

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

INIBIÇÃO NEONATAL DA RECAPTAÇÃO DA
SEROTONINA: ESTUDO DE EVENTUAIS ALTERAÇÕES NA
EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES
SEROTONINÉRGICOS, NO COMPORTAMENTO
ALIMENTAR E EM INDICADORES METABÓLICOS

LÍGIA CRISTINA MONTEIRO GALINDO

Recife
2013

Lígia Cristina Monteiro Galindo

**INIBIÇÃO NEONATAL DA RECAPTAÇÃO DA
SEROTONINA: ESTUDO DE EVENTUAIS ALTERAÇÕES NA
EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES
SEROTONINÉRGICOS, NO COMPORTAMENTO
ALIMENTAR E EM INDICADORES METABÓLICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Lopes de Souza

Recife
2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

G158i Galindo, Lígia Cristina Monteiro.
Inibição neonatal da recaptação da serotonina: estudo de eventuais alterações na expressão gênica de receptores serotoninérgicos, no comportamento alimentar e em indicadores metabólicos / Lígia Cristina Monteiro Galindo.– Recife: O autor, 2013.
90 f.: il. ; tab.; fig.; 30 cm.

Orientador: Raul Manhães de Castro.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2013.
Inclui referências e anexos.

1. Serotonina. 2. Plasticidade neuronal. 3. Comportamento alimentar.
I. Castro, Raul Manhães de (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-163)

Lígia Cristina Monteiro Galindo

**INIBIÇÃO NEONATAL DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA:
ESTUDO DE EVENTUAIS ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO GÊNICA
DE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS, NO COMPORTAMENTO
ALIMENTAR E EM INDICADORES METABÓLICOS**

Nome: Sandra Lopes de Souza

Titulação: Doutor

Nome: Rhowena Jane Barbosa de Matos

Titulação: Doutor

Nome: Prof^a Dr^a Lisiane Oliveira dos Santos

Titulação: Doutor

Nome: Dr^a Mara Cristina Lofrano Prado

Titulação: Doutor

Nome: Prof. Dr. Ricardo Abadie Guedes

Titulação: Doutor

Tese aprovada em 17 de junho de 2013

Recife
2013

À pequenina Giovana, que me faz viver o amor incondicional e que, na sua inocência de criança, é minha inspiração para vencer desafios.

Aos meus pais, Antônio Djalma Galindo e Eliane Maria Monteiro Galindo, meus primeiros educadores, que na sua simplicidade foram e são exemplos de amor, honestidade e ética. Ensinaram-me com suas ações e, até hoje, são referenciais de vida para mim.

AGRADECIMENTOS

Durante este curso percebi que o Doutorado e, em panorama mais amplo, a ciência não se faz a duas mãos. Para concluir este trabalho tive ajuda de muitas mãos, e outros tantos ombros e ouvidos. Agradeço a todos que participaram dessa travessia, especialmente a estes abaixo relacionados:

Ao Deus que não tem nome e que está acima de dogmas.

À Giovana, pelo simples fato de existir.

À Eliane e Djalma, pais queridos, pelo amor e apoio incondicionais. Vocês me ensinaram valores indissolúveis.

À Augusto e Livia, meus maninhos, e aos meus irmãos de coração Aline e Pablo pelo amor, cuidado e torcida.

A Raul Manhães de Castro. Uma das mais nobres missões de um orientador é indicar caminhos para descobertas. Obrigada, querido Professor, por me confiar a execução deste projeto e por insistir em me fazer entender aspectos importantes para meu crescimento pessoal e profissional.

À Sandra Lopes de Souza, pela amizade de muitos anos e pelo apoio na orientação deste trabalho. São poucos os que têm a honra de ser orientados por um amigo. Chegamos ao fim de uma caminhada que vislumbra seguir por muitos anos. Obrigada pela amizade, afeto e incentivo constantes.

À Matilde Cesiana da Silva. Tildinha, obrigada pelo carinho de sua amizade, pelos conselhos, conversas e momentos leves vividos.

À Renata Campina. Rezinha, obrigada por ser tão disponível e sempre me contagiar com seu bom humor.

Aos queridos estagiários Manuella da Luz Duarte Barros (Manu); Ricardo Vinicius de Carvalho Santana e Eduarda Wandeveld. No início, apenas estudantes, hoje amigos queridos que compartilharam sorrisos e lágrimas comigo. Muita sorte de encontrá-los nesta caminhada!

Ao pessoal do laboratório de Comportamento Alimentar do Anexo - Anatomia: Isabeli Lins, Lívia Lira, Tássia Karen, Amanda Marcelino, Taisy Ferro, Mayara Matias, Danillo Foester e Diogo Brasileiro. O espaço físico que dividimos, apesar de pequeno, é repleto de solidariedade, cordialidade e amizade. Obrigada por toda ajuda e pelas discussões científicas. Agradeço especialmente a Isabeli Lins e Lívia Lira pela inestimável participação nos experimentos.

A Nesci Nascimento e Cecília Arruda, pela gentileza e competência com que nos atendem na secretaria da Pós- Graduação.

A Mara Lofrano, Keli Ferraz e Tâmara Gomes. Queridas, foi muito bom compartilhar os leves e felizes momentos de estudante ao lado de vocês.

À Rhowena Jane Matos de Barbosa, pelas sistemáticas e eficazes orientações técnicas, sempre permeadas de muitos sorrisos, sua marca registrada.

Ao Professor Dr. José Cândido Ferraz pela gentileza da ajuda técnica.

À Dinara Pessoa e Maria José Cavalcanti. Vocês foram fundamentais nesta fase de minha vida. Obrigada pela paciência, conselhos, companhia, carinho e cuidado.

A Flávio Medeiros. Pela torcida e apoio.

A Ana Cláudia Porto Reis (Aninha): pela amizade de anos, por me emprestar seus ouvidos e me aconselhar coerentemente.

Ao Professor Dr. Rubem Carlos Araujo Guedes pela cordialidade com que me recebeu em seu laboratório.

À Lúcia Pires, pelo carinho e frequentes gentilezas.

Aos queridos José Antônio dos Santos (Firmino, Fonseca et al.) e Adriano Bento, a quem não esquecerei pelas divertidas conversas, sinceros desabafos e trabalho em conjunto.

Aos colegas do Departamento de Anatomia. Agradeço especialmente a Ademar Amorim Junior, Carla Cabral, Manuela Figueiroa, Fátima Galdino, Fernanda Villarouco, Vanildo Junior e Vieira Sobrinho pela compreensão e apoio.

Aos órgãos de fomento que financiaram este projeto. FACEPE, CNPq e CAPES.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas que já tem a forma do nosso corpo e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e se não ousarmos fazê-la teremos ficado, por sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

RESUMO

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor-chave envolvido na ontogênese do sistema nervoso sendo importante para a manutenção do balanço energético. Inicialmente foram verificados os efeitos da inibição farmacológica neonatal da recaptação da serotonina sobre parâmetros alimentares e metabólicos em ratos adultos expostos ou não à dieta hipercalórica. Os filhotes de ratos *Wistar* receberam, diariamente, salina estéril 0,9% (C, n=10, NaCl 0,9%, 1µl/g, s.c) ou solução fluoxetina (F, n=10, 10mg/Kg, 1µl/g p.c, s.c) do 1º a o 21º DPN. Cada grupo recebeu uma injeção subcutânea diária e foram utilizados apenas um ou dois animais por grupo provindos da mesma ninhada para as análises. A partir dos 180 dias de vida, alguns animais dos grupos C e F foram submetidos à dieta hipercalórica durante cinco semanas constituindo os grupos seguintes grupos: C (C, n=10); Cdiet (Cd, n=10), F (F, n=10) e Fdiet (Fd, n=10). Foram analisados peso corporal, consumo alimentar, deposição de tecido abdominal branco, expressão gênica hipotalâmica de 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}, NPY e POMC, tolerância à glicose; níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol antes após ingestão crônica de dieta hipercalórica. Os animais tratados com SSRI no período neonatal apresentaram, na idade adulta, menores peso corporal e consumo alimentar (C=27,20±0,7 vs F=22,3±0,3, n=10)(P=0,0001) que os controles. Após alimentarem-se com dieta hipercalórica, os animais do grupo Cd e Fd apresentaram consumo alimentar e ganho de peso equivalente. Entretanto o grupo Fd acumulou 64,32% de tecido adiposo branco em relação à F versus os 100,96% de acúmulo do grupo Cd em relação ao C. A análise *Post Hoc* da expressão hipotalâmica de 5-HT_{2C} evidenciou menor expressão deste receptor nos animais submetidos à inibição farmacológica da recaptação da serotonina em relação ao grupo Controle (C= 1,08±0,02 vs F=0,8±0,04, n=4, P<0,001). Após sobrecarga energética, o grupo Fdiet aumentou a expressão de RNAm 5-HT_{2C} em relação ao grupo Cdiet (Cd=1,06±0,03 vs Fd=1,23±0,01, n=4, P<0,01) e ao grupo Fluoxetina (F=0,8±0,04 vs Fd=1,23±0,01, n=4, P<0,0001). Os animais tratados com SSRI durante a lactação ainda apresentaram menores níveis glicêmicos em jejum e menor aumento dos níveis de colesterol plasmático. Utilizando o mesmo modelo experimental, a sequência comportamental de saciedade foi verificada após dose aguda de fluoxetina (10 mg/Kg; 1µl/g, i.p.). Outro experimento testou a expressão da proteína C-fos no NTS e ARC após jejum seguido por 90 minutos de exposição alimentar. Também foram mensurados os níveis de serotonina no hipotálamo. A inibição farmacológica da serotonina durante o período de lactação promoveu antecipação de saciedade, redução na ingestão alimentar dos grupos controle (C = 14.6 ± 1.6 vs CF = 6.6 ± 0.7) e fluoxetina (F = 9.4 ± 1 vs FF = 4.6 ± 0.5) e menor duração de alimentação entre os animais controle (C = 955 ± 66 vs CF = 646.4 ± 79). Em contraste, a imunoreatividade neuronal em resposta ao estímulo alimentar foi evidenciada pela maior expressão de C-fos entre os animais tratados com SSRI no núcleo arqueado (C = 33.2 F = ± 1.3 vs 53.4 ± 3.2) (P <0.0001) e nas regiões rostral (C = 105.1 ± 11.3 vs 207.2 ± F = 26.0) (P <0.001) e medial do NTS (C = 98.2 ± 10.1 vs. 154.8 ± 15.0 F =) (P <0.01). Em conjunto, os resultados revelam que a inibição neonatal da recaptação da serotonina promove alterações morfofisiológicas e comportamentais a longo-prazo. As características comportamentais e gênicas bem como os indicadores bioquímicos sugerem que a plasticidade fenotípica deste organismo direciona-se à menor ingestão alimentar, menor armazenamento de energia e maior susceptibilidade à variação dos indicadores bioquímicos plasmáticos de síndrome metabólica em resposta à sobrecarga energética.

Palavras-chave: Serotonina. Plasticidade Neuronal. Comportamento Alimentar.

ABSTRACT

Serotonin is a key neurotransmitter involved in the ontogeny of the nervous system being important for energy balance maintenance. We initially investigated the effects of pharmacological inhibition of neonatal serotonin reuptake related to feeding and metabolic parameters in adult rats exposed or not to high calorie diet. *Wistar* rat pups received daily 0.9% sterile saline (C, n = 10, NaCl0, 9%, 1µl / g BW, sc) or fluoxetine solution (F, n = 10, 10mg/kg, 1µl / g BW, sc) from postnatal day (PND 1 to 21). Each group received a daily subcutaneous injection and only one or two animals were used per group stemmed littermates for analyzes. From the age of 180 days, some animals in groups C and F were subjected to high calorie diet for five weeks and composed the following groups: C (C, n = 10); Cdiet (Cd, n = 10), F (F, n = 10) and Fiet (Fd, n = 10). Before and after chronic hypercaloric diet were analyzed body weight; food consumption; white abdominal pad; hypothalamic gene expression of 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}, NPY and POMC; glucose tolerance; plasma levels of triglycerides and cholesterol. Animals treated with SSRI in neonatal period had, in adulthood, lower body weight and food consumption (C = 27.20 ± 0.7 vs 22.3 ± F = 0.3, n = 10) (P = 0.0001) than controls. After feeding with high calorie diet, the animals of Cd and Fd had food consumption and weight gain equivalent. However the Fd group accumulated 64.32 % of white adipose tissue in relation to F versus 100.96 % increase in the Cd group compared to C. The analysis of the expression of hypothalamic 5-HT_{2C} showed lower expression of this receptor in animals treated who underwent pharmacological inhibition of serotonin reuptake compared to the control group (C = 1.08 ± 0.02 vs. F = 0.8 ± 0.04, n = 4, P < 0.001). The animals treated with SSRI during lactation also showed lower fasting blood glucose and lower plasma cholesterol levels. In another experiment, using the same experimental model, we checked behavioral satiety sequence and the expression of *c-Fos* in the NTS and ARC after chow dietary exposure. We also measured the levels of serotonin in the hypothalamus. Pharmacological inhibition of serotonin during lactation promoted anticipation of satiety, reduced food intake in the control groups (C = 14.6 ± 1.6 vs 6.6 ± CF = 0.7) and fluoxetine (F = 9.4 ± 1 vs FF = 4.6 ± 0.5) and shorter eating duration among the control animals (C = 955 ± 66 vs CF = 646.4 ± 79). In contrast, immunoreactive neuronal stimulation in response to food was evidenced by increased *c-Fos* expression in the ARC SSRI-treated animals (C = F = 33.2 ± 1.3 vs 53.4 ± 3.2) (P < 0.0001) and regions rostral (C = 105.1 ± 11.3 vs 207.2 ± F = 26.0) (p < 0.001) and medial NTS (C = 98.2 ± 10.1 vs 154.8 ± F = 15.0) (P < 0.01). Together, the results reveal that neonatal serotonin reuptake inhibition promotes behavioral and morphological changes in the adulthood. Feeding behavior, hypothalamic gene expression and biochemical indicators suggest that the phenotypic plasticity of this organism directs to lower feed intake and energy storage plus greater variation susceptibility of plasma biochemical indicators to metabolic syndrome in response to energy overload.

Key words: Serotonin. Neuronal Plasticity. Feeding Behavior.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA TESE

Figura 1: Visão geral de circuitos homeostáticos da alimentação	25
Figura 2: Diagrama esquemático que propõe os locais de ação da serotonina	27
Figura 3: Núcleos analisados no estudo do efeito do tratamento neonatal com fluoxetina sobre a reatividade neuronal em resposta a estímulo alimentar.	37

FIGURAS DO ARTIGO 1

Figure 1: Effect of neonatal selective serotonin reuptake inhibition treatment on the Body Weight (A), Body weight before and after hypercaloric diet (B) and Relative Abdominal Fat Amount before and after hypercaloric diet (C).	45
Figure 2: Chow Diet Intake (A) and Total Hypercaloric Intake (B) in adult rats.	48
Figure 3: Relative amount of hypothalamic RNAm 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}, NPY and POMC in adult rats.	49
Figure 4: Glucose Tolerance Test (A); Fasting Glucose (B) and Area Under the Curve (C) in adult rats that experienced serotonergic system neonatal pharmacological manipulation	51

FIGURAS DO ARTIGO 2

Figure 1: Concentration of serotonin in hypothalamus of adulthood rats	66
Figure 2: Effect of neonatal SSRI treatment on the acute action of fluoxetine on BSS in adulthood rats	67
Figure 3: Effect of neonatal SSRI microstructure on the behavioral sequence of satiety	68
Figure 4: Neuronal immunoreactivity in the ARC and NTS in response to food stimuli in adult rats treated with SSRI during the neonatal period.	69

LISTA DE TABELAS

TABELAS DA TESE

Tabela 1: Sequência de *primers* utilizados para análise de PCR em tempo real 33

Tabela 2: Composição de dieta hipercalórica utilizada durante cinco semanas 35

TABELAS DO PRIMEIRO ARTIGO

Table 1: Sequences of primers used for the real-time PCR analysis 45

Table 2: Metabolic parameters after five weeks of palatable food in adulthood rats 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABREVIACÕES	PORTUGUÊS	INGLÊS
AP	Área postrema	-----
Arc	Núcleo Arqueado	Arcuate nucleus
AgRP	Proteína Relacionada ao Agouti	Agouti Related Protein
C	Controle	Control
CART	Transcrito regulado pela cocaine e anfetamina	Cocaine and amphetamine regulate transcribed
CCK	Colecistocinina	Cholecistokynin
Cdna	DNA complementar	Complementary DNA
CEUA	Comissão de ética no uso de animais do centro de ciências da saúde	-----
CF	Controle Fluoxetina	Control Fluoxetine
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal	-----
CP-94,253	Agonista seletivo do receptor 5HT _{1B}	3-(1,2,5,6-tetrahydro-4-pyridyl)-5-propoxypyrolo[3,2-b]pyridine
DAB	3-3diaminobenzidina	
DPN	Dia pós natal	-----
DNA	Ácido Desoxirribonucleico	Desoxyribonucleic acid
E11	11º dia de gestação	Pregnancy day 11
F	Fluoxetina	Fluoxetine
FF	Fluoxetina fluoxetina	Fluoxetine fluoxetine
FOS-IR	Neurônios FOS imunorreativos	Immunoreactive Fos Neurons
GLP	Peptídeo semelhante ao glucagon	Glucagon-like peptide
GTT	Teste de Tolerância à Glicose	Glucose Tolerance Test
LHA	Área Lateral do Hipotálamo	Lateral Hypothalamus Area
MAO	Monoamino oxidase	Monoamine oxidase
NaCl	Cloreto de Sódio	Sodium Chloride
NAS	Níquel sulfato ammonia	Nickel ammonia sulphate
NPY	Neuropeptídeo Y	Neuropeptide Y
NTS	Núcleo do trato solitário	Nucleus Tractus Solitarius
PBS	Tampão fosfato de pótassio	-----
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia	Polymerase Chain Reaction
PND/DPN	Dia pós natal	Post natal day
POMC	Proopiomelanocortina	Proopiomelanocortin
PVN	Núcleo paraventricular	Paraventricular Nucleus
Ro-0175	Agonista seletivo do receptor 5-HT _{2C}	2-(6-chloro-5fluoroindol-1-yl)-1-methylethylamine
RNA	Ácido ribonucléico	Ribonucleic acid
SCS/BSS	Sequência comportamental de	Behavioural Satiety Sequence

SERT	saciedade Transportador da serotonina	Serotonin Transporter
SLC6A4	-----	Solute carrier family 6 neurotransmitter transporter serotonin member 4
SNC	Sistema Nervoso Central	Central nervous system
SSRIs/ISRS	Inibidor Seletivo da Reaptação da Serotonina	Selective serotonin reuptake inhibitors
TpH₂	Triptofano Hidroxilase 2	Tryptophan Hydroxylase 2
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco	Federal University of Pernambuco
VMH	Hipotálamo Ventromedial	Ventromedial Hypothalamus
VO₂	Consumo de Oxigênio	Oxygen consumption
5HT	5-Hidroxitriptamina	5-Hydroxytryptamine
5-HTT	Transportador da serotonina	
5-HT_{1A}	Receptor 1A da 5-HT	5-HT _{1A} Receptor
5-HT_{1B}	Receptor 1B da 5-HT	5-HT _{1B} Receptor
5-HT_{2A}	Receptor 2A da 5-HT	5-HT _{2A} Receptor
5-HT_{2C}	Receptor 2C da 5-HT	5-HT _{2C} Receptor
5-HT_{5A}	Receptor 5A da 5-HT	5-HT _{5A} Receptor

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Plasticidade Fenotípica: Teoria	19
2.2 Serotonina e Plasticidade Fenotípica	21
2.3 Inibição Farmacológica Neonatal da Recaptação da Serotonina: gênese de alterações fenotípicas	23
2.4 Comportamento Alimentar: centros de controle e serotonina	25
3. HIPÓTESE	31
4. OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo Geral	32
4.2 Objetivos Específicos	32
5. MÉTODO	33
5.1 Animais	33
5.2 Grupos Experimentais	33
5.3 Experimento 1:	34
<i>Peso corporal e ingestão alimentar</i>	34
<i>Teste de Tolerância à Glicose (GTT)</i>	34
<i>Expressão Gênica no Hipotálamo</i>	35
<i>Análises Bioquímicas e Mensuração de Tecido Adiposo Abdominal</i>	36
<i>Administração Crônica de Dieta Hipercalórica</i>	36
5.4 Experimento 2:	37
<i>Seqüência Comportamental de Saciedade (SCS)</i>	37
<i>Imunorreatividade a proteína Fos no núcleo arqueado e núcleo do trato solitário</i>	38
<i>Dosagem de serotonina no hipotálamo</i>	39
5.5 Análise Estatística	40
6. RESULTADOS	41
6.1 Artigo 1	42

6.2 Artigo 2	63
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS e PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	87
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	88
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 1	89
ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 2	90

1. APRESENTAÇÃO

Durante o desenvolvimento, a resposta de organismos a diferentes condições ambientais gerando uma série de fenótipos distintos (estados morfológicos ou fisiológicos) potencialmente expressos por um genótipo é chamada plasticidade fenotípica. A serotonina exerce papel chave na ontogênese e maturação do sistema nervoso. Logo após seu surgimento, neurônios serotoninérgicos projetam-se através do encéfalo para modular a maturação de outros circuitos neuronais e fazer contatos sinápticos funcionais precoces. Este neurotransmissor atua na maioria dos circuitos neuronais encefálicos relacionados à regulação do desenvolvimento morfofisiológico e comportamental. Assim, fatores que alterem o funcionamento do sistema serotoninérgico no período perinatal podem promover adaptações na expressão fenotípica tardia, com alterações morfofuncionais duradouras.

Estímulos ambientais como desnutrição, inibição da recaptação da serotonina através de fármacos ou o *Knockout* do gene que permite a expressão do Transportador da Serotonina (SERT) são capazes de alterar a disponibilidade sináptica de serotonina. Em ratos, a expressão gênica do SERT também é precoce em neurônios serotoninérgicos da rafe, se estende a neurônios não serotoninérgicos e termina na segunda semana após o nascimento. O maior tônus serotoninérgico na fenda sináptica incrementa a magnitude e duração de sua atividade sobre os seus receptores. Como a 5-HT medeia a ação destes receptores e exerce papel trófico sobre eles, a utilização de Inibidor Seletivo da Recaptação da Serotonina (ISRS) durante o desenvolvimento pode gerar alterações transcricionais em mecanismos celulares e moleculares associados à plasticidade. Este ponto é relevante, pois os SSRIs, capazes de atravessar a barreira hemato-placentária e passar para os neonatos através do leite materno, são utilizados no tratamento de depressão em mulheres durante a gestação e lactação bem como na infância e adolescência. Apesar do percentual de depressão pós-parto ser significativo e da utilização de ISRS no tratamento ser vasta, ainda há poucos relatos dos efeitos em longo prazo deste tipo de tratamento.

As alterações do comportamento alimentar estão na base dos principais distúrbios metabólicos enquanto fator causal ou decorrente. No hipotálamo, o receptor serotoninérgico mais expresso é o 5-HT_{2C}. Para o controle do comportamento alimentar, a serotonina atua através dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B}, dentre outras ações, sobre populações neuronais POMC e NPY/AgRP do núcleo arqueado do hipotálamo, respectivamente. A serotonina tem

importante papel na promoção de saciedade, assim a sua maior disponibilidade promove hipofagia associada a aumento no gasto energético. Camundongos knockout para o receptor 5-HT_{2C} apresentam hiperfagia crônica, perturbações na taxa metabólica, alterações em hormônios relacionados ao metabolismo energético, aumento no consumo de dieta lipídica e modelo circadiano de síndrome *night-eating*, semelhante àquela da obesidade em humanos.

Nós hipotetizamos que o aumento da disponibilidade de serotonina através da inibição de sua recaptação no período neonatal induziria alterações em aspecto fenotípico e gênico do controle do comportamento alimentar, em níveis de serotonina hipotalâmica e em indicadores bioquímicos do metabolismo em ratos adultos. Partimos do princípio que este modelo farmacológico apresentaria expressão fenotípica semelhante ao modelo experimental de desnutrição, pois uma característica deste é o aumento na disponibilidade extracelular de serotonina encefálica. No entanto, promovendo a dissociação entre a maior disponibilidade sináptica de 5-HT e fatores nutricionais, o foco seria a interação entre a alteração precoce do sistema serotoninérgico e os possíveis efeitos plásticos sobre o comportamento alimentar com seus desdobramentos centrais e sistêmicos. Observamos ao final deste estudo que a inibição farmacológica neonatal do SERT induz expressão fenotípica diferente do modelo experimental de desnutrição perinatal. No primeiro experimento, os animais submetidos à inibição neonatal da recaptação da serotonina apresentaram hipofagia, acumularam menos tecido adiposo e não apresentaram alterações glicêmicas quando submetidos à dieta hipercalórica na vida adulta. Além disso, o estímulo alimentar hipercalórico foi relacionado à maior expressão gênica do receptor 5-HT_{2C} no hipotálamo. O segundo experimento demonstrou que a manipulação farmacológica neonatal foi associada ao aumento dos níveis encefálicos de serotonina na vida adulta. Essa alteração foi acompanhada por antecipação na saciedade acompanhada de maior imunorreatividade neuronal nos núcleos do trato solitário (NTS) e arqueado do hipotálamo (Arc). Estes resultados estão descritos com detalhes em dois artigos originais que nos levam a confirmar que alterações precoces no sistema da serotonina estão associadas a repercussões na plasticidade fenotípica, especialmente após demandas ambientais na idade adulta.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O surgimento do sistema serotoninérgico ocorre precocemente durante o período embrionário. A serotonina e seu transportador são imprescindíveis à ontogênese e maturação do sistema nervoso central. Alterações no sistema da serotonina em períodos iniciais do desenvolvimento sinalizam para uma série de alterações fenotípicas, porém os estudos que abordam a gênese destas alterações frente à inibição farmacológica da recaptação da serotonina são escassos. Esta revisão aborda a teoria da plasticidade fenotípica e enfatiza a serotonina e a inibição da sua recaptação como fatores indutores de plasticidade fenotípica.

2.1 Plasticidade Fenotípica: Teoria

Diversos estudos consideram os ambientes fetal e neonatal (perinatal) como importantes indutores de fenótipo. A hipótese que associa a vida perinatal ao surgimento de doenças no adulto é denominada *Thrifty Phenotype Hypothesis*, tendo sido proposta em 1992 por Hales e Barker. Segundo esta hipótese, estímulos ou insultos ocorridos durante a gestação e lactação promovem adaptações fisiológicas e metabólicas. Estas adaptações privilegiam o aporte nutricional/crescimento de órgãos vitais como encéfalo e coração em detrimento de outros órgãos como o pâncreas e o músculo esquelético (Hales and Barker 2001). Em curto prazo, estas adaptações fenotípicas favorecem a sobrevivência, mas a longo-prazo, tornam o organismo susceptível ao aparecimento de distúrbios metabólicos (Hales and Barker 1992). Esta hipótese tem sido utilizada para justificar interações entre baixo o peso ao nascer e o risco tardio de doenças cardiovasculares (Barker, Eriksson et al. 2002; Dullloo 2008; Godfrey, Gluckman et al. 2010).

As evidências que correlacionam baixo peso ao nascer e o risco tardio de doenças cardiovasculares foram relatadas pela primeira vez em 1976 quando Ravelli e colaboradores publicaram um estudo que constatou que a restrição no fornecimento de alimentos ocorrida na Holanda durante a II Guerra Mundial (período chamado de “Fome Holandesa” - *Dutch Famine*) resultou em mães desnutridas cujos filhos apresentaram um quadro de obesidade e diabetes tipo II a partir do 19 anos de idade (Ravelli, Stein et al. 1976). A interação entre eventos perinatais e repercussões na idade adulta foi também observada no estudo tipo “coorte” com dados de Hertfordshire (Inglaterra) que demonstraram haver forte correlação

negativa entre baixo peso ao nascimento e o risco de morte por doença cardíaca (Barker, Osmond et al. 1989). Em 1990, David Barker e colaboradores propuseram a hipótese da origem fetal de doenças da vida adulta associando fatores ambientais, particularmente a nutrição, com doenças metabólicas em adultos (Barker, Bull et al. 1990). Neste caso, um organismo que se desenvolveu em ambiente nutricionalmente deficiente seria programado para sobreviver utilizando baixa demanda energética após o nascimento (Hales and Barker 1992). No entanto, quando o ambiente posterior se mostra diferente do ambiente onde o organismo se desenvolveu, pode ocorrer elevado índice de síndrome metabólica (Barker and Clark 1997; Gluckman and Hanson 2004; Remacle, Bieswal et al. 2004) caracterizada por intolerância à glicose, hipertensão arterial e dislipidemias (Hales and Barker 2001; Ozanne and Hales 2002).

Um novo modelo teórico associa a trajetória de crescimento desde a infância até a maturidade ao risco de doenças cardiovasculares na vida adulta (Wells 2011). Esta hipótese destaca o peso ao nascer como índice de “capacidade metabólica” (estrutura e função de órgãos durante a vida fetal e infância como promotores de manutenção da homeostase), e vários fatores na infância (grande massa de tecido, comportamento sedentário e dieta rica em gordura) como índice de carga metabólica que desafia a manutenção da homeostase (Wells 2011). Segundo este modelo, o incremento no tamanho do corpo e o maior acúmulo de tecido adiposo são preditores do aumento da carga metabólica, ao mesmo tempo em que o baixo peso ao nascer é preditor de reduzida capacidade metabólica (Wells 2010).

As hipóteses do fenótipo poupador (*thrifty phenotype hypothesis*) e o modelo de capacidade-carga metabólica estão inseridas na hipótese da “Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença” ou “Plasticidade Fenotípica”. Segundo esta nova perspectiva fundamentada na teoria da biologia evolucionista, eventos precoces associados a predisposições genéticas influenciam respostas adaptativas do organismo ao ambiente e podem favorecer o surgimento de doenças na idade adulta (Gluckman, Hanson et al. 2011). Neste caso, há relação entre o ambiente perinatal e a plasticidade do organismo o qual é eficiente em curto-prazo, porém, pode apresentar como efeitos o surgimento precoce das seguintes doenças metabólicas: Diabetes Mellitus Tipo II; obesidade; hipertensão; doenças cardiovasculares e distúrbios do comportamento alimentar (Gluckman, Hanson et al. 2011).

Sendo assim, a plasticidade fenotípica representa as respostas de organismos a diferentes condições ambientais que geram uma série de fenótipos distintos (estados morfológicos ou fisiológicos) potencialmente expressos por um genótipo (West-Eberhard 2005; Gluckman, Lillycrop et al. 2007; Low, Gluckman et al. 2011). Plasticidade é um antigo

termo usado como referência às alterações morfológicas ocorridas durante o desenvolvimento (Edmund B. Wilson, 1894) e ao comportamento sensível ao ambiente (James Mark Baldwin, 1902) (West-Eberhard 1986). A plasticidade está, pois, susceptível à influência dos genes (genoma individual) e do ambiente (variação do fenótipo) (West-Eberhard 1986). O termo “plasticidade” é também usado como descritor de respostas irreversíveis às variações ambientais (Stearns, de Jong et al. 1991). Uma das variações melhor documentadas no estudo da plasticidade fenotípica é a nutrição. Tanto a escassez como o aumento quantitativo ou qualitativo da disponibilidade de nutrientes durante períodos críticos do desenvolvimento parecem agir de forma permanente no desenvolvimento de sistemas fisiológicos (West-Eberhard 1986). Outros estímulos ou insultos que ocorrem no período perinatal como o uso de fumo, antígenos, drogas e álcool podem promover alterações morfofisiológicas. Nesta revisão, destacamos que a perturbação perinatal do sistema serotoninérgico com a utilização de fármacos que agem inibindo a recaptação da serotonina parece interferir na plasticidade fenotípica por promover modificações estruturais, fisiológicas e comportamentais nos organismos (Shuey, Sadler et al. 1993; Moiseiwitsch and Lauder 1995).

2.2 Serotonina e Plasticidade Fenotípica

A serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT) pode atuar como sinalizador celular, neuromodulador, hormônio ou neurotransmissor a depender da posição que o organismo ocupa na escala filogenética (Buznikov 1991; Cote, Fligny et al. 2007). O sistema de sinalização intracelular da serotonina tem sido preservado ao longo de aproximadamente dois milhões de anos de evolução nos seres que vão de protozoários a mamíferos (Nanney, 1980). A ativação desse sistema pode influenciar a expressão de vários genes e resultar em mudanças da atividade celular, o que faz da serotonina um importante fator para o desenvolvimento e para a ocorrência de mudanças plásticas em vários organismos. Os neurônios serotoninérgicos inervam várias regiões do Sistema Nervoso Central e conectam-se a diversos sistemas neuronais (Audet, Descarries et al. 1989). As funções integrativas próprias do sistema serotoninérgico dependem da densidade e localização dos receptores desse sistema, que permite regulação diferenciada durante os estados funcionais do desenvolvimento (Brodie and Shore 1957).

O sistema serotoninérgico possui organização anatômica semelhante entre os vertebrados (Parent 1981). O início da expressão fenotípica desse sistema acontece entre o 11º

ou 12º dia e o 15º dia de vida embrionária (Lauder 1990). Logo após seu surgimento, os neurônios serotoninérgicos projetam-se através do encéfalo para modular primariamente a maturação de outros circuitos neuronais e fazer contatos sinápticos funcionais precoces (Ogawa, Miyata et al. 1995). A combinação entre o aparecimento precoce dos neurônios serotoninérgicos e sua larga distribuição nos terminais receptores aponta para o papel chave da 5-HT no desenvolvimento encefálico, na auto-regulação destes terminais receptores (Whitaker-Azmitia 2001) e na diferenciação neuronal bioquímica e morfológica (Lauder 1990). A serotonina participa da maioria dos circuitos neuronais encefálicos relacionados à regulação do desenvolvimento e do comportamento (Whitaker-Azmitia 2001; Borue, Chen et al. 2007). No sistema nervoso central, a 5-HT é sintetizada e liberada pelos neurônios serotoninérgicos situados no tronco encefálico. Modelos *in vitro* e *in vivo* demonstram que a serotonina está envolvida em processos como neurogênese, diferenciação neuronal, mielinização axonal e sinaptogênese (Verge and Calas 2000).

Na ontogênese do sistema nervoso, os períodos críticos de desenvolvimento correspondem a fases de intensas modificações funcionais e estruturais (Resnick, Miller et al. 1979; Nishi 1994). Em humanos, o período crítico de desenvolvimento inicia-se no último trimestre de gestação e perdura até os três ou quatro primeiros anos de vida (McCance and Widdowson 1974). No rato, compreende a gestação e as três primeiras semanas de vida pós-natal (Morgane et al. 1978). Grande parte da maturação do sistema nervoso ocorre pré-natalmente em humanos e no período pós-natal em ratos. Entretanto, se forem comparados os processos de proliferação e migração entre estas duas espécies, observa-se que a progressão do desenvolvimento regional entre elas é relativamente paralela. Porém, a escala de tempo relacionada à ocorrência dos eventos é de dias para os roedores e de semanas ou meses para os humanos (Bayer, Altman et al. 1993).

Dada a importância da 5-HT na regulação da maioria dos circuitos neuronais encefálicos relacionados ao desenvolvimento morfofisiológico e comportamental, é possível associar alterações morfofuncionais duradouras a mudanças na disponibilidade de 5-HT durante etapas precoces do desenvolvimento (Borue, Chen et al. 2007). Sendo assim, agravos ambientais precoces na disponibilidade deste neurotransmissor podem causar alterações na plasticidade fenotípica do organismo.

2.3 Inibição Farmacológica Neonatal da Recaptação da Serotonina: gênese de alterações fenotípicas

Após sua produção nos neurônios da rafe do tronco encefálico, a serotonina é armazenada em vesículas presentes nos neurônios pré-sinápticos e liberada na fenda sináptica após um potencial de ação. Ao ser liberada, a 5-HT pode interagir com receptores, entretanto, imediatamente após esta interação, é imprescindível que seja removida da fenda. O processo de remoção de neurotransmissores da fenda sináptica é denominado recaptação e dele depende a duração e domínio espacial da ativação do receptor (Vialou, Balasse et al. 2007). No sistema serotoninérgico, a recaptação é realizada pelo transportador da serotonina (SERT ou 5-HTT), entretanto, a degradação da serotonina pela Monoamino Oxidase (MAO) também contribui para a manutenção dos níveis de 5-HT encefálica (Borue, Chen et al. 2007; Meier, Eloranta et al. 2007). Em camundongos, a expressão gênica do transportador da serotonina (SERT ou 5-HTT) tem início no 11º dia de gestação (E11) em neurônios serotoninérgicos da rafe, logo se estende a neurônios não serotoninérgicos e termina na segunda semana após o nascimento, concomitantemente à maturação dos circuitos neurais (Gaspar, Cases et al. 2003). O gene que codifica o SERT é o *Solute Carrier Family 6 neurotransmitter transporter, serotonin, member 4* (SLC6A4) (Meier, Eloranta et al. 2007). Em humanos, esse gene está localizado no cromossomo 17 e mutações associadas a ele podem resultar em 50 diferentes alterações fenotípicas na função desta proteína de transporte (Koishi, Yamamoto et al. 2006; Gilibert, Kwitek et al. 2008). Em termos comportamentais, os efeitos do bloqueio do SERT durante o desenvolvimento são drasticamente diferentes daqueles observados durante a vida adulta (Homberg, Schubert et al. 2010).

A recaptação sináptica da serotonina é susceptível à manipulação farmacológica por drogas conhecidas como Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRS) (Fabre and Hamon 2003). Os ISRSs possuem a mesma estrutura do neurotransmissor em questão e, por isso, ocupam o mesmo sítio de ligação da serotonina, promovendo aumento na quantidade de 5-HT na fenda sináptica (Ravna, Sylte et al. 2006). O maior tônus serotoninérgico na fenda sináptica incrementa a magnitude e duração de sua atividade sobre os receptores serotoninérgicos pré (5-HT_{1A/1B}) e pós (5-HT_{1A/2A/2C}) sinápticos (Homberg, Schubert et al. 2010). Como a serotonina medeia a ação destes receptores e exerce papel trófico sobre eles, a utilização de SSRIs durante o desenvolvimento pode gerar alterações transcricionais em mecanismos celulares e moleculares associados à plasticidade (Krishnan and Nestler 2008). Além disso, fármacos que agem sobre os receptores serotoninérgicos ou transportadores da 5-

HT, se utilizados durante o período perinatal, parecem causar modificações estruturais, fisiológicas e comportamentais nos organismos (Shuey, Sadler et al. 1993; Moiseiwitsch and Lauder 1995). Manipulações farmacológicas que incrementem níveis de 5-HT sináptica nos animais em desenvolvimento aparentemente também sinalizam para a perda dos terminais serotoninérgicos na idade adulta (Azmitia 2001). Este ponto deve ser especialmente considerado, pois os SSRIs são drogas utilizadas no tratamento de depressão em mulheres durante a gestação e lactação (Hendrick, Stowe et al. 2003), possuindo a capacidade de passar para o feto através da barreira hemato-placentária e para os neonatos através do leite materno (Baumann and Rochat 1995; Borue, Chen et al. 2007). A depressão pós-parto ocorre em 13% das mães e, em média, 50% destas mulheres são tratadas com antidepressivos (Weissman, Levy et al. 2004), entretanto, ainda há poucos trabalhos que disponibilizam informações sobre os riscos potenciais dos antidepressivos para as crianças (Weissman, Levy et al. 2004; Homberg, Schubert et al. 2010). Os ISRS também são prescritos para tratar depressão em crianças e em adolescentes (Warden, Bliziotis et al. 2005), porém, os efeitos tardios da utilização desses fármacos precisam ser melhor explorados (Azmitia 2001; Krishnan and Nestler 2008; Pawluski 2012).

Estudos experimentais em roedores mostram que a administração de ISRS durante período crítico de desenvolvimento cria mudanças no circuito cerebral e pode gerar alterações comportamentais que só se manifestam na idade adulta (Borue, Chen et al. 2007). Nosso grupo de pesquisa tem correlacionado deficiência de crescimento e alterações comportamentais em animais adultos submetidos à inibição farmacológica neonatal da serotonina durante a lactação (Mendes-da-Silva, de Souza et al. 2002; Deiro, Manhaes-de-Castro et al. 2004; Deiro, Manhaes-de-Castro et al. 2006; Silva, Goncalves et al. 2010). A utilização de ISRS durante a gestação ou infância pode agir sobre os neurônios que expressam os SERT e modificar suas propriedades no adulto através de alterações da sua transcrição específica ou de mudanças em sua expressão gênica (Narboux-Neme, Pavone et al. 2008). Estes autores relacionam ainda a utilização de várias doses de fluoxetina nos períodos gestacional ou pós-natal de roedores a diversas alterações comportamentais na idade adulta. O aumento da concentração sináptica de serotonina e a consequente superestimulação dos receptores serotoninérgicos sustenta esta hipótese, apesar de, os mecanismos através dos quais isso ocorre ainda não estarem totalmente esclarecidos (Bolanos-Jimenez, Manhaes de Castro et al. 1995).

Saindo do âmbito comportamental, relata-se que o uso de drogas serotoninérgicas ISRS como fenfluramina, fluoxetina e sertralina está associado à melhor tolerância à glicose

(Arora, Dryden et al. 1994; Breum, Bjerre et al. 1995; Maheux, Ducros et al. 1997; Adeghate, Ponery et al. 1999; Ghaeli, Shahsavand et al. 2004; Weber-Hamann, Kopf et al. 2005; Hsiao, Chung et al. 2006; Lam and Heisler 2007). Clinicamente, evidenciou-se que a fluoxetina promoveu redução no colesterol e triglicerídeos plasmáticos em indivíduos depressivos e diabéticos (Li, Chen et al. 2011; Shahsavand Ananloo, Ghaeli et al. 2013). A partir do Sistema Nervoso Periférico (SNP), o hipotálamo envia informações ao fígado ativando a via da síntese de glicogênio através de estimulação das células β pancreáticas à produção de insulina. Já a estimulação hipotalâmica das células α -pancreáticas através do Sistema Nervoso Simpático (SNC) sinaliza para a ativação da produção de glucagon e consequente glicogenólise (Uyama, Geerts et al. 2004). Adicionalmente, algumas áreas hipotalâmicas como o Hipotálamo Ventromedial (VMH), Hipotálamo Lateral (LHA) e Núcleo Paraventricular (PVN) contribuem para a regulação dos níveis de ácidos graxos livres e da glicemia (Steffens, Scheurink et al. 1988). Já os níveis plasmáticos de triglicerídeos são afetados pela expressão do receptor 5-HT_{5A} (Zhang, Smith et al. 2010). Atualmente é postulado que, além do sistema serotoninérgico central, existe um sistema serotoninérgico periférico independente. Ainda são poucas as evidências da função da serotonina como um hormônio gastrointestinal, especialmente no que diz respeito ao metabolismo da glicose e dos lipídeos. Apesar das funções da serotonina periférica ainda não estarem bem esclarecidas, ela pode ser um alvo atrativo para o tratamento de desordens metabólicas em um futuro próximo (Watanabe, Rose et al. 2011). Sendo assim, a utilização de fármacos que atuem sobre o sistema serotoninérgico, especialmente no período perinatal, podem trazer repercussões ainda mais amplas que as conhecidas até o presente.

2.4 Comportamento Alimentar: centros de controle e serotonina

A alimentação pode ser primariamente considerada um comportamento regulatório com a função de suprir a necessidade energética dos tecidos corporais, sendo um processo crítico para a sobrevivência (Lebrun, Bariohay and Jean, 2006). O comportamento alimentar representa uma resposta adaptativa decorrente da demanda do ambiente interno sendo modulado por oportunidades e limitações impostas pelo ambiente externo (Blundell, Rogers et al. 1985) através da interação complexa entre mecanismos periféricos e centrais que controlam a fome e a saciedade (York 1999). O núcleo do trato solitário e o hipotálamo são considerados centros para detecção e resposta a sinais de fome e de saciedade.

O núcleo do trato solitário (NTS) está localizado na porção caudal do tronco encefálico e exerce papel integrativo na modulação do comportamento alimentar através do controle do início e término da ingestão alimentar e da regulação do tamanho das refeições (Cone 2005; Schwartz 2006). Este núcleo é ativado por sinais saciogênicos viscerais como distensão gástrica (Raybould, Gayton et al. 1988; Willing and Berthoud 1997), nutrientes intestinais (Zittel, De Giorgio et al. 1994) e ingestão da refeição (Fraser and Davison 1993; Rinaman, Baker et al. 1998). Ele é a primeira região do SNC a receber informações viscero-sensoriais da cavidade oral e de regiões periféricas, principalmente via nervo vago (Schwartz 2006; Grill 2010; Rinaman 2010). Adicionalmente, o NTS é responsivo a fatores circulantes como o peptídeo semelhante ao glucagon (glucagon-like peptide - GLP), colecisticinina (CCK) e leptina (Ellacott, Halatchev et al. 2006; Hayes, Bradley et al. 2009). Além disso, várias porções do NTS são altamente vascularizadas pela Área Postrema (AP), uma estrutura também localizada no tronco encefálico que apresenta barreira hemato-encefálica bastante permeável, sendo capaz de detectar hormônios e outros fatores circulantes e permitir o acesso direto desses fatores ao NTS (Berthoud 2002). Esta região também exibe populações neuronais distintas que expressam o Neuropeptídeo Y (NPY) ou Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina (CART) e Proopiomelanocortina (POMC). Os neurônios POMC do NTS são ativados por aferências vagais e por sinais saciogênicos circulantes que contribuem para limitar a ingestão (Appleyard, Bailey et al. 2005). As informações que chegam a este núcleo são processadas e transmitidas a outras áreas encefálicas como hipotálamo, *locus coeruleus*, amígdala, tálamo e complexo parabrancial através de conexões diretas ou recíprocas (Berthoud 2002; Grill 2010; Rinaman 2010). Especificamente, o NTS repassa tais informações viscerais para centros de controle homeostático do hipotálamo, recebendo ainda projeções descendentes do hipotálamo lateral, do núcleo paraventricular (PVN) e do núcleo central da amígdala (Zhang, Fogel et al. 1999; Jiang, Fogel et al. 2003; Zhang, Cui et al. 2003) (Figura 1). Estudos neurofisiológicos demonstram que a estimulação glutamérgica destes locais é suficiente para inibir o incremento da ativação produzida pela distensão gástrica unicamente em neurônios do NTS. O papel funcional destas influências modulatórias na alimentação ainda não é bem determinado mas, dada a relação recíproca entre sensibilidade do NTS à atividade intestinal e diminuição da ingestão alimentar, a estimulação amigdalar ou hipotalâmica podem prever o incremento da alimentação (Zhang, Fogel et al. 1999; Zhang, Cui et al. 2003).

Assim como o NTS, o hipotálamo está localizado em região onde há pequena falha (maior permeabilidade) na barreira hemato-encefálica, o que possibilita sua integração com

informações periféricas e centrais de fome e de saciedade. As informações periféricas para o hipotálamo provém do trato gastrointestinal, pâncreas, fígado e tecido adiposo (Morton, Cummings et al. 2006). Já os neurônios serotoninérgicos, a partir dos núcleos da rafe, enviam projeções ascendentes para o hipotálamo de forma a controlar o comportamento alimentar e o balanço energético (Davidowa and Plagemann 2000). O hipotálamo é constituído de mais de quarenta núcleos, dentre os quais os núcleos arqueado, ventromedial, dorsomedial, paraventricular e a área do hipotálamo lateral estão associados à regulação do balanço energético (Meister 2007). Dentre estes, destaca-se a estreita relação do núcleo arqueado (Arc) com o controle do comportamento alimentar. Situado entre o terceiro ventrículo e a eminência mediana, este núcleo funciona como um órgão cincunventricular localizado fora da barreira hemato-encefálica, podendo receber informações do sangue e do fluido cerebroespinal. (Cone 2005). O Arc possui dois grupos de neurônios: aqueles produtores da Proteína Relacionada ao Agouti (AgRP) e do Neuropeptídeo Y (NPY); e aqueles que produzem a Pro-opiomelanocortina (POMC), e o Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina (CART). A estimulação de neurônios AgRP e NPY favorece a ingestão alimentar e reduz o gasto energético, enquanto que a estimulação dos neurônios POMC e CART sinaliza para redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (Morton, Cummings et al. 2006). A localização estratégica do Arc contribui para sensibilidade e resposta dos neurônios POMC/CART e NPY/AgRP a hormônios carregados pelo sangue e a sinais nutricionais que são relevantes para a homeostase energética e para a sinalização de fome e saciedade.

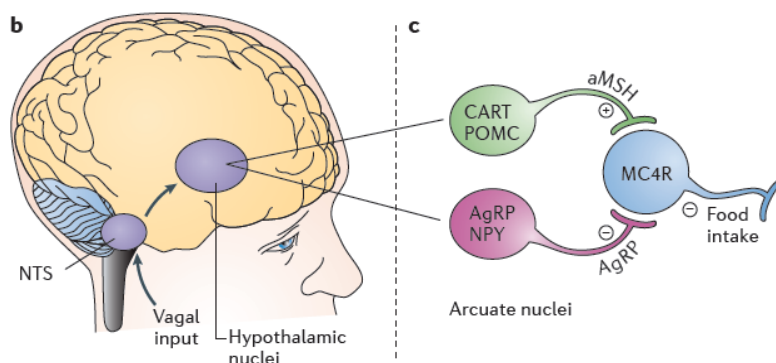


Figura 1: Visão geral de circuitos homeostáticos da alimentação: [Sinais hormonais das vísceras que regulam o balanço energético e a aferência do nervo vago, que estão relacionadas à distensão do estômago após a ingestão de refeição, alteram a atividade neuronal no núcleo do trato solitário (NTS). O NTS reenvia informações relacionadas ao balanço energético para circuitos de alimentação homeostáticos no hipotálamo. No núcleo arqueado, neurônios de primeira ordem que contêm peptídeo agouti-relacionados (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY) são ativados por sinais orexígenos e inibem os chamados neurônios de segunda ordem que expressam receptor de melanocortina 4 (MC4) induzindo inibição comportamento alimentar. Por outro lado, os sinais de anorexígenos ativam os neurônios CART e POMC. **Modificado de Kenny, 2011 (Kenny 2011).**

A serotonina está intimamente relacionada à ingestão alimentar e, atualmente, são muitos os progressos acerca da compreensão de como este neurotransmissor regula o comportamento alimentar e o metabolismo (Heisler, Jobst et al. 2006; Donovan and Tecott 2013). A estreita relação entre o sistema serotoninérgico e a ingestão alimentar é ratificada por estudos que demonstraram a elevação dos níveis de serotonina no hipotálamo como fator desencadeante de saciedade (Schreiber, Selbach et al. 2000) e sua redução como promotor de ingestão (Halford, Harrold et al. 2005). Os níveis de 5-HT no hipotálamo ainda exercem importantes papéis na seleção de macronutrientes, no tamanho da refeição e no peso corporal (Leibowitz, Weiss et al. 1989; Leibowitz and Alexander 1998). Cada função da serotonina pode ser mediada por uma variedade de receptores para 5-HT localizados em células neuronais e não neuronais (Lauder 1990). Com base nas suas características estruturais e funcionais, estes receptores estão divididos em sete classes (5HT₁ a 5HT₇) e 14 subtipos (Hoyer, Hannon et al. 2002). Os receptores 5-HT_{1A} (Gur, Newman et al. 2003), 5-HT_{1B} (Simansky and Nicklous 2002), 5-HT_{2A} (Park, Harrold et al. 1999) e 5-HT_{2C} (Hewitt, Lee et al. 2002) são investigados no âmbito da ação serotoninérgica sobre a ingestão alimentar. Os receptores 5-HT_{1A} são auto receptores e sua estimulação inibe a liberação de serotonina em terminais nervosos. A exposição crônica à serotonina eventualmente causa redução desse receptor, restringindo a liberação de 5-HT nos terminais do axônio (Fabre and Hamon 2003). A injeção sistêmica ou central do agonista para o receptor 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) induz hiperfagia (Bendotti and Samanin 1986). Já a utilização de agonista para o receptor 5-HT_{2A} atenua a hiperfagia (Grignaschi, Sironi et al. 1996). Estudos utilizando deleção de receptores serotoninérgicos específicos demonstram que os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} estão envolvidos de forma crítica no balanço energético (Tecott, Sun et al. 1995; Lucas, Yamamoto et al. 1998). Heisler e colaboradores (2002), através de evidências experimentais, elucidaram o mecanismo de ação da serotonina na modulação da ingestão alimentar. Estes autores demonstraram que a 5-HT hiperpolariza e inibe os neurônios AgRP, promovendo redução na inibição das células POMC através dos receptores 5-HT_{1B}. Ao mesmo tempo, esta monoamina age sobre os receptores 5-HT_{2C} promovendo ativação dos neurônios POMC. Dessa forma, a serotonina, atuando reciprocamente sobre os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} modula a ingestão alimentar (Heisler, Jobst et al. 2006) (Figura 2).

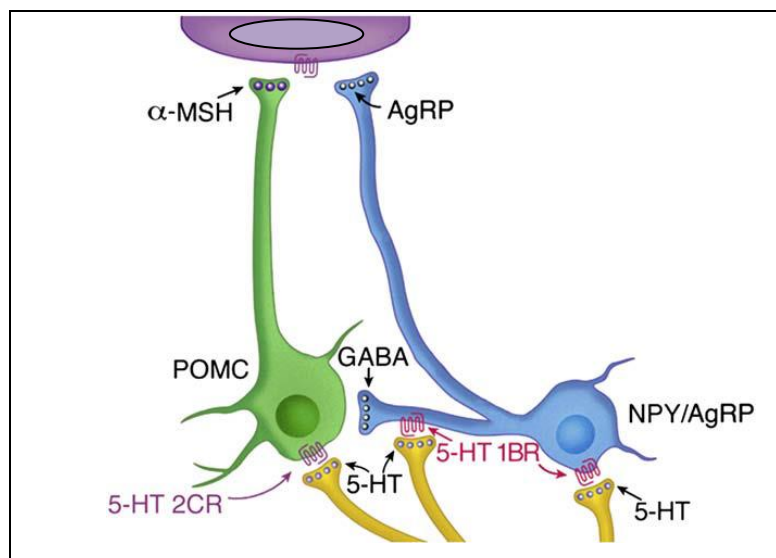


Figura 2: Diagrama esquemático que propõe os locais de ação da serotonina (5-HT). Modificado de Heisler et al., 2006 (Heisler, Jobst et al. 2006).

Os receptores 5-HT_{1B} parecem estar localizados preferencialmente nos terminais pré-sinápticos, embora também sejam encontrados em terminais pós-sinápticos (Gross and Galili 1999). Elevadas concentrações destes receptores estão presentes nos núcleos hipotalâmicos paraventricular e ventromedial (Simansky and Nicklous 2002). A administração do agonista seletivo 5-HT_{1B} (CP-94,253) reduz a ingestão alimentar e altera a Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) em ratos e camundongos (Halford and Blundell 1996; Schreiber, Selbach et al. 2000) o que destaca seu envolvimento com mecanismos que desencadeiam o processo de saciedade (Lee, Kennett et al. 2002). Este subtipo de receptor estaria relacionado à redução do comportamento de alimentação e do consumo alimentar (Lee, Kennett et al. 2002). Já os receptores 5-HT_{2C}, que são expressos pós-sinapticamente por todo o SNC (Wright, Seroogy et al. 1995), parecem modular o comportamento alimentar, promovendo redução no tamanho da refeição e na duração do comportamento de alimentação. Este efeito pode ser verificado após administração do seu agonista Ro-0175 (Clifton, Lee et al. 2000).

A expressão do comportamento alimentar em roedores é dada com clareza durante a Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) (Blundell 1991). A SCS foi estudada inicialmente por Antin et al. (Antin, Gibbs et al. 1975), que a caracterizou pela ingestão alimentar seguida por pequeno período de atividade, autolimpeza e repouso. Essa sequência é associada à cessação natural da alimentação e desenvolvimento da saciedade (Antin, Gibbs et al. 1975). Estudos com a SCS demonstraram que o aumento induzido dos níveis encefálicos de 5-HT através da administração de um ISRS, reduz o consumo alimentar sem alterar a duração do comportamento de alimentação e aumentando a duração do comportamento de

descanso (Halford and Blundell 1996). Em adição, o uso de fenfluramina, um bloqueador da recaptação e estimulador da liberação da serotonina, além de reduzir o consumo alimentar, reduz a duração do comportamento de alimentação e aumenta a duração do descanso (Hewitt, Lee et al. 2002). Isso mais uma vez evidencia que a serotonina regula o comportamento alimentar, estimulando a saciedade.

Nas alterações nutricionais precoces há variações neuroquímicas em vários sistemas de neurotransmissores (Almeida et al., 1996). Por exemplo, nos estudos em que ratos foram submetidos à desnutrição protéica e calórica houve alteração do sistema serotoninérgico com aumento dos níveis de serotonina encefálica (Resnick e Morgane, 1984; Hernandez et al., 1989); incremento da fração livre de L-Triptofano, que é o precursor de 5-HT no encéfalo e no plasma, e aumento na atividade da enzima triptofano hidroxilase (Manjarrez et al., 1994). Animais submetidos à desnutrição protéica durante a lactação apresentaram hiperfagia decorrente do aumento do tamanho das refeições. Este tipo de restrição promoveu aumento dos peptídeos orexigênicos AgRP e NPY e diminuição hipotalâmica dos níveis do peptídeo anorexigênico (POMC) (Orozco-Solis, 2009). Entretanto, não foram encontrados na literatura trabalhos que correlacionem o aumento neonatal da serotonina encefálica através da utilização de ISRS com alterações plásticas do comportamento alimentar.

São inúmeros os estudos que ratificam a interação entre o sistema serotoninérgico e a regulação do comportamento alimentar. A desnutrição é conhecida como um agente ambiental capaz de aumentar os níveis de serotonina encefálica e induzir alterações características da programação sobre os sistemas orgânicos, inclusive sobre as estruturas reguladoras do comportamento alimentar. Porém, são raros os estudos que tratem das alterações tardias do comportamento alimentar provenientes de manipulações farmacológicas neonatais do sistema da serotonina. Nosso grupo postula um papel destacado do sistema de neurotransmissão serotoninérgico nos mecanismos subjacentes à plasticidade fenotípica. Diversos aspectos comportamentais e macroscópicos relacionados à inibição da recaptação da serotonina durante a lactação foram estudados, entretanto, investigações celulares e moleculares relativas ao controle do comportamento alimentar e ao metabolismo energético são postas à elucidação neste trabalho.

3. HIPÓTESE

A inibição farmacológica neonatal da recaptação da serotonina promove alterações na expressão fenotípica do controle do comportamento alimentar, favorecendo hiperfagia, e torna os organismos mais susceptíveis ao desenvolvimento de alterações bioquímicas semelhantes à que ocorrem na síndrome metabólica na idade adulta.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da inibição neonatal da recaptação da serotonina sobre o controle do comportamento alimentar e indicadores bioquímicos em ratos adultos

4.2 Objetivos Específicos

A) Avaliar em animais adultos, submetidos à manipulação farmacológica neonatal do sistema serotoninérgico, antes e após exposição crônica à dieta hipercalórica:

- Peso corporal e consumo alimentar;
- Expressão gênica de Neuropeptídeo Y (NPY), Pro-opiomelanocortina (POMC), receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} no hipotálamo;
- Deposição adiposa abdominal, tolerância à glicose, níveis plasmáticos triglicerídeos e colesterol.

B) Avaliar em animais adultos, submetidos à manipulação farmacológica neonatal do sistema serotoninérgico:

- A sequência comportamental de saciedade;
- A dosagem de serotonina hipotalâmica;
- A imunorreatividade neuronal do Núcleo do Trato Solitário (NTS) e no núcleo arqueado (Arc) do hipotálamo.

5. MÉTODO

5.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição – UFPE. Fêmeas virgens, saudáveis e com peso ideal para a idade de 120 dias foram transportadas para o biotério de experimentação do Departamento de Anatomia e passaram por adaptação de 15 dias sob condições padrão de biotério com temperatura de $23^{\circ}\text{C}\pm 1$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas invertido (escuro: 6:00h às 18:00h / claro: 18:00h às 6:00h) e livre acesso à água *ad libitum* e à alimentação.

Após a adaptação, as ratas em período estral foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho. Durante o período de prenhez, as ratas foram alocadas em gaiolas individuais e continuaram em condições padrão de biotério até o nascimento dos filhotes. As ninhadas foram compostas no primeiro dia pós-natal (1º DPN) dos filhotes pela nutriz e oito ratos neonatos machos escolhidos aleatoriamente. Só foram incluídos na composição das ninhadas, filhotes com peso entre 6 e 8 gramas (Ferraz-Pereira and K. N.; Lopes de Souza S. 2012). Foram utilizadas fêmeas para completar as ninhadas e as mesmas foram cedidas experimentos de outros pesquisadores após desmame.

O manejo e os cuidados com os animais seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as normas do National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Para a realização do estudo, foi obtida aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) (Ofício 305/2010) (ANEXO A).

5.2 Grupos Experimentais

Foi utilizado um inibidor seletivo de recaptação de serotonina, a fluoxetina, na concentração de 10mg/Kg de peso corporal durante a lactação. O fármaco foi obtido na forma de cloridrato de fluoxetina (Bristol-USA) e dissolvido em solução salina, NaCl 0.9% (Silva, Goncalves et al. 2010). Os ratos neonatos receberam o tratamento uma hora após o início do ciclo escuro (07:00h), horário que coincide com o pico de liberação de 5-HT no hipotálamo e potencializa a ação do fármaco (Mateos, Sanchez et al. 2009).

Os grupos experimentais foram formados segundo tratamento dos filhotes com fluoxetina ou administração de solução salina durante toda a lactação (Deiro, Manhaes-de-Castro et al. 2006; Silva, Goncalves et al. 2010). Em cada ninhada (n=8), tivemos animais pertencentes ao Grupo Controle (C) (n=4) e ao Grupo Fluoxetina (F) (n=4) conforme o descrito a seguir:

Grupo Controle (C): Os filhotes receberam solução de salina (NaCl 0.9%, 1µl/g, s.c.) via subcutânea, diariamente, do 1º ao 21º dia de vida.

Grupo Fluoxetina (F): Os filhotes foram submetidos ao tratamento com solução de Fluoxetina 10mg/Kg (1µl/g, s.c.), diariamente, via subcutânea, do 1º ao 21º dia de vida.

Deste o desmame até os 170º DPN, os ratos foram mantidos em caixas coletivas contendo 2 ou 3 animais sob condição padrão de biotério, com água e dieta padrão *ad libitum* (Labina, Purina®). A partir dos 170 dias de vida até o final do estudo os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (45x30x20 cm) com cama de flocos de madeira, um rato por caixa. Desta forma, os animais puderam ver, ouvir e sentir o cheiro dos seus conspectivos nas caixas adjacentes, evitando o isolamento social (Rodgers, Holch et al. 2010). Os experimentos foram realizados nas idades entre 180 e 200 dias de vida.

5.3 Experimento 1:

Peso corporal e ingestão alimentar

O peso corporal de cada animal foi mensurado diariamente durante o período lactacional e nas idades de 30, 60, 90, 120 e 180 dias de vida (MENDES DA SILVA et al., 2010;(Deiro, Manhaes-de-Castro et al. 2006). Na idade de 180 dias, após adaptação de sete dias, durante os quais os animais estabeleceram o modelo de alimentação, a ingestão alimentar foi monitorada diariamente, a cada 24 horas, durante três dias consecutivos. O consumo alimentar diário foi determinado a cada 24 horas através da diferença entre a quantidade de dieta padrão oferecida e a quantidade rejeitada no dia seguinte. Cada rato foi acomodado em caixas de polipropileno (45x30x20 cm) desde adaptação até o final do estudo.

Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

Após 12 horas de jejum, os animais com 185 dias de vida foram submetidos à primeira coleta de sangue (tempo 0), através de corte na extremidade da cauda do animal, para retirada de uma alíquota de 10µl. Em seguida, foi administrada, por via intraperitoneal, uma solução

de glicose a 50% (Equiplex Indústria Farmacêutica Ltda., Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) na dose de 1mg/g de peso do animal, e outras amostras de sangue foram coletadas nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos. A análise da concentração de glicose em cada um destes tempos foi realizada através de aparelho comercial (Accutrend Check – Roche®) (Fidalgo, Falcao-Tebas et al. 2012). A glicemia foi utilizada em cada tempo para o cálculo *area under the curve* (Le Floch, Escuyer et al. 1990).

Expressão Gênica no Hipotálamo

Aos 200 dias de vida, entre 7:00 e 8:00 h (1 hora após início do ciclo escuro), os animais *ad libitum* foram decapitados sem exposição à luz. O sangue do tronco foi coletado para análises plasmáticas. Os encéfalos foram retirados imediatamente, dissecados e congelados rapidamente em gelo seco picado para posterior armazenamento em freezer (-80°C).

O RNA total foi isolado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante Invitrogen e, logo após, a quantidade e qualidade do RNA purificado foi avaliada utilizando um espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, EUA). Depois, o RNA foi tratado com tampão de Wipeout gDNA (Qiagen®, Hilden, Alemanha) para remover eficazmente a contaminação do DNA genômico durante 2 min a 42 ° C e armazenado em gelo. Depois, 2,0 g de RNA purificado foram transcritos utilizando o kit de transcrição reversa QuantiTect (Qiagen®, Hilden, Alemanha), a 42°C durante 15 min e a enzima foi inativada a 95°C durante 3 minutos, no volume total de 20 (1 em RNase água livre). A preparação de cDNA foi, em seguida, armazenada a -20 ° C até sua utilização. Daí em diante, 5 µl de cada amostra de cDNA diluído foram utilizados como modelo para a amplificação por PCR usando SYBR Green (Qiagen®, Hilden, Alemanha) como corante intercalando e o instrumento o Fluorogenic e o Real-Time PCR - Rotor-Gene HRM 2Plex (Qiagen®, Hilden, Alemanha) como sistema de detecção. Parâmetros de PCR foram: inicialmente desnaturação de 5 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de 5 segundos a 95°C e 10 s a 60°C. Os *primers* utilizados para a amplificação estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência de primers utilizados para análise de PCR em tempo real

Gene	Forward primer	Reverse primer	Gene bank
NPY	GTGGACTGACCCTCGCTCTATC	ATGAGATTGATGTAGTGTGCGAGA	M20373
POMC	GAGGTAAAGGAGCAGTGAATAAGA	GTAGCAGAATCTCGGCATCTTCC	NM_033650
5HT1b	ATGGAGGAGCAGGGTATTCAGTG	TGGGAGAGGTTGGCGAGAGG	RGD:2846
5HT2c	GGGTTGCTGCCACTGCTTTG	GCTCTCGCTTACACACTACTAATCC	RGD:2848
®-ACTIN	ACGGTCAGGTCATCACTATCG	CAGCACTGTGTTGGCATAGAG	EF156276.1

Os valores-limite de ciclo foram determinados a partir de parcelas de fluorescência normalizada versus o número de ciclos PCR durante a amplificação exponencial. As curvas padrão para todas as amplificações de primers foram geradas traçando-se os valores médios do ciclo de limiar em função do logaritmo da quantidade de moléculas do molde alvo. Todas as quantificações foram normalizadas para o gene de controle interno *house-keeping* (β -actina). A quantificação relativa de cada gene alvo foi analisada utilizando um método CT comparativo (Livak and Schmittgen 2001). A seguinte fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi utilizada para calcular a quantidade relativa do transcrito na amostra e normalizado para a referência endógena (β -actina): $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é a diferença entre o CT entre o gene de interesse e β -actina e para a amostra $\Delta\Delta CT = \text{média } \Delta CT \text{ da amostra} - \text{média } \Delta CT \text{ da amostra de controle (utilizada como calibração)}$.

Análises Bioquímicas e Mensuração de Tecido Adiposo Abdominal

O sangue coletado após decapitação foi utilizado para análise de triglicerídeos e colesterol (total) plasmáticos através do teste colorimétrico Roche Diagnosis – Brazil® (Samuelsson, Matthews et al. 2008). O tecido adiposo abdominal foi retirado e quantificado através de balança de precisão (Marte®).

Administração Crônica de Dieta Hipercalórica

A partir dos 170 dias de vida os animais passaram por adaptação de dez dias em caixas de propileno (45x30x20 cm) com cama de flocos de madeira, um por caixa. Após a adaptação, os ratos foram submetidos a cinco semanas de dieta hipercalórica em forma de peletes (421,4 Kcal/100g) (Alsio, Olszewski et al. 2010) (**Tabela 2**).

Após receber dieta hipercalórica, os animais dos grupos C e F foram chamados C_{diet} e F_{diet} . Após a exposição alimentar crônica foram analisados: peso corporal, tolerância à glicose, expressão gênica hipotalâmica de NPY, POMC, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}; quantidade de tecido adiposo abdominal e níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol. Os métodos para estas avaliações foram descritos anteriormente.

Tabela –2 Composição de dieta hipercalórica utilizada durante cinco semanas

INGREDIENTES	QUANTIDADE (G)	CALORIAS	PROTEÍNAS	LIPÍDIOS	CARBOIDRATOS	FIBRAS
MAISENA	12,7		0	0	11,0	
FARINHA DE TRIGO	15,0		1,5	0,1	11,2	0,3
BISCOITO DOCE MAISENA	7,2		0,6	0,8	5,4	0,1
FARINHA DE SOJA	10,0		3,6	1,5	3,8	0
CASEÍNA	19,6		16,6	0	0	0
CELULOSE	1,2					
GOMA	0,5					
ÓLEO	6,0		0	6,0	0	0
BANHA	4,0		0	4,0	0	0
MARGARINA	4,2		0	2,8	0	0
AÇÚCAR	17,0		0	0	17,0	0
SAIS	1,5		0	0	0	0
VITAMINAS	0,5		0	0	0	0
COLINA	0,2					
BHTQ MG	0,1		0	0	0	0
METIONINA	0,2					
TOTAL	100	0	22,36	15,33	48,5	0,51
VET	421,4		89,4	138,0	194,0	
% CONTRIBUIÇÃO VET						
MACRO	4,2		21,2	32,7	46,0	
ARREDONDANDO			21,0	33,0	46,0	
PERCENTUAL						
PROTEÍNA ANIMAL	16,6	74,5				
PROTEÍNA VEGETAL	5,7	25,5				
CARBOIDRATO SIMPLES	17,0	35,0				
CARBOIDRATO COMPLEXO	31,5	64,95				
TOTAL	48,5					

5.4 Experimento 2:

Seqüência Comportamental de Saciedade (SCS)

A análise da SCS foi realizada aos 190 dias de vida, segundo a descrição de Halford et al (1998) (Halford, Wanninayake et al. 1998). No dia do teste, após jejum de duas horas os animais dos grupos C foram divididos randomicamente para receber salina estéril 0,9% (1µl/g, via intraperitoneal) ou solução de fluoxetina (10mg/Kg; 1µl/g, via intraperitoneal) passando a se chamar grupos, **C** (n=8) e **CF** (n=8), respectivamente. Da mesma forma, o grupo F recebeu solução salina estéril ou solução fluoxetina passando a se chamar grupos **F** (n=8), **FF**(n=10), respectivamente. Uma hora após as injeções intraperitoneais, foram oferecidos 30g de dieta padrão aos animais. A partir deste momento, foi registrada a duração (em segundos) dos comportamentos de alimentação, limpeza e repouso durante uma hora. O teste foi realizado no período de 12:00h às 13:00h (6 horas após início da fase escura do ciclo). Os registros foram obtidos através da aquisição das imagens por câmera com sistema de infravermelho e armazenados em computador. Apenas um avaliador treinado, sem prévio

conhecimento dos grupos experimentais, observou os filmes e registrou em protocolo os dados comportamentais. O Consumo Alimentar foi obtido pela diferença entre a quantidade de ração oferecida inicialmente e a quantidade de ração restante após o período de 1h. A taxa de alimentação foi calculada pela razão entre o consumo relativo e o tempo de alimentação.

Imunorreatividade a proteína c-Fos no núcleo arqueado e núcleo do trato solitário

O gene *c-Fos* possui expressão rápida e transitória em resposta a estímulos extracelulares. A expressão de *c-Fos* é um marco anatômico de neurônios ativados no sistema nervoso central (Sagar, Sharp et al. 1988). Inúmeros estudos têm detectado padrões únicos de expressão de *c-Fos* em resposta a estímulos específicos, inclusive, estímulos alimentares (Lopes de Souza, Orozco-Solis et al. 2008; Chen, Yan et al. 2011).

Dez dias após a realização da SCS, os ratos foram postos em jejum de três horas e, a seguir, expostos ao alimento durante 90 minutos. Após a exposição alimentar, os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca imediata com solução fisiológica (NaCl, 0,9%) seguida de solução fixadora (4% de paraformaldeído em 4% de PBS, pH 7,4, a 4° C) (Nogueira, Barbieri et al. 1997). Após perfusão, os encéfalos foram retirados do crânio, pós-fixados na mesma solução fixadora acrescida de sacarose (30%) durante 4 horas e armazenados em solução crioprotetora (Tampão Fosfato de Potássio – PBS- mais sacarose 30%) durante 6-24 horas para posterior crio-seccção em cortes coronais de 40µm de espessura utilizando criomicrotomo de congelamento (SM 2000 R, Leica, Alemanha). Foram coletadas, em solução anti-congelante, cinco séries de cortes para cada animal. Uma série foi submetida a reações de imunohistoquímica contra proteína *c-Fos* segundo protocolo de rotina (Darcel, Fromentin et al. 2005). Nesse procedimento os cortes foram removidos da solução anti-congelante e submetidos a lavagens (3xPBS). Em seguida, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (0,6%, 5 min). Em seguida foram incubados em solução com anticorpo primário anti-Fos (feito em coelho, 1:10.000, Calbiochem, Alemanha) por 48 h. Durante a incubação os cortes permaneceram em recipientes de 1,5 mL posicionados em uma incubadora agitadora refrigerada (Marconi- MA83) protegido da luz. Após novas lavagens em PBS (3x), os cortes foram incubados em anticorpo secundário biotilado (feito em cabra contra coelho, 1:200, Sigma- B8895) por 90 min. Em seguida, os cortes foram incubados (90 min) com complexo avidina-biotina-peroxidase 1% (Vectastain, Camon, Wiesbaden, Alemanha). A revelação foi realizada com 3,3-diaminobenzidina (DAB/Sigma D5637) e níquel sulfato amônio (NAS) até os cortes obterem a cor marrom

claro/púrpura. Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas, passaram por processos de desidratação e diafanização e foram, por fim, cobertos com lamínulas.

A análise foi realizada em microscopia óptica de campo claro. Foram quantificadas células com marcação evidente no núcleo arqueado do hipotálamo e núcleo do trato solitário. Para cada núcleo, foram considerados na análise todos os cortes coronais de uma série nos quais este núcleo foi evidenciado. Foram contadas todas as células em cada corte para cada núcleo. Para delimitação dos núcleos foi utilizado Atlas Estereotático, Paxinos e Watson nas regiões dos seguintes bregmas: Arc: -2,92; Rostral NTS: -12,72 a -12,96; Medial NTS: -13,92 a -14,15) (PAXINOS; WATSON, 2005) (Figura 3).

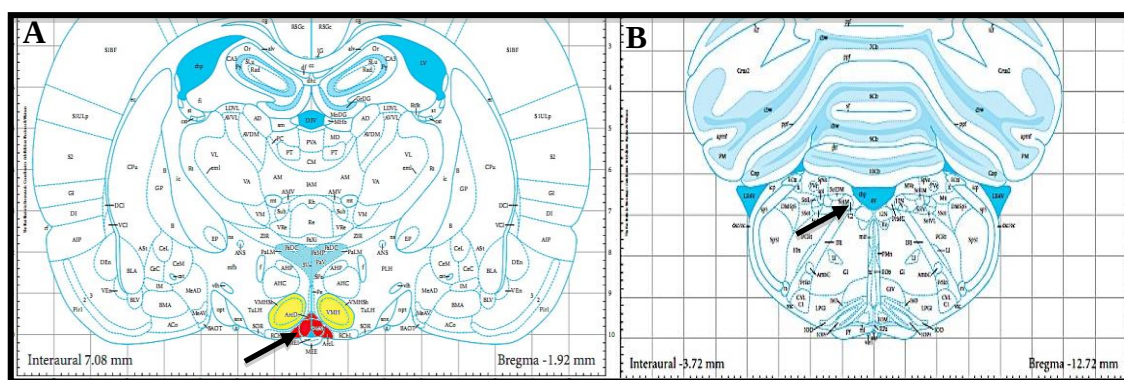


Figura 3- Núcleos analisados no estudo do efeito do tratamento neonatal com fluoxetina sobre a reatividade neuronal em resposta a estímulo alimentar. Núcleo arqueado do hipotálamo (A) e núcleo do trato solitário (B). Copiado de PAXINOS; WATSON, 2005

Dosagem de serotonina no hipotