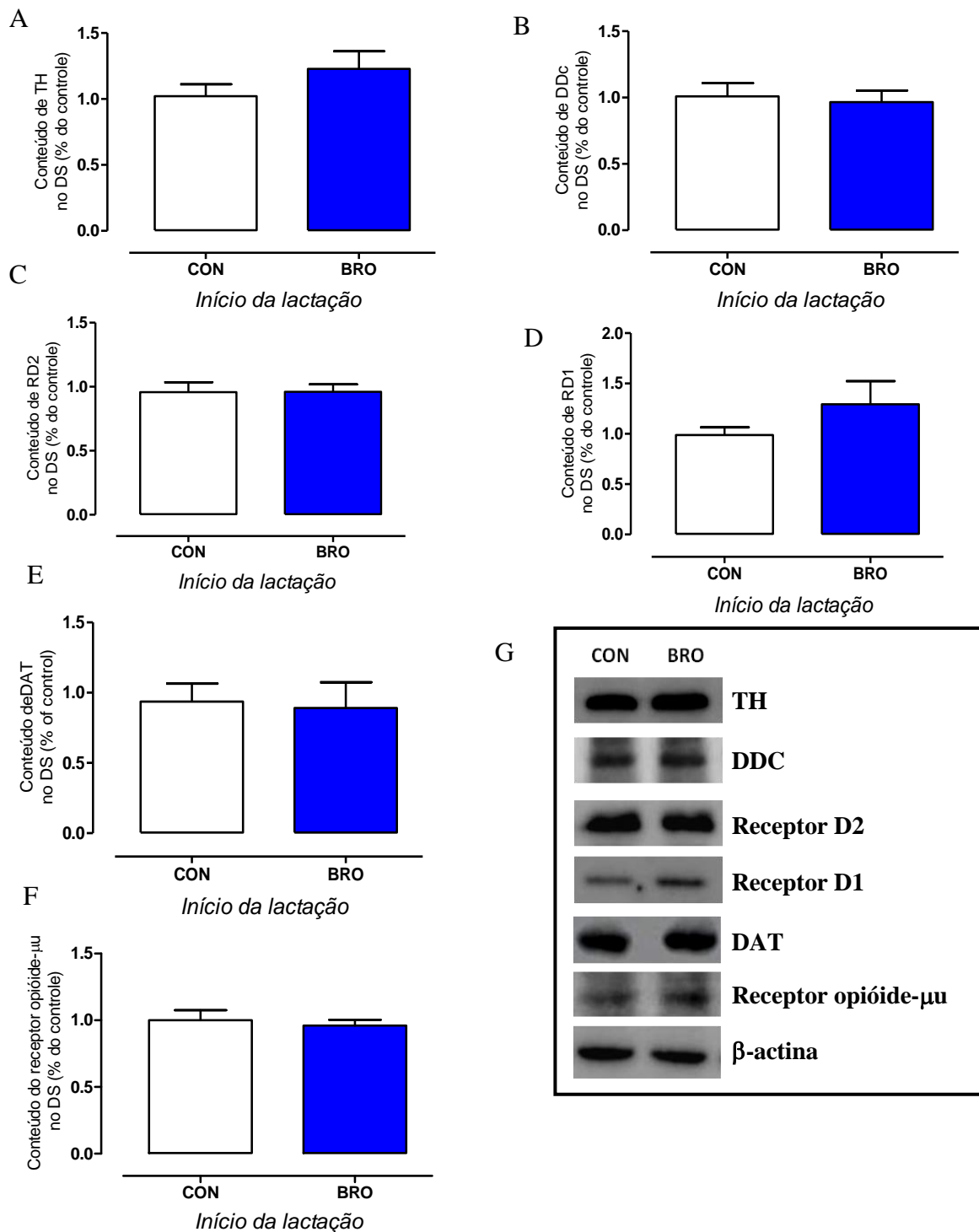


Legenda: Conteúdo de TH (A), DDC (B), RD2 (C), RD1 (D), DAT (E) e receptor opióide- $\mu$  (F) no NAc. As bandas das proteínas são demonstradas na figura G. Animais tratados com BRO (BRO - barras azuis) ou metanol-salina (CON - barras abertas) durante os 10 primeiros dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$ ,  $n = 7-10$  animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

No DS o conteúdo de TH não estava alterado (Fig.19A) assim como o conteúdo do DDc (Fig.19B) e RD2 (Fig.19C). Encontramos aumento no conteúdo de RD1 (31%,  $P < 0,05$ , Fig.18D), em relação ao conteúdo de DAT (Fig.19E) e receptor Opióide  $\mu$  (Fig.19F), não houve alteração.

Figura 19 – Efeitos do tratamento, pós-natal precoce (PN1-10), com BRO sobre a expressão da via da dopamina no NAc



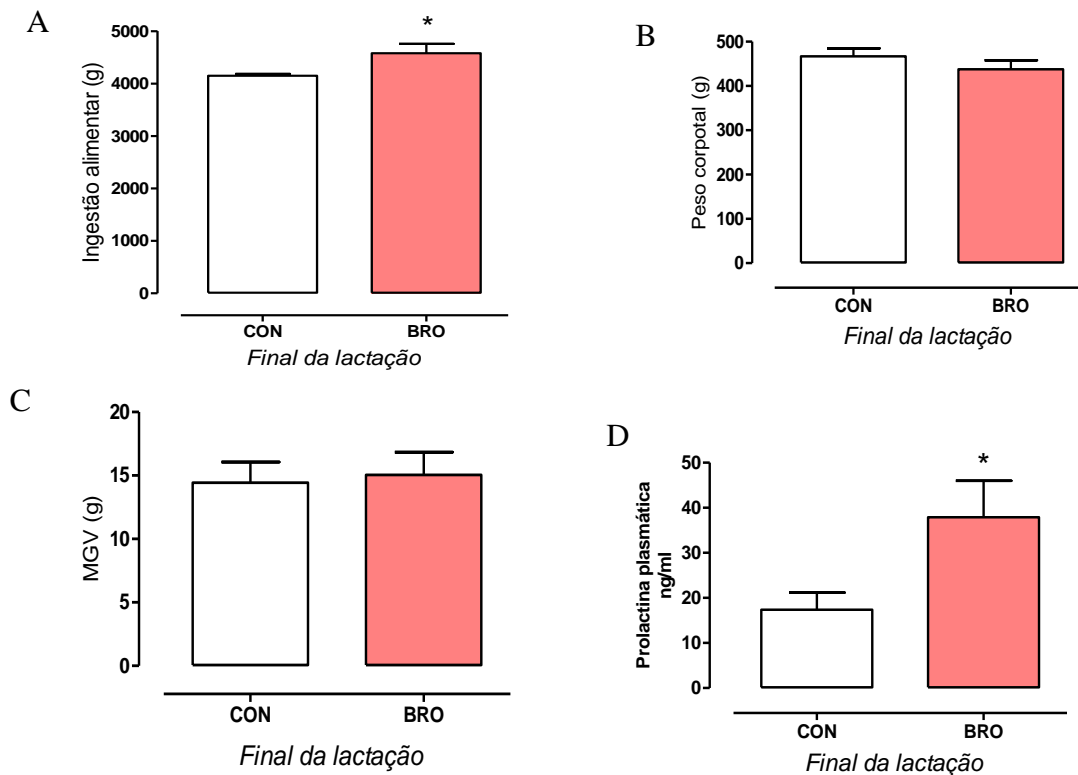
Legenda: Conteúdo de TH (A), DDC (B), RD2 (C), RD1 (D), DAT (E) e receptor opióide- $\mu$  (F) no DS. As bandas das proteínas são demonstradas na figura G. Animais tratados com BRO (BRO - barras azuis) ou metanol-salina (CON - barras abertas) durante os 10 primeiros dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$ ,  $n = 7-10$  animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

#### 4.2.2 Animais tratados com BRO no final da lactação (PN11-20)

Os animais que receberam BRO nos 10 últimos dias de lactação (PN11-20), apresentaram maior ingestão alimentar aos 180 dias (+10%,  $P < 0,05$ , a Fig. 19A), no entanto apresentaram massa corporal (Fig.20B ) e MGV (Fig.20C) normais. Além disso esses animais apresentaram hiperprolactinemia (+118%,  $P < 0,05$ , Fig.20D).

Figura 20 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), na ingestão, peso e MGV



Legenda: Ingestão de alimentos (A), massa corporal (B), MGV (C) e prolactina plasmática (D) aos 180 dias. Animais tratados com BRO (BRO- barras salmão) ou metanol-salina (COM - barras abertas) durante os 10 últimos dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$ ,  $n = 8-10$  animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

A tabela 2 mostra o perfil lipídico desses animais, tanto o colesterol total plasmático, quanto o HDL, LDL, TGL, LDL, colesterol e TGL hepáticos, foram semelhantes ao grupo controle. A figura 21 mostra o perfil glicídico, animais tratados com BRO apresentaram insulina plasmática (Fig.21A), glicemia (Fig.21B) a curva da glicemia (Fig.21C) e TOTG (Fig.21D) normais.

Tabela 2 - Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre o perfil lipídico no plasma e no fígado em ratos machos em PN180

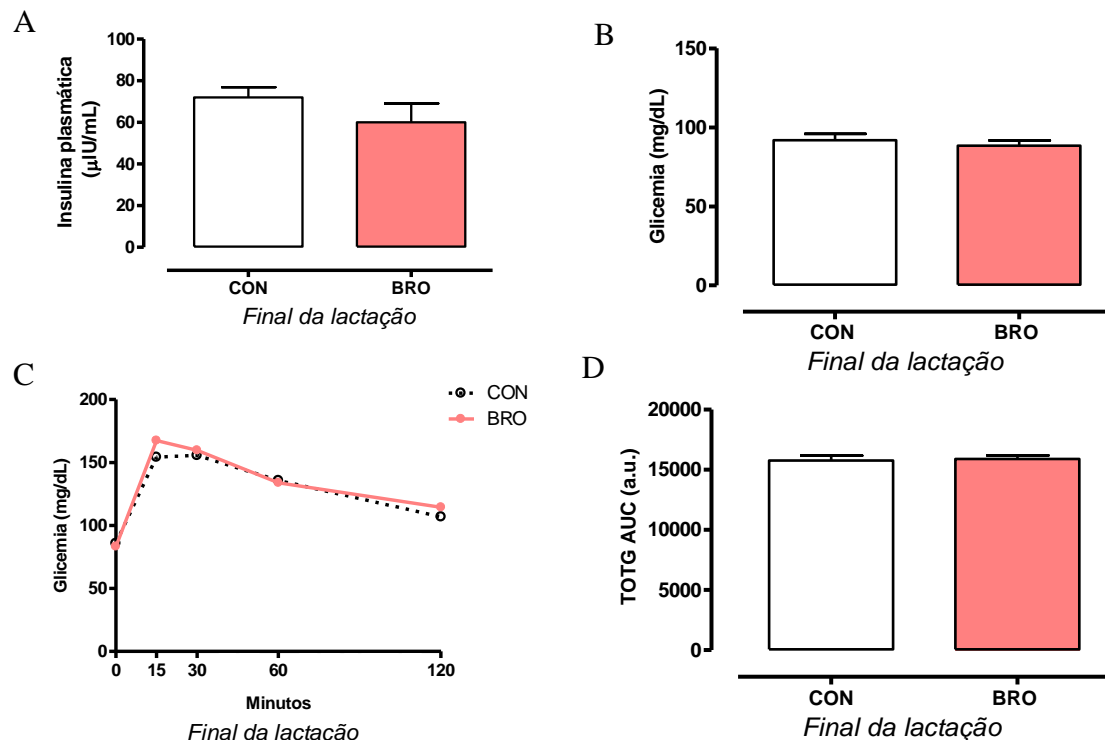
| <b>Final da lactação (PN11-20)</b>   |              |              |
|--------------------------------------|--------------|--------------|
|                                      | <b>CON</b>   | <b>BRO</b>   |
| <b>Colesterol plasmático (mg/l)</b>  | 56,50 ± 2,87 | 50,30 ± 3,5  |
| <b>HDL-c plasmático (mg/l)</b>       | 24,38 ± 1,1  | 23,20 ± 0,9  |
| <b>LDL-c plasmático (mg/l)</b>       | 26,00 ± 1,98 | 28,50 ± 4,44 |
| <b>TGL plasmático (mg/l)</b>         | 48,30 ± 4,02 | 46,33 ± 5,18 |
| <b>VLDL-c plasmático (mg/l)</b>      | 9,60 ± 0,76  | 9,33 ± 1,02  |
| <b>Colesterol hepático (mg/l)/mg</b> | 1,66 ± 0,10  | 1,82 ± 0,17  |
| <b>TGL hepático (mg/l)/mg</b>        | 1,96 ± 0,10  | 1,76 ± 0,04  |

Legenda: CON: ratos controle; BRO: ratos tratados com BRO; PN: dia pós-natal; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; TG: triglicerídeos. Os valores são apresentados como média ± E.P.M. \* P <0,05. n = 8-10 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.



Figura 21 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre o perfil glicídico

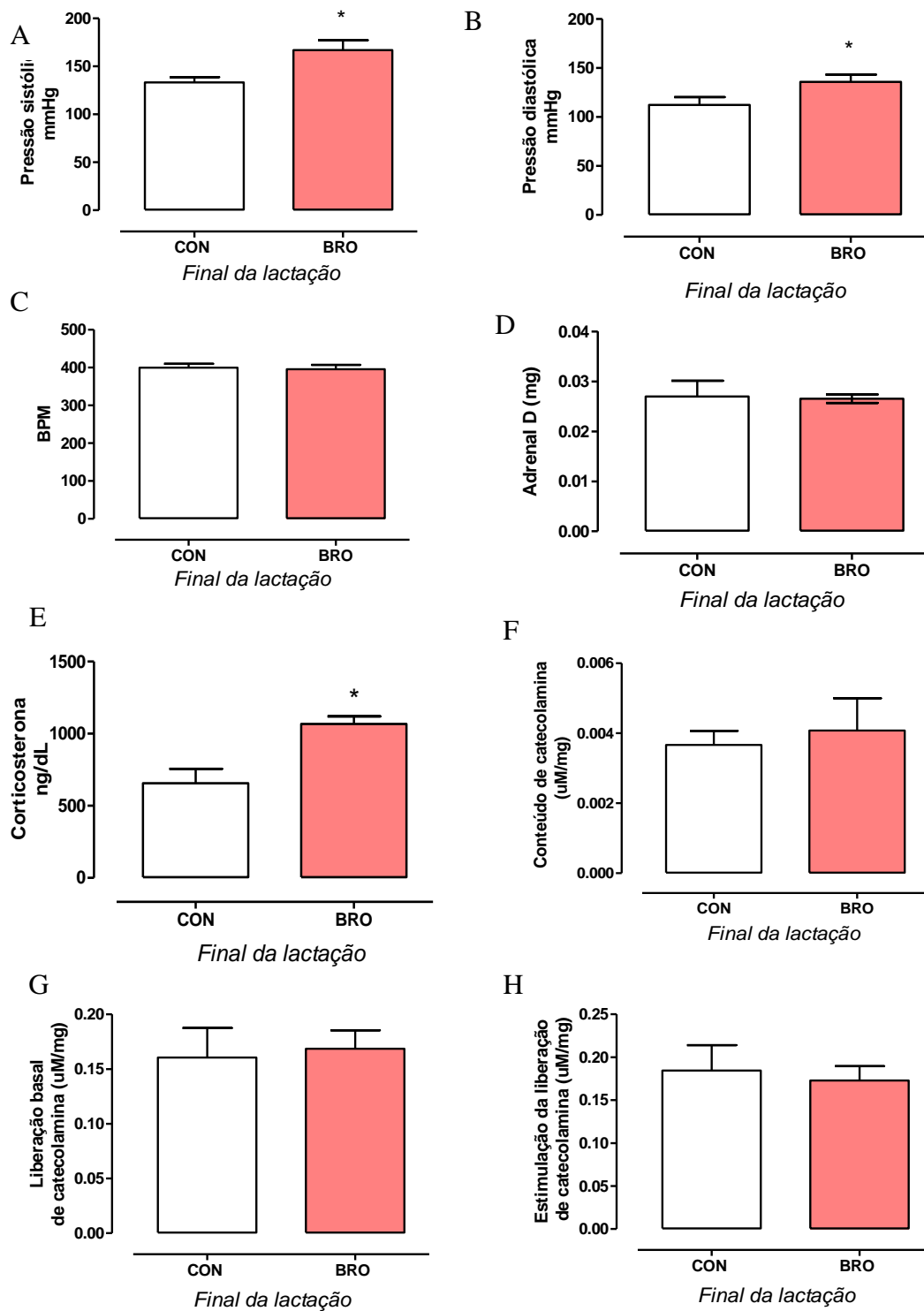


Legenda: Insulina plasmática (A), glicemia de jejum (B), curva glicêmica (C) e Teste de tolerância oral a glicose (TOTG) (D). Animais tratados com BRO (BRO- barras salmão) ou metanol-salina (COM - barras abertas) durante os 10 últimos dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$ ,  $n = 8-10$  animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

Os animais que receberam BRO no final da lactação apresentaram, na idade adulta, aumento na pressão sistólica (+25%,  $P < 0,05$ , Fig.22A) e na pressão diastólica (+21%,  $P < 0,05$ , Fig.22B), a taxa de batimento cardíaco (Fig.22C) normal. O peso da adrenal direita (Fig.22D), foi semelhante ao grupo CON e encontramos aumento na corticosterona plasmática (+62%,  $P < 0,05$ , Fig.22E). O conteúdo (Fig.22F), assim como a secreção basal e estimulada de catecolaminas (Fig.22G e 22H) foi semelhante ao grupo CON.

Figura 22 - Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre pressão sanguínea, batimento cardíaco, corticosterona plasmática e conteúdo e secreção de catecolaminas

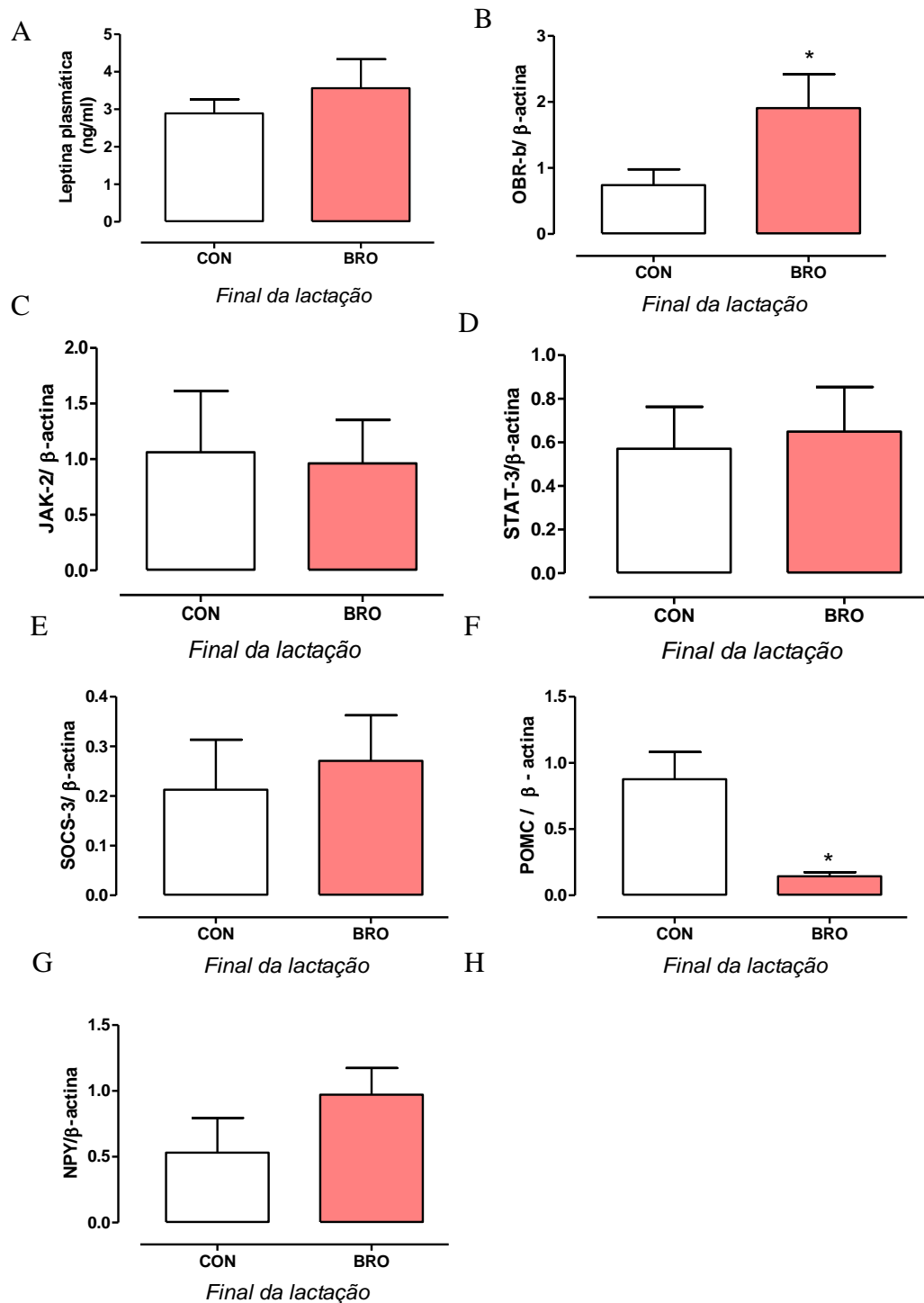


Legenda: Pressão sistólica (A), pressão diastólica (B), frequência cardíaca (C), massa da adrenal direita (D), corticosterona plasmática (E), conteúdo de catecolaminas (F), secreção basal (G) e estimulada (H) de catecolamina. Animais tratados com BRO (BRO- barras salmão) ou metanol-salina (CON - barras abertas) durante os 10 últimos dias de lactação. Os valores são apresentados como média ± E.P.M. \* P < 0,05, n = 8-10 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

A figura 23 mostra a leptina plasmática e a análise da expressão da via deste hormônio no ARC e dos neuropeptídeos NPY e POMC, os animais tratados com BRO apresentaram níveis de leptina semelhante ao grupo CON (Fig.23A), em relação a via, esses animais apresentaram aumento da expressão do RNAm de OBR-b (+158 %,  $P < 0,05$ , Fig.23B), e não encontramos diferença significativa da expressão do RNAm de STAT-3 (Fig.23D), JAK-2 (Fig.23C) e SOCS-3 (Fig.23E). Encontramos diminuição na expressão do RNAm de POMC (-83%, %,  $P < 0,05$ , Fig.23F) e não encontramos diferença na expressão de NPY (Fig.23G).

Figura 23 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre a leptina plasmática e a expressão da via da leptina no ARQ e dos neuropeptídeos



Legenda: Leptina plasmática (A), expressão do RNAm de OBR-b (B), Jak-2 (C), STAT-3 (D), SOCS-3 (E), POMC (F) e NPY (G). Animais tratados com BRO (BRO- barras salmão) ou metanol-salina (CON - barras abertas) durante os 10 últimos dias de lactação. Os valores são apresentados como média ± E.P.M. \* P < 0,05, n = 8-10 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

Na figura 24 é mostrada a avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e os parâmetros metabólicos do hormônio da tireoide aos 180 dias. O grupo BRO apresentou aumento no conteúdo de TRH no PVN (+125%,  $P < 0,05$ , Fig.24A) e do conteúdo normal de TSH na hipófise (Fig.24B), seguido por alto T3 plasmático (+35%,  $P < 0,05$ , Fig.24D). No entanto, o T4 plasmático (Fig.24C) não foi alterado, quando comparado ao grupo CON. Animais tratados com BRO apresentaram ainda alta expressão do RNAm de UCP-1 no TAM (+63%,  $P < 0,05$ , Fig.24H ) e expressão normal de Dio1 no fígado (Fig.24F), no entanto a expressão do RNAm da Dio2 no TAM, apresentou um aumento (+88%,  $P < 0,05$ , Fig. 23G), assim como a atividade hepática da GPDm (+86%,  $P < 0,05$ , Fig.24E).

Figura 24 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e os parâmetros metabólicos do hormônio da tireoide. (continua)

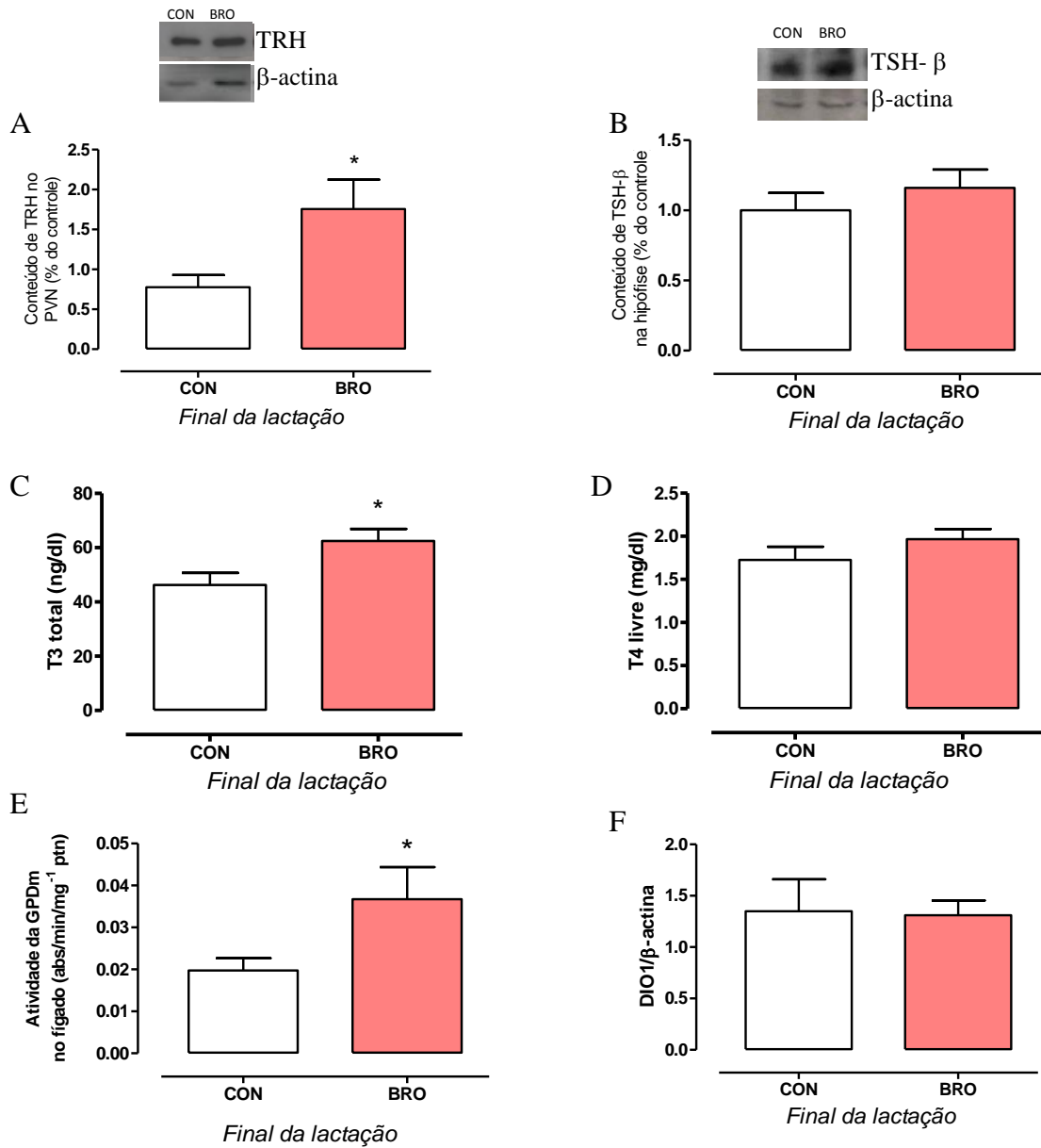
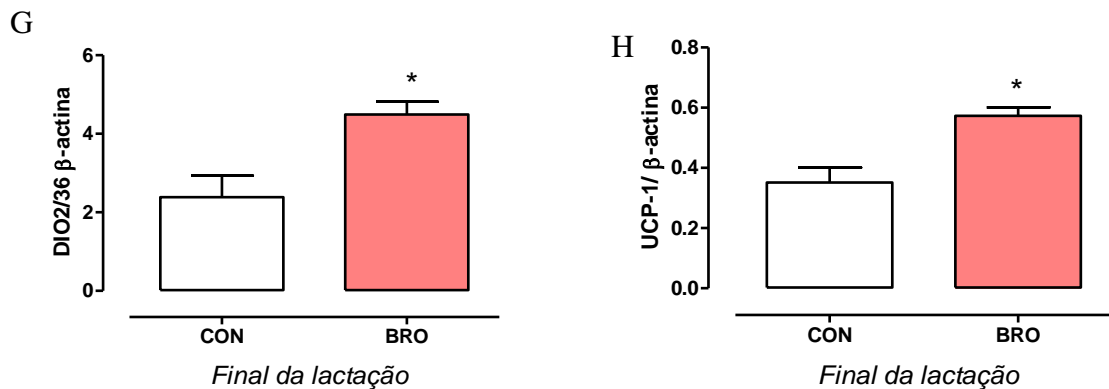


Figura 24 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide e os parâmetros metabólicos do hormônio da tireoide (conclusão)



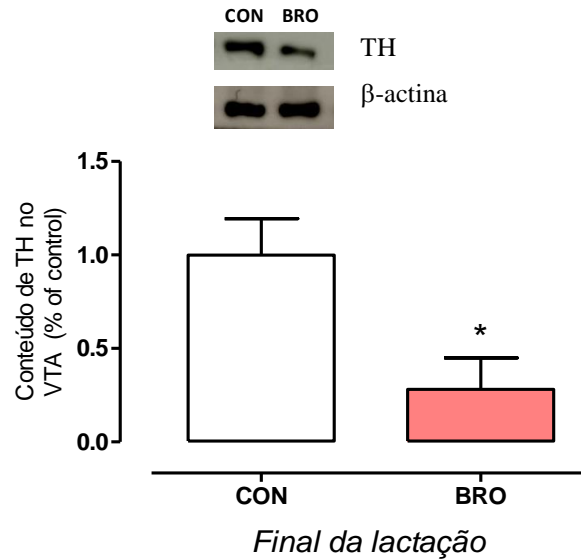
Legenda: Conteúdo de TRH no PVN (A) e de TSH na hipófise (B); T4 livre (C) e T3 total (D) plasmático; atividade hepática de GPDm (E), expressão do RNAm de Dio1 no fígado (F) e Dio 2 (G) e UCP-1 (H) no TAM. Animais tratados com BRO (BRO- barras salmão) ou metanol-salina (CON - barras abertas) durante os 10 últimos dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$ ,  $n = 8-10$  animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

#### 4.2.3 Efeito do tratamento com BRO no final da lactação sobre o sistema dopaminérgico

A via dopaminérgica foi avaliada no VTA, NAc e DS. Foi encontrado diminuição do conteúdo de TH no VTA (-72% %,  $P < 0,05$ , Fig.25).

Figura 25 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre a expressão de TH no VTA



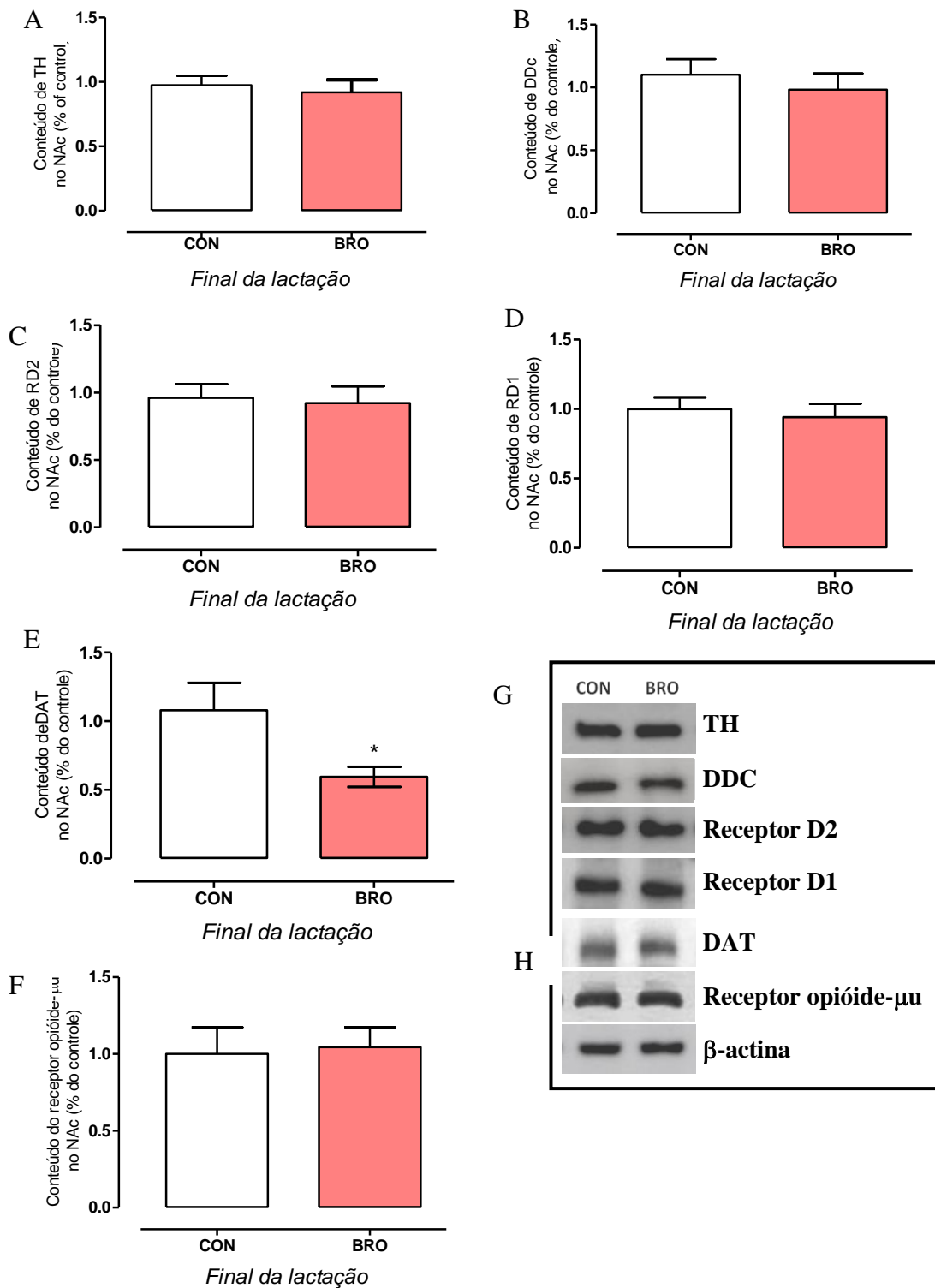
Legenda: Conteúdo de TH no VTA. Animais tratados com BRO (BRO- barras salmão) ou metanol-salina (CON - barras abertas) durante os 10 últimos dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$ ,  $n = 6$  animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

No NAc o conteúdo de TH não foi alterado (Fig.26A), assim como o conteúdo da DDC (Fig.26B), de RD2 (Fig.26C), RD1 (Fig.26D) e uma diminuição do conteúdo de DAT (-45%,  $P < 0,05$  Fig.26E) e conteúdo normal de receptor Opióide  $\mu$  ( Fig.26F).



Figura 26 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre a expressão da via da dopamina no NAc

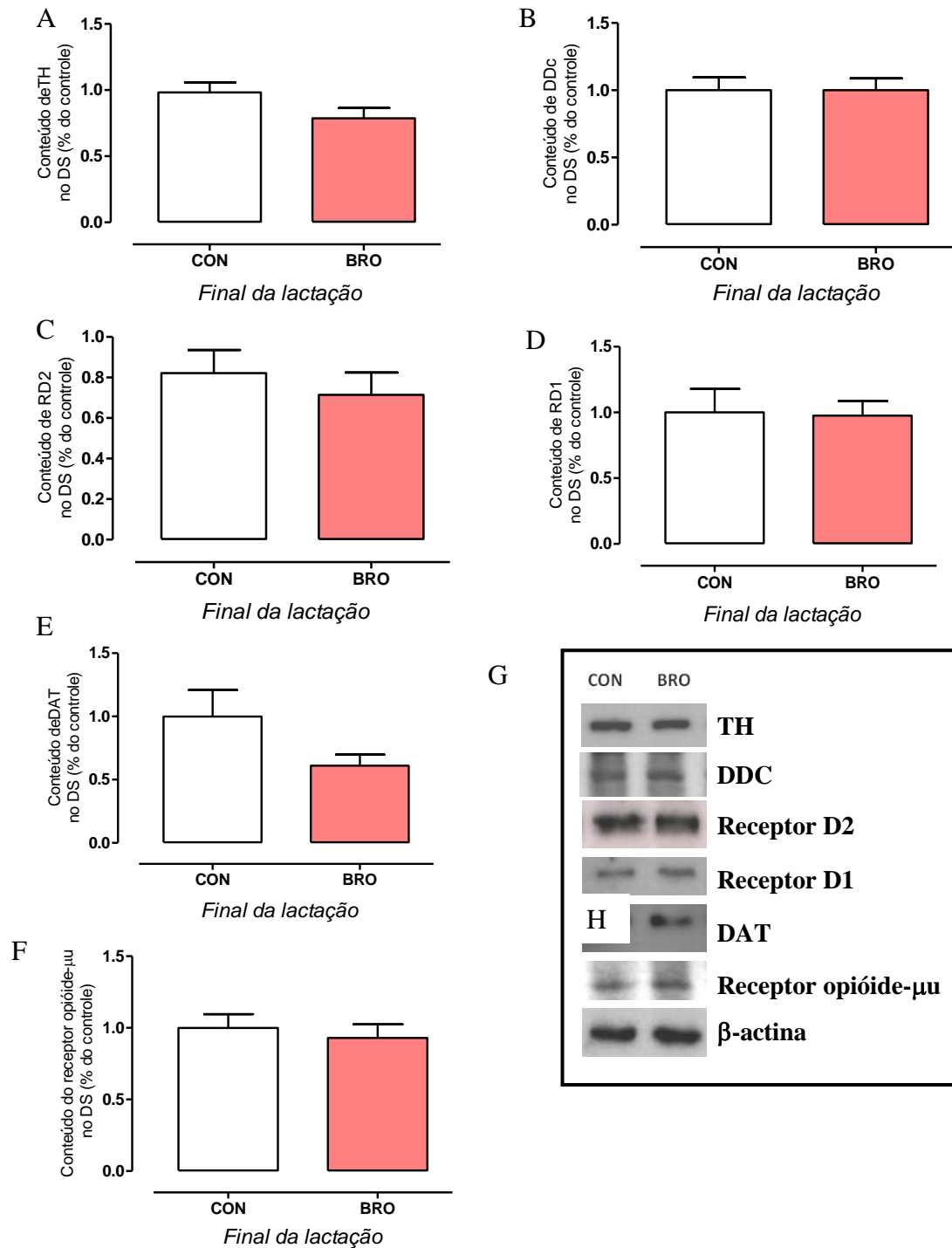


Legenda: Conteúdo de TH (A), DDC (B), RD2 (C), RD1 (D), DAT (E) e receptor opióide- $\mu$  (F) no NAc. As bandas das proteínas são demonstradas na figura G. Animais tratados com BRO (BRO- barras salmão) ou metanol-salina (CON - barras abertas) durante os 10 últimos dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$ ,  $n = 7-10$  animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

No DS não encontramos diferença no conteúdo de TH (Fig.27A), DDc (Fig.27B), RD2 (Fig.27C), RD1 (31%,  $P < 0,05$ , Fig.27D), DAT (Fig.27E) e receptor Opióide  $-\mu$  (Fig.27F).

Figura 27 – Efeitos do tratamento com BRO no final da lactação (PN11-20), sobre a expressão da via da dopamina no DS



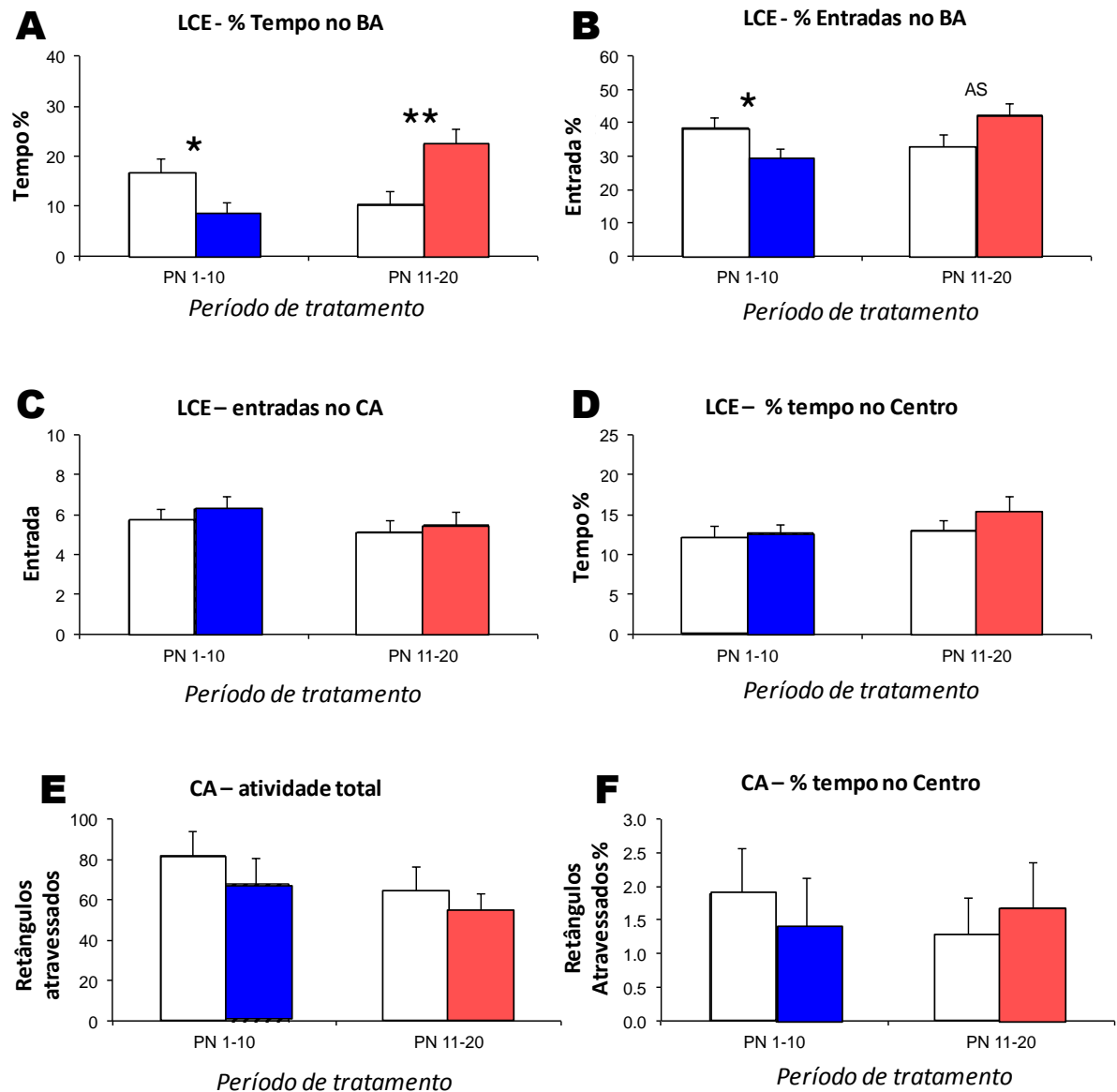
Legenda: Conteúdo de TH (A), DDC (B), RD2 (C), RD1 (D), DAT (E) e receptor opióide- $\mu$  (F) no DS. As bandas das proteínas são demonstradas na figura G. Animais tratados com BRO (BRO- barras salmão) ou metanol-salina (CON - barras abertas) durante os 10 últimos dias de lactação. Os valores são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. \* P < 0,05, n = 7-10 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2016.

### 4.3 Efeito do BRO-tratos no comportamento

No LCE (Figs. 28A a 28D), foram observadas alterações significativas (idade  $\times$  grupos) para as seguintes variáveis: % Tempo no braço a ( $F = 12,8$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,001$ ) e % Entradas no BA ( $F = 8,3$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,006$ ). Os animais tratados com BRO durante o início da lactação (PN1-10) apresentaram uma diminuição na % Tempo no BA ( $F = 4,9$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,04$ ) e na % de entradas BA ( $F = 4,9$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,04$ ) quando comparados com o grupo CON. Por outro lado, os animais tratados com BRO no final da lactação (PN11-PN20), apresentaram aumento na % Tempo no BA ( $F = 8,2$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0,009$ ) e o da % Entradas no BA nestes animais se aproximou da significância ( $F = 3,8$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,062$ ). No que diz respeito ao comportamento no CA (Fig.28E e F), não foram observados efeitos ou interações.

Figura 28 - Efeitos do tratamento com neonatal com BRO, no início (PN1-10) e no final da lactação (PN11-20) sobre o comportamento no LCE e CA



Legenda: Comportamento no labirinto em cruz elevado (A, B, C e D) e no campo aberto (E e F) na idade adulta. O comportamento de ansiedade foi medido no LCE pela % Tempo no BA (A) e a % entradas no BA (B); a atividade locomotora, foi medida pelas entradas no CA (C); a tomada de decisão foi medida pela % Tempo no centro (D). Na CA, a atividade total foi quantificada através da contagem do número de retângulos cruzados (E) e o comportamento de ansiedade como foi avaliado pela variável de % Entradas no centro. Animais tratados com BRO (BRO - barras azuis) ou metanol-salina (CON - barras abertas) durante os 10 primeiros dias de lactação. Animais tratados com BRO (BRO- barras salmão) ou metanol-salina (CON - barras abertas) durante os 10 últimos dias de lactação. Os valores são médias  $\pm$  EPM. AS  $0,10 > p \geq 0,05$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p > 0,01$ .

Fonte: A autora, 2016.

## 5 DISCUSSÃO

Proles de mães tratadas com BRO nos três últimos de lactação apresentaram uma diminuição na massa corporal ao desmame (PN21) corroborando os dados anteriores em que a injeção foi feita na mãe (Bonomo et al, 2005). Em PN22, a menor massa corporal é possivelmente devido à menor ingestão alimentar. Nessa idade foi observada menor expressão de RNAm de leptina no tecido adiposo mesentérico e subcutâneo. É possível explicar a menor produção de leptina pela desnutrição. Os níveis plasmáticos de leptina foram inalterados nesta idade, podendo ser um reflexo da maior transferência de leptina através do leite, além da hiperleptinemia do dia 21 (Bonomo et al, 2005) compensando assim, a sua menor produção. Em PN30, os animais apresentam menor comprimento corporal e menor quantidade de gordura mesentérica, porém maior expressão de RNAm de leptina nesse tecido e níveis elevados de leptina plasmática. Assim caracterizamos no modelo de desmame precoce pelo tratamento materno com BRO, um pico secundário de leptina na prole em PN30, de modo semelhante a quando a leptina é administrada aos filhotes durante os primeiros 10 dias de lactação (Toste et al, 2006).

No modelo de hiperleptinemia neonatal, foi demonstrada uma resistência à leptina, aos 30 dias, caracterizada pela ausência do seu efeito anorexígeno, redução do conteúdo hipotalâmico de OBR e aumento SOCS3 (Passos et al, 2009). Este aumento de SOCS3 resulta em resistência neuronal à leptina (Bjørnbæk, 1998;1999). No modelo atual, mostramos uma maior expressão do RNAm do OBR em PN22, acompanhado de maior expressão de STAT3 e SOCS3, sugerindo maior ação da leptina no hipotálamo, compatível com a menor ingestão apresentada por esses animais. Em PN30 esses animais apresentaram aumento de OBR, acompanhado de maior expressão de SOCS3 e menor de STAT3, que sugere uma resistência à leptina. Já foi demonstrado um aumento na expressão de RNAm de OBR no hipotálamo, num estado de hiperleptinemia (Lin et al, 2000; Madiehe et al, 2000; Fernández-Galaz et al, 2002; Wilsey et al, 2004). A expressão do RNAm de NPY foi maior, confirmando a resistência à leptina uma vez que a leptina inibe NPY. Não foi encontrada diferença na expressão de POMC, o que sugere que o NPY é o mais importante neste processo de *imprinting* em nosso modelo. A maior ação da leptina aos 22 dias pode significar um processo adaptativo onde inibir a ingestão de alimentos torna-se vantajoso quando há uma menor oferta de alimento, permitindo assim uma recuperação após o período de desmame.

Filhotes de mães tratadas com BRO na lactação apresentaram, em PN22, uma diminuição da glicemia e um aumento desta em PN30. No entanto, os níveis de insulina plasmática não diferiram, sugerindo menor sensibilidade das células beta pancreáticas à glicose, em ambos os períodos. Já foi demonstrado *in vitro* que BRO é capaz de inibir a secreção de insulina estimulada pela glicose nas células beta através do receptor adrenérgico  $\alpha$ -2 (de Leeuw van Weenen et al, 2010). Além disso Rubi e colaboradores (2005) mostraram que a dopamina inibe a secreção de insulina estimulada por glicose através de receptores D2. BRO é agonista de ambos os receptores. Além disso, foi proposto um papel protetor da prolactina sobre a função das células beta pancreáticas (Anhê et al, 2007). Uma vez que não foram detectadas alterações nos níveis séricos de prolactina no filhote BRO ao desmame (Moura et al, 2009), sugerimos que esta menor sensibilidade seja um efeito direto da dopamina. As proles de mães tratadas com BRO se tornam resistentes a insulina na idade adulta (Bonomo et al, 2007); essa menor sensibilidade pode ser um dos primeiros passos para essa resistência.

Em PN22 encontramos aumento de VLDL que pode ser devido a maior transferência de triglicerídeos através do leite, uma vez que as mães tratadas com BRO apresentam maior conteúdo de triglicerídeos no leite (Lisboa et al, 2010). Esta alteração não persistiu em PN30, no entanto, encontramos maiores níveis de colesterol plasmático em associação com menor concentração de HDL-c, bem como índices Castelli tipo I e II maiores, indicando um maior risco de aterogênese (Després, 1991). Observamos também maior conteúdo hepático de colesterol e TGO sugerindo uma disfunção hepática, possivelmente pelo acúmulo de gordura no fígado.

A hipoprolactinemia materna no fim da lactação causa hiperleptinemia e resistência hipotalâmica à leptina, hiperglicemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia além de resistência à insulina na vida adulta (Bonomo et al, 2007; de Moura et al, 2009). A maioria destas alterações metabólicas já é observada no período neonatal, sendo mais acentuada em PN30, além de resistência à leptina, assim como ocorre aos 30 dias em animais que recebem leptina no início da lactação. Assim mostramos o papel crucial da leptina como fator de *imprinting* para alterações metabólicas que ocorrem durante o desenvolvimento.

No entanto estes resultados não descartam o fato de que a passagem de BRO pelo leite possa estar exercendo alguma ação direta na prole. Os resultados do experimento 2, ajudam a entender este fenômeno.

Ao receber a BRO nos 10 primeiros dias de lactação (PN1-10), a prole apresentou aos 180 dias, menor ingestão alimentar, embora sem diferença no peso e na gordura corporal,

sugerindo um estado hipometabólico. Resultados opostos foram encontrados quando os animais receberam BRO no final da lactação (PN11-20), os quais apresentaram maior ingestão alimentar, também sem diferença de peso e gordura corporal, sugerindo um estado hipermetabólico. É plausível que um estímulo dopaminérgico neonatal, possa alterar de maneiras diferentes, dependendo do período de exposição, hormônios ligados a ingestão alimentar e balanço energético, como PRL, leptina, insulina e hormônios tireoidianos (Moore et al, 1986; Silva, 2001; Pétervári et al, 2005; Leininger et al, 2009; Volkow et al, 2011; Chong et al, 2015), assim explicando as alterações encontradas no consumo alimentar e no metabolismo desses animais.

Nos animais tratados em PN1-10, encontramos maior expressão do RNAm de POMC, mas sem diferença na expressão de NPY. Sabe-se que PRL inibe POMC (Tong & Pelletier, 1992) e de fato estes animais apresentaram uma diminuição na PRL plasmática, podendo explicar esse aumento de POMC. Os animais que recebem BRO em PN11-20, apresentaram menor expressão do RNAm de POMC, sem alteração no NPY. A hiperprolactinemia desses animais pode explicar a diminuição da expressão de POMC. Sabendo que PRL estimula e o POMC inibe a ingestão alimentar, essas alterações encontradas corroboram com a ingestão alimentar desses animais.

Analisando a via mesolímbica, encontramos no VTA dos animais que receberam BRO em PN1-10, um aumento do conteúdo de TH, indicando uma maior síntese de dopamina. No NAc não houve alteração desta enzima, mas encontramos aumento de DDC, indicando que há um aumento de dopamina na via mesolímbica desses animais na idade adulta, o que pode justificar a hipoprolactinemia desses animais. Sabendo que essa via está ligada a busca por recompensa e maior sucetibilidade ao abuso de drogas (Vezina, 2004; Hyman et al, 2006), um aumento de dopamina nessa via pode ter efeitos comportamentais deletérios. Somado a isto, houve um aumento no receptor D2, o que pode fazer parte de um mecanismo para regular o aumento de dopamina destes animais, visto que o receptor D2 inibe a síntese e a liberação de dopamina (Tang et al, 1994; Anzalone et al, 2012). Não houve alterações no conteúdo de D1 e DAT. Ainda no NAc, houve um aumento no conteúdo do receptor opióide- $\mu$ . Um aumento deste receptor está ligado ao aumento do consumo de alimentos palatáveis e ao abuso de drogas (Zhang et al, 1998; Kelley et al, 2000; Colantuoni et al, 2001). É possível que os animais que receberam BRO no início da lactação desenvolvam maior propensão a compulsão por alimentos palatáveis, aumentando assim a suscetibilidade a obesidade, na idade adulta.



Já ao estudar a via mesolímbica nos animais que receberam BRO em PN11-20, encontramos menor conteúdo de TH no VTA, sugerindo menor síntese de dopamina, acompanhado por menor conteúdo de DAT no NAc, mostrando que existe uma diminuição compensatória na recaptção de dopamina, portanto melhorando sua ação nesse núcleo. Isso pode ser comprovado pelo conteúdo normal de DDC, receptores D2 e D1. O receptor opióide- $\mu$  também está normal. No DS, não observamos nenhuma alteração. A exposição à BRO no final da lactação parece ser menos deletéria para via de recompensa do que a exposição no início da lactação, possivelmente por haver maior maturação do sistema dopaminérgico no final da lactação.

É bem conhecido que dopamina, em humanos, melhora o perfil lipídico e a sensibilidade a insulina (Cincotta et al, 1999; Scranton e Cincotta, 2010; Pijl et al, 2000; Aminorroaya et al, 2004; Kok et al, 2006). Quando o tratamento com BRO ocorre na prole em qualquer período, não observamos alteração no perfil lipídico e na homeostase glicêmica. Ao contrário do que ocorre quando as mães receberam BRO no final da lactação, cujos filhotes apresentam disfunções do perfil lipídico e glicídico em PN22 e PN30 (Experimento 1, Carvalho et al, 2015) e em PN180 (de Moura et al, 2009). Estes dados sugerem que outro fator e não uma ação direta da BRO seja o fato de *imprinting* para programar a prole de mães que recebem a BRO.

Animais que receberam BRO em PN11-20 apresentaram hipertensão arterial, que pode ser explicada pela hipercorticosteronemia observada (Huang et al, 2013). O aumento de prolactina corrobora o aumento de corticosterona (Weber et al, 1991; Chang et al, 1999). Os animais que receberam BRO em PN1-10 apresentaram pressão arterial e corticosterona plasmática normais. Em ambos os experimentos, não observamos alterações no conteúdo e na liberação de catecolaminas, reforçando que a alteração na pressão arterial se deva à corticosterona.

Animais que receberam BRO em PN1-10 apresentaram na idade adulta diminuição de T3, GPDm e Dio1 hepáticas, sugerindo um hipotireoidismo. A diminuição de Dio 1 explica em parte a diminuição no T3 plasmático. Além disso, o aumento de dopamina nesses animais pode influenciar no menor T3, pois a dopamina reduz a conversão periférica de T4 em T3 (Van den Berghe e Zegher, 1996). A inibição da Dio1 pode se dever ao aumento do receptor D2 (Anguiano et al, 2004). Em geral a Dio2 tem uma relação inversa com os níveis de hormônios tireoidianos (Silva & Larsen, 1982). Porém não encontramos alterações na expressão do RNAm de Dio2 no TAM dos animais que receberam BRO em PN1-10, sugerindo que outros fatores regulem a Dio2 do TAM neste modelo de programação.

Os animais BRO tiveram menor conteúdo de TSH na hipófise e TRH no PVN, caracterizando um hipotireoidismo terciário na idade adulta. É plausível que o aumento de dopamina nesses animais seja responsável por esta inibição (Scanlon, 2001). A menor expressão do RNAm de UCP-1 no TAM, se deve ao menor T3 (Martinez & Mena, 2010). Estes achados sugerem um prejuízo na termogênese desses animais (Christoffolete et al, 2004; Silva, 2011), com redução da taxa metabólica.

Quando os animais receberam BRO em PN11-20 foi encontrado, na idade adulta, maior conteúdo de TRH sem alteração do conteúdo hipofisário de TSH. Como o T3 plasmático está aumentado, provavelmente houve aumento do TSH circulante. Porém, inesperadamente o T4 estava normal, o que pode ser explicado pelo aumento de Dio2 no TAM, e que também poderia contribuir para o aumento de T3 plasmático (Maia et al, 2005; Bianco & Kim 2006). Este aumento de T3 é funcional, pois a GPDm hepática, enzima dependente de T3, está aumentada. O aumento da expressão do RNAm de UCP-1, outra proteína dependente de hormônios tireoideanos, no TAM pode ser explicado pelo aumento do T3 (Fain et al, 1997; Martinez de Mena et al, 2010), reforçando o estado hipermetabólico desses animais. No entanto, os aumentos da Dio2 no TAM e a Dio1 normal no fígado, não podem ser explicados pelos níveis plasmáticos dos hormônios tireoidianos. Assim, outros fatores reguladores das desidases podem estar desempenhando um papel nesta programação, ou o transporte de hormônios tireoideanos ou seus receptores nestes tecidos podem estar modificados pela programação.

Interessantemente, quando Bonomo e colaboradores (2008) trataram as mães com BRO no final da lactação, a prole apresentou hipotireoidismo e hipoprolactinemia (Moura et al, 2009) na idade adulta. Resultados opostos foram encontrados quando os animais recebem a BRO diretamente nos 10 últimos dias de lactação, demonstrando que outro fator e não a transferência de BRO pelo leite, seja a causa dessas alterações.

Apesar das alterações na ingestão alimentar, não houve alteração na leptina plasmática. No entanto os animais que receberam BRO em PN1-10 apresentaram uma “*down-regulation*” na sinalização de leptina no ARC, caracterizado por uma redução na expressão de ObR-b, JAK-2, STAT-3 e SOCS-3. A regulação negativa da via da leptina pode ser consequência do estado hipotireoideo (Calvino et al, 2012) dos animais tratados com BRO. Por outro lado, a diminuição da ação da leptina no hipotálamo pode também diminuir TRH, visto que é conhecido que leptina estimula o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (Légrádi et al, 1997).

Animais que receberam BRO em PN11-20 também apresentaram normoleptinemia na idade adulta e apenas aumento da expressão de RNAm de ObR-b no ARC. Este aumento poderia levar a um maior efeito estimulatório da leptina sobre o TRH, no entanto todo o restante da via está inalterada. Não podemos descartar que haja uma alteração na via PI3K/Akt, influenciando o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide.

Em relação a análise neurocomportamental dos animais expostos a BRO em PN1-10, não encontramos alteração na atividade locomotora, o que era esperado, pois o receptor opióide- $\mu$ , responsável por regular essa atividade no DS (Jabourian et al, 2015) não foi alterado. O sistema dopaminérgico, que foi alterado no presente estudo, está envolvido na mediação do estresse e da ansiedade (Bananej et al, 2012; Zarrindast et al, 2013). Sabe-se que um aumento do receptor D2 está intimamente ligado ao aumento de depressão e ansiedade na idade adulta (Shah et al, 1997; Zhang et al, 2012). Nossos animais tiveram aumento de receptor D2 e apresentaram aumento da ansiedade na idade adulta, como indicado pelo teste do labirinto em cruz elevado. É conhecido que PRL reduz ansiedade (Torner et al, 2001) e que o hipotireoidismo está ligado ao aumento de ansiedade e depressão (Yu et al, 2015; Ittermann et al, 2015). De fato, nossos animais apresentam hipoprolactinemia e hipotireoidismo.

Ao contrario, os animais que receberam BRO em PN11-20 apresentaram uma diminuição do comportamento associado a ansiedade na idade adulta, que pode estar relacionada à hiperprolactinemia destes. Também não encontramos alteração na atividade locomotora, possivelmente devido à normalização da sinalização da dopamina no DS.

## CONCLUSÃO

Nosso estudo revelou que o uso de BRO no período em que há intensa neurogênese (PN1–P10) imprime mais disfunções tardias na prole do que quando o tratamento com BRO é realizado no período que corresponde ao fim da neurogênese (PN11-20). Sabemos que a BRO é uma droga utilizada na prática clínica para tratar prolactinoma, por exemplo, durante a gestação e lactação. Embora alguns estudos clínicos tenham mostrado que o tratamento neonatal com BRO não afeta as crianças, não há estudos a respeito das consequências futuras desta terapia. Assim, estes resultados experimentais, sugerem cautela no uso de agonistas ou antagonistas dopaminérgicos durante o desenvolvimento cerebral.

## REFERÊNCIAS

- Almalki MH, Alzahrani S, Alshahrani F., Alsherbeni S, Almoharib O, Aljohani N, Almagamsi A. Managing Prolactinomas during Pregnancy. *Endocrinol.* 2015. 26:6-85.
- Alvarez-Aguilar C, Alvarez-Paredes AR, Lindholm B, Stenvinkel P, García-López E, Mejía-Rodríguez O, López-Meza JE, Amato D, Paniagua R. Effects of dopamine on leptin release and leptin gene (OB) expression in adipocytes from obese and hypertensive patients. 2013. *Int J NephrolRenovasc Dis.* 6:259-68.
- Anzalone A, Lizardi-Ortiz JE, Ramos M, De Mei C, Hopf FW, Iaccarino C, Halbout B, Jacobsen J, Kinoshita C, Welter M, Caron MG, Bonci A, Sulzer D, Borrelli E. Dual control of dopamine synthesis and release by presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *J Neurosci.* 2012. 32(26):9023-34.
- Bananej M, Karimi-Sori A, Zarrindast MR, Ahmadi S. D1 and D2 dopaminergic systems in the rat basolateral amygdala are involved in anxiogenic – like effects induced by histamine. *J Psychopharmacol.* 2012. 26(4): 564–574.
- Barbano MF, Le Saux M, Cador M. Involvement of dopamine and opioids in the motivation to eat. *Psychopharmacology (Berl).* 2009. 203(3):475-87.
- Barker DJP, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA and Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet.* 1993. 341:938–941.
- Beeler JA, Faust RP, Turkson SYH, Zhuang X. Low Dopamine D2 Receptor Increases Vulnerability to Obesity Via Reduced Physical Activity Not Increased Appetitive Motivation. *Biol Psychiatry.* 2015. S0006-3223(15)00597-1.
- Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* 2002. 3(9):728-39.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev.* 2001. 22:724-63.
- Benoit-Marand M, Borrelli E, Gonon F. Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo. *J Neurosci.* 2001. 21:9134-41.
- Bernard N, Jantzen H, Becker M, Pecriaux C, Bénard-Larivière A, Montastruc JL, Descotes J, Vial T. French Network of Regional Pharmacovigilance 21 Centres. Severe adverse effects of bromocriptine in lactation inhibition: a 22 pharmacovigilance survey. *BJOG.* 2015. 122:1244-51.
- Bernard N, Jantzen H, Becker M, Pecriaux C, Bénard-Larivière A, Montastruc JL, Descotes J, Vial T. Severe adverse effects of bromocriptine in lactation inhibition: a pharmacovigilance survey. *BJOG.* 2015. 122(9):1244-51.

Berthoud HR. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 5:197S-200S.

Besnard I, Auclair V, Callery G, Gabriel-Bordenave C, Roberge C. Antipsychotic-drug-induced hyperprolactinemia: physiopathology, clinical features and guidance. *Encephale*. 2014 40:86-94.

Bigazzi M, Ronga R, Lancranjan I, Ferraro S, Branconi F, Buzzoni P, Martorana G, Scarselli GF & Del Pozo E. A pregnancy in an acromegalic woman during bromocriptine treatment: effects on growth hormone and prolactin in the maternal, fetal and amniotic compartments. *J of Clin Endocrinol and Metab*. 1979. 48:9-12.

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*. 2008.198:331-37.

Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MCF, 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.

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. 192:339-44.

Bronstein MD, Salgado LR, de Castro Musolino NR. Medical management of pituitary adenomas: the special case of management of the pregnant woman. *Pituitary*. 2002 5:99-107.

Carvalho JC, de Oliveira E, Peixoto-Silva N, Fraga MC, Nobre JL, Lisboa PC, Moura EG. Maternal prolactin inhibition causes changes in leptin at 22- and 30-day-old pups. *Horm Metab Res*. 2015. 47:528-36.

Casabiell X, Pinero V, Tome MA, Peino R, Dieguez C, Casanueva FF. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997. 82:4270-3.

Castro DC, Cole SL, Berridge KC. Lateral hypothalamus, nucleus accumbens, and ventral pallidum roles in eating and hunger: interactions between homeostatic and reward circuitry. *Front SystNeurosci*. 2015. 15:9-90.

Chang LL, Lo MJ, Kan SF, Huang WJ, Chen JJ, Kau MM, Wang JL, Lin H, Tsai SC, Chiao YC, Yeh JY, Wun WS, Wang PS. Direct effects of prolactin on corticosterone release by zona fasciculata-reticularis cells from male rats. *J Cell Biochem*. 1999. 73(4):563-72.

Chen C, Zhang J, Israel JM, Clarke IJ, Vincent JD. Mechanism of the prolactin rebound after dopamine withdrawal in rat pituitary cells. *Am J Physiol*. 1993. 265:E145-52.

Chen P, Smith MS. *Endocrinology*. Regulation of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression during lactation: role of prolactin. 2004. 145:823-9.

Chu A, De Beritto T. The Perinatal Origins of Cardiovascular Disease. *Pediatr Ann*. 2015. 44:254-9.

- Cincotta AH. Hypothalamic role in the insulin resistance syndrome. CRC Press. 2002. 271-312.
- Colantuoni C, Schwenker J, McCarthy J, Rada P, Ladenheim B, Cadet JL, Schwartz GJ, Moran TH, Hoebel BG. Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain. *Neuroreport*. 2001. 12(16):3549-52.
- Conceição 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 NutrBiochem*. 2013. 24:81-7.
- Conceição 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*. 2012. 52:1393-1404.
- Congar P, Bergevin A, Trudeau LE. D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K<sup>+</sup> channels. *J Neurophysiol*. 2002. 87:1046-56.
- Cottrell EC & Ozanne SE. Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiol Behav*. 2008. 22:17-28.
- 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. *Neuroendocrinol*. 2009. 89:152-162.
- De Fronzo RA. Bromocriptine: A Sympatholytic, D2-Dopamine Agonist for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2011. 34:789-94.
- de Moura E, Bonomo IT, Nogueira-Neto JF, de Oliveira E, Trevenzoli IH, Reis AM, Passos MCF, Lisboa PC. Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. *J Physiol*. 2009. 587:4919-499.
- de Moura EG, Passos MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep*. 2005. 25:251-69.
- Dearden L, Ozanne SE. Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. *Front Neuroendocrinol*. 2015. S0091-3022(15)30003-0.
- Demarest KT, Riegle GD, Moore KE. Hypoprolactinemia induced by hypophysectomy and long-term bromocriptine treatment decreases tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and the responsiveness of these neurons to prolactin. *Neuroendocrinology*. 1985. 40:369-76.
- Dong BJ. How medications affect thyroid function. *West J Med*. 2000. 172:102-106

Dow-Edwards DL, Freed LA, Milhorat TH. Stimulation of brain metabolism by perinatal cocaine exposure. *Brain Res.* 1988. 470(1):137-41.

Dow-Edwards DL, Freed-Malen LA, Hughes HE. Long-term alterations in brain function following cocaine administration during the preweaning period. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993. 72:309-13.

Eaton MJ, Gopalan C, Kim E, Lookingland KJ, Moore KE. Comparison of the effects of the dopamine D2 agonist quinolorane on tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity in male and female rats. *Brain Res.* 1993. 629(1):53-8.

Erlanson-Albertsson C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005. 97(2):61-73.

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: 922-28.

Fernstrom JD, Fernstrom MH. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr.* 2007 137:1539S-1547S.

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. 28:307-15.

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.

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. 206:147-50.

Franchi F, Lazzeri C, Barletta G, Ianni L & Mannelli M. Centrally mediated effects of bromocriptine on cardiac sympathovagal balance. *Hypertension.* 2001. 38:123-129.

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.* 2012. 24(6):960-6.

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

Fulton S, Pissios P, Manchon RP, Stiles L, Frank L, Pothos EM, Maratos-Flier E, Flier JS. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron.* 2006. 51:811-822.



Gaziano JM, Cincotta AH, O'Connor CM, Ezrokhi M, Ruddy D, Ma ZJ, Scranton RE. Randomized clinical trial of quick release bromocriptine among patients with type 2 diabetes on overall safety and cardiovascular outcomes. *Diabetes Care*. 2010. 33:1503–1508.

Genro JP, Kieling C, Rohde LA, Hutz MH. Attention-deficit/ hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. *Expert Rev Neurother*. 2010. 10:587–601.

Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A. Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocr Rev*. 2006. 27(5):485–534.

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

Goffin V, Binart N, Touraine P, Kelly PA. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol*. 2002. 64: 47–67.

Gonzalez LC, Pinilla L, Tena-Sempere M, Aguilar E. Leptin stimulates prolactin and luteinizing hormone secretion in fasted adult male rats. *Neuroendocrinol*. 1998. 70: 213–220.

Greenman Y, Tordjman K, Stern N. Increased body weight associated with prolactin secreting pituitary adenomas: weight loss with normalization of prolactin levels. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998. 48: 547–553.

Gualillo O, Lago F, García M, Menéndez C, Señarís R, Casanueva FF, Diéguez C. Prolactin stimulates leptin secretion by rat white adipose tissue. *Endocrinology*. 1999. 140(11):5149–53.

Hahn J, Kullmann PH, Horn JP, Levitan ES. D2 autoreceptors chronically enhance dopamine neuron pacemaker activity. *J Neurosci*. 2006. 26(19):5240–7.

Hardie LJ, Guilhot N, Trayhurn P. Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm Metab Res*. 1996. 28(12):685–9.

Henschel K, Fleckenstein AE, Toney TW, Lawson DM, Moore KE, Lookingland KJ. Prolactin regulation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons: immunoneutralization studies. *Brain Res*. 2000. 852(1):28–36.

Houseknecht KL, McGuire MK, Portocarrero CP, McGuire MA, Beerman K. Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. *Biochem Biophys Res Comm*. 1997. 240:742–7.

Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III—the final common pathway. *Schizophr Bull*. 35:549–562.

Hughes HE, Pringle GF, Scribani LA and Dow-Edwards DL. Cocaine treatment in neonatal rats affects the adult behavioral response to amphetamine. *Neurotoxicol Teratol*. 1991. 13:335–339.

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci*. 2006. 29:565–598.

Ittermann T, Völzke H, Baumeister SE, Appel K, Grabe HJ. Diagnosed thyroid disorders are associated with depression and anxiety. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 2015. 50(9):1417-25.

Jabourian M, Venance L, Bourgoïn S, Ozon S, Pérez S, Godeheu G, Glowinski J, Kemel ML. Functional mu opioid receptors are expressed in cholinergic interneurons of the rat dorsal striatum: territorial specificity and diurnal variation. *Eur J Neurosci.* 2005. 21(12):3301–3309.

Janec E, Burke RE. Naturally occurring cell death during postnatal development of the substantianigra of the rat. *MolCellNeurosci.* 1993. 4: 30–35.

Joseph B and Dyer CA. Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain. *J Neurochem.* 2003. 86(3):615-26.

Katz LC and Shatz CJ. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science.* 1996. 274:1133–1138.

Katz M, Kroll D, Pak I, Osimoni A, Hirsch M. Puerperal hypertension, stroke, and seizures after suppression of lactation with bromocriptine. *Obstet Gynecol.* 1985. 66(6):822-4.

Katz M, Kroll D, Pak I, Osimoni A, Hirsch M. Puerperal hypertension, stroke, and seizures after suppression of lactation with bromocriptine. *ObstetGynecol.* 1985. 66(6):822-4.

Kebabian JW & Calne DB. Multiple receptors for dopamine. 1979. *Nature*, 277:93–96.

Kelley AE, Bakshi VP, Fleming S, Holahan MR. A pharmacological analysis of the substrates underlying conditioned feeding induced by repeated opioid stimulation of the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology.* 2000. 23(4):455-67.

Kondo T. Treatment of Parkinson's disease in Japan. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2001. 7:71–77.

Krupp P, Monka C. Bromocriptine in pregnancy: safety aspects. *Klin Wochenschr.* 1987. 1;65(17):823-7.

Kulski JK, Hartmann PE, Martin JD, Smith M. Effects of bromocriptine mesylate on the composition of the mammary secretion in non-breastfeeding women. *Obstet Gynecol.* 1978. 52:38–42.

Langley- Evans SC. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *J Hum Nutr Diet.* 2015. 1:1-14.

Langley-Evans SC & McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract.* 2010. 19:87–98.

Lee HS. Impact of Maternal Diet on the Epigenome during In Utero Life and the Developmental Programming of Diseases in Childhood and Adulthood. *Nutrients.* 2015. 7(11):9492-507.

Légrádi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 1997. 138(6):2569-76.

Leininger GM, Jo Y-H, Leshan RL, Louis GW, Yang H, Barrera JG, Wilson H, Opland DM, Faouzi MA, Gong Y, Jones JC, Rhodes CJ, Chua S, Diano S, Horvath TL, Seeley RJ, Becker JB, Münzberg H, Myers MG. Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab*. 2009. 10:89–98.

Leininger GM, Jo YH, Leshan RL, Louis GW, Yang H. Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab*. 2009. 10: 89–98.

Lemay-Clermont J, Robitaille C, Auberson YP, Bureau G, Cyr M. Blockade of NMDA receptors 2A subunit in the dorsal striatum impairs the learning of a complex motor skill. *BehavNeurosci*. 2011. 125(5):714-23.

Levitt P. Prenatal effects of drugs of abuse on brain development. *Drug Alcohol Depend*. 1998. 51(1-2):109-25.

Lian W, Liu N, Wang R, Xing B, Yao Y. Analysis of treating prolactinoma patients with bromocriptine during pregnancy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2015. 95(7):511-4.

Liang W, Gao L, Li N, Wang B, Wang L, Wang Y, Yang H, You L, Hou J, Chen S, Zhu H, Jiang Y, Pan H. Efficacy and Safety of Bromocriptine-QR in Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Horm Metab Res*. 2015. 47(11):805-12.

Liet JM, Boscher C, Gras-Leguen C, Gournay V, Debillon T, Rozé JC. Dopamine effects on pulmonary artery pressure in hypotensive preterm infants with patent ductus arteriosus. *J Pediatr*. 2002. 140(3):373-5.

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. 45:22-30.

Lisboa PC, Oliveira E, Fagundes ATS, 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: 114-22.

Lisboa PC, Passos MC, Dutra SC, Bonomo IT, Denolato AT, Reis AM, Moura EG. Leptin and prolactin, but not corticosterone, modulate body weight and thyroid function in protein-malnourished lactating rats. *Horm Metab Res*. 2006. 38(5):295-9.

- Liu S, Borgland SL. Regulation of the mesolimbic dopamine circuit by feeding peptides. *Neuroscience*. 2015. 289:19-42.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001. 25:402-408.
- Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriend S. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J BiolChem*. 1962. 237: 89-93.
- Lovic V, Belay H, Walker CD, Burton CL, Meaney MJ, Sokolowski M, Fleming AS. Early postnatal experience and DRD2 genotype affect dopamine receptor expression in the rat ventral striatum. *BehavBrain Res*. 2013. 237:278-82
- Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch Dis Child*. 1994. 71(4):288-90.
- Maeda T, Ushiroyama T, Okuda K, Fujimoto A, Ueki M, Sugimoto O. Effective bromocriptine treatment of a pituitary macroadenoma during pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1983. 61(1):117-21.
- Mantzoros CS, Moschos SJ. Leptin: in search of role(s) in human physiology and pathophysiology. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998. 49(5):551-67.
- Mark GP, Blander DS, Hoebel BG. A conditioned stimulus decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens after the development of a learned taste aversion. *Brain Res*. 1991. 551:308-310.
- Matussek N, Ackenheil M, Hippus H, Müller F, Schröder HT, Schultes H, Wasilewski B. Effect of clonidine on growth hormone release in psychiatric patients and controls. *Psychiatry Res*. 1980. 2(1):25-36.
- McClure SM, York MK, Montague PR. The neural substrates of reward processing in humans: the modern role of FMRI. *Neuroscientist*. 2004. 10(3):260-8.
- Meister B, Gömüç B, Suarez E, Ishii Y, Dürr K, Gillberg L. Hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) neurons have a cholinergic phenotype. *Eur J Neurosci*. 2006. 24(10):2731-40.
- Melis M, Spiga S, Diana M. The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *Int Rev Neurobiol*. 2005. 63:101-154.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 1998. 78:189-225.
- Mohankumar PS, Mohankumar SM, Quadri SK, Voogt JL. Chronic hyperprolactinemia and changes in dopamine neurons. *Brain Res Bull*. 1997. 42(6):435-41.

Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993. 17(1):91-128.

Moura EG & Passos MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep.* 2005. 25(3-4):251-269.

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. 587:4914-29.

Moura EG, Santos RS, Lisboa PC, Alves SB, Bonomo IT, Fagundes ATS, Oliveira E, Passos MCF. Thyroid function and body weight programming by neonatal hyperthyroidism in rats – The role of leptin and deiodinase activities. *Horm Metab Res.* 2008. 40(1): 1-7.

Narita O, Kimura T, Suganuma N, Osawa M, Mizutani S, Masahashi T, Asai M, Tomoda Y. Relationship between maternal prolactin levels during pregnancy and lactation in women with pituitary adenoma. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 1985. 37(5):758-62.

Nobre JL, Lisboa PC, Lima NS. Calcium supplementation prevents obesity, hyperleptinemia and hyperglycemia in adult rats programmed by early weaning. *Br J Nut.* 2012. 107: 979-88.

Noori S, Seri I. Neonatal blood pressure support: the use of inotropes, lusitropes, and other vasopressor agents. *Clin Perinatol.* 2012. 39(1):221-38.

Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ.* 2000. 320(7251):1708–12.

Oliveira E, de Moura EG, Santos-Silva AP, Pinheiro CR, Claudio-Neto S, Christian 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: 2068-73.

Oliveira E, Moura EG, Santos-Silva AP, Fagundes AT, Rios AS, Abreu-Villaça Y, Nogueira Neto JF, Passos MC, Lisboa PC. Short- and long-term effects of maternal nicotine exposure during lactation on body adiposity, lipid profile, and thyroid function of rat offspring. *J Endocrinol.* 2009. 202(3):397-405.

Oliveira E, Moura EG, Santos-Silva AP, Pinheiro CR, Lima NS, Nogueira-Neto JF, Nunes-Freitas AL, Abreu-Villaça Y, Passos MC, Lisboa PC. Neonatal nicotine exposure causes insulin and leptin resistance and inhibits hypothalamic leptin signaling in adult rat offspring. *J Endocrinol.* 2010. 206(1):55-63.

Paes ST, Gonçalves CF, Terra MM, Fontoura TS, Guerra MO, Peters VM, Mathias PC, Andreazzi A. Childhood obesity: a (re) programming disease? *J Dev Orig Health Dis.* 2015. 26:1-6.

Palmiter RD. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci.* 2007. 30(8):375-81.

Panchenko PE, Lemaire M, Fneich S, Voisin S, Jouin M, Junien C, Gabory A. Epigenetics and Nutrition: maternal nutrition impacts on placental development and health of offspring. *Biol Aujourd'hui*. 2015. 209(2):175-87.

Passos MC, da Fonte Ramos C, Dutra SC, Mouço T, de Moura EG. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Horm Metab Res*. 2002. 34(1):40-3.

Passos MC, Toste FP, Dutra SC, Trotta PA, Toste FP, Lisboa PC, de Moura EG. Role of neonatal hyperleptinaemia on serum adiponectin and suppressor of cytokine signalling-3 expression in young rats. *The British Journal of Nutrition*. 2009. 101:250-6.

Passos MC, Vicente LL, Lisboa PC, de Moura EG. Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult rats whose mothers were malnourished during lactation. *Horm Metab Res*. 2004. 36(9):625-9.

Passos MCF, Ramos CF, Moura EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr Res*. 2000. 20(11):1603-1612.

Pattison LP, McIntosh S, Sexton T, Childers SR, Hemby SE. Changes in dopamine transporter binding in nucleus accumbens following chronic self-administration cocaine: heroin combinations. *Synapse*. 2014. 68(10):437-44.

Peciña S, Berridge KC. Dopamine or opioid stimulation of nucleus accumbens similarly amplify cue-triggered 'wanting' for reward: entire core and medial shell mapped as substrates for PIT enhancement. *Eur J Neurosci*. 2013. 37(9):1529-40

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. 24;95(1):14-21.

Pelkonen R, Nikkilä EA, Grahne B. Serum lipids, postheparin plasma lipase activities and glucose tolerance in patients with prolactinoma. *Clin Endocrinol*. 1982. 16:383-390.

Perry ML, Leininger GM, Chen R, Luderman KD, Yang H, Gnegy ME, Myers MG Jr, Kennedy RT. Leptin promotes dopamine transporter and tyrosine hydroxylase activity in the nucleus accumbens of Sprague-Dawley rats. *J Neurochem*. 2010. 114(3):666-74.

Pijl H & Edo AM. Modulation of monoaminergic neural circuits: potential for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Treat Endocrinol*. 2002. 1:71-78.

Pinheiro CR, Moura EG, Manhães AC, Fraga MC, Neto SC, Y AV, Oliveira E, Lisboa PC. Concurrent maternal and pup postnatal tobacco smoke exposure in Wistar rats changes food preference and dopaminergic reward system parameters in the adult male offspring. *Neuroscience*. 2015.178-192.

Pinheiro CR, Oliveira E, Manhães AC, Fraga MC, Claudio-Neto S, Younes-Rapozo V, Lotufo BM, Moura EG, Lisboa PC. Exposure to nicotine increases dopamine receptor content in the mesocorticolimbic pathway of rat dams and offspring during lactation. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015. 136:87-101.

Portha B, Fournier A, Kioon MD, Mezger V, Movassat J. Biochimie. Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility. 2014 Feb;97:1-15.

Ralevski A, Horvath TL. Developmental programming of hypothalamic neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*. 2015. S0091:3022(15)30005-4.

Rascol O, Goetz C, Koller W, Poewe W, Sampaio C. Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. *Lancet*. 2002. 359:1589–1598.

Raymond JP, Goldstein E, Konopka P, Leleu MF, Merceron RE, Loria Y. Follow-up of children born of bromocriptine-treated mothers. *Horm Res*. 1985. 22(3):239-46.

Richter A, Petrovic A, Diekhof EK, Trost S, Wolter S, Gruber O. Hyperresponsivity and impaired prefrontal control of the mesolimbic reward system in schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2015. 71:8-15.

Rodrigues AJ, Leão P, Carvalho M, Almeida OF, Sousa N. Potential programming of dopaminergic circuits by early life stress. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011. 214:107-20.

Rubí B, Ljubicic S, Pournourmohammadi S, Carobbio S, Armanet M, Bartley C, Maechler P. Dopamine D2- like receptors are expressed in pancreatic cells and mediate inhibition of insulin secretion. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005. 280:36824–36832.

Saini SS, Kumar P, Kumar RM. Hemodynamic changes in preterm neonates with septic shock: a prospective observational study\*. *Pediatr Crit Care Med*. 2014. 15(5):443-50.

Saliba E, Marret S. Cerebral white matter damage in the preterm infant: pathophysiology and risk factors. *Semin Neonatol*. 2001. 6(2):121-33.

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 medullae in adult rat offspring. *Horm Metab Res*. 2012. 44:550-54.

Santos-Silva AP, Moura EG, Pinheiro CR, Rios AS, Abreu-Villaça Y, Passos MC, Oliveira E, Lisboa PC. Neonatal nicotine exposure alters leptin signaling in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in the late postnatal period and adulthood in rats. *Life Sci*. 2010. 87(5-6):187-95.

Santos-Silva AP, Oliveira E, Pinheiro CR, Santana AC, Nascimento-Saba CC, Abreu-Villaça Y, Moura EG, Lisboa PC. Endocrine effects of tobacco smoke exposure during lactation in weaned and adult male offspring. *J Endocrinol*. 2013. 218(1):13-24.

Sauve´ D, Woodside B. Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. *Brain Res*. 2000. 868:306–314.

Schwartz MW, Baskin DG, Kaiyala KJ, Woods SC. Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am J Clin Nutr*. 1999. 69(4):584-96.

Seri.I. Cardiovascular, renal, and endocrine actions of dopamine in neonates and children. *J Pediatr*. 1995. 126:333–344.

Shah PJ, Ogilvie AD, Goodwin GM, Ebmeier KP. Clinical and psychometric correlates of dopamine D2 binding in depression. *Psychol Med.* 1997. 27:1247–1256.

Shibli-Rahhal A, Schlechte J. Hyperprolactinemia and infertility. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2011. 40(4):837–46.

Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG, Funanage VL. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998. 83:1810–3.

Sneider W. The discovery and synthesis of epinephrine. *Drug News Perspect.* 2001. 14(8):491-4.

Stamatelopoulos KS, Georgiopoulos GA, Sfrikakis PP, Kollias G, Manios E, Mantzou E, Kyrkou K, Zakopoulos N, Papamichael CM, Alevizaki M. Pilot study of circulating prolactin levels and endothelial function in men with hypertension. *Am J Hypertens.* 2011 24(5):569-73.

Tang L, Todd RD, O'Malley KL. Dopamine D2 and D3 receptors inhibit dopamine release. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994. 270(2):475-9.

Teixeira C, Passos M, Ramos C, Dutra S & Moura E. Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *J Nutri Biochem.* 2002. 13:493-498.

Tipsmark C.K., C.N. Strom, S.T. Bailey, R.J. Borski, Leptin stimulates pituitary prolactin release through an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway. *J. Endocrinol.* 2008. 196:275–281.

Tomar AS, Tallapragada DS, Nongmaithem SS, Shrestha S, Yajnik CS, Chandak GR. Intrauterine Programming of Diabetes and Adiposity. *Curr Obes Rep.* 2015. 4(4):418-28.

Tong Y, Pelletier G. Prolactin regulation of pro-opiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinol.* 1992. 56(4):561-5.

Torner L, Toschi N, Pohlinger A, Landgraf R, Neumann ID. Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J Neurosci.* 2001. 21:3207–3214.

Toste FP, de Moura EG, Lisboa PC, Fagundes AT, de Oliveira E, Passos MC. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr.* 2006. 95(4):830-7.

Toste FP, Oliveira E, Trotta PA, Lisboa PC, Moura EG, Passos MCF. Early maternal hyperleptinemia programs adipogenic phenotype in rats. *Hormone and metabolic research.* 2009. 41(12):874-9.



Tóth M, Varrone A, Steiger C, Laszlovszky I, Horváth A, Kiss B, Gyertyán I, Adham N, Halldin C, Gulyás B. Synapse. Brain uptake and distribution of the dopamine D3 /D2 receptor partial agonist [<sup>11</sup> C] cariprazine: an in vivo positron emission tomography study in nonhuman primates. 2013. 67(5):258-64.

Trevenzoli IH, Valle MMR, Machado FB. Neonatal hyperleptinemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J Physiol*. 2007. 580: 629-37.

Troina AA, Figueiredo S, Pasos MCF, 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.

Trotta PA, Moura EG, Franco JG, Lima NS, de Oliveira E, Cordeiro A, Souza LL, Oliveira KJ, Lisboa PC, Pazos Moura CC. Blocking leptin action one week after weaning reverts most of the programming caused by neonatal hyperleptinemia in the adult rat. *Horm Metab Res*. 2011. 43:171-177.

Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000. 24(1):125-32.

van der Plasse G, van Zessen R, Luijendijk MC, Erkan H, Stuber GD, Ramakers GM, Adan RA. Modulation of cue-induced firing of ventral tegmental area dopamine neurons by leptin and ghrelin. *Int J Obes (Lond)*. 2015. 39(12):1742-9.

Verma S, Shah D, Faridi MM. Breastfeeding a baby with mother on Bromocriptine. *Indian J Pediatr*. 2006. 73(5):435-6.

Vezina P. Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004. 27:827–839.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Franceschi D, Wong C, Gatley SJ, Gifford AN, Ding YS, Pappas N. "Nonhedonic" food motivation in humans involves dopamine in the dorsal striatum and methylphenidate amplifies this effect. *Synapse*. 2002. 44(3):175-80.

Voogt JL, Arbogast LA, Quadri SK, Andrews G. Tyrosine hydroxylase messenger RNA in the hypothalamus, substantia nigra and adrenal medulla of old female rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 1990. 8(1):55-62.

Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF. Human leptin: from an adipocytes hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol*. 2000.143:293– 311.

Weber RF, Calogero AE. Prolactin stimulates rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone and pituitary adrenocorticotropin secretion in vitro. *Neuroendocrinology*. 1991 54(3):248-53.

Webster J. A comparative review of the tolerability profiles of dopamine agonists in the treatment of hyperprolactinaemia and inhibition of lactation. *Drug Safety*. 1996. 14(4):228–38.

Willner P, Scheel-Kruger J. The Mesolimbic Dopamine System: From Motivation to Action. *Behav Brain Res*. 1991. 141(2):171-5.

Wise RA. Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotox Res*. 2008. 14(2-3):169-83.

Wise RA. Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend*. 1998. 51(1-2):13-22.

Wood DF, Johnston JM, Johnston DG: Dopamine, the dopamine D2 receptor and pituitary tumors. *Clin Endocrinol*. 1991. 35: 455– 466.

Younes-Rapozo V, Moura EG, Lima NS, 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, Pinheiro CR, Carvalho JC, Barradas PC, de Oliveira E, Lisboa PC. Neonatal Nicotine Exposure Leads to Hypothalamic Gliosis in Adult Overweight Rats. *J Neuroendocrinol*. 2015. 27(12):887-98.

Yu D, Zhou H, Yang Y, Jiang Y, Wang T, Lv L, Zhou Q, Yang Y, Dong X, He J, Huang X, Chen J, Wu K, Xu L, Mao R. The bidirectional effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on anxiety- and depression-like behaviors in rats. *Horm Behav*. 2015. 69:106-15.

Zarrindast MR, Nasehi M, Pournaghshband M, Yekta BG. Dopaminergic system in CA1 modulates MK – 801 induced anxiolytic-like responses. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012. 103(1):102-10.

Zhang L, Yokoi F, Parsons DS, Standaert DG, Li Y. Alteration of striatal dopaminergic neurotransmission in a mouse model of DYT11 myoclonus-dystonia. *PLoS One*. 2012. 7(3):e33669.

Zhang M, Gosnell BA, Kelley AE. Intake of high-fat food is selectively enhanced by mu opioid receptor stimulation within the nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998. 285:908–914.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994. 372:425– 32.

Zhang Z, Cheng W. Management of pituitary adenoma in pregnancy. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhe*. 1996. 3:537-539.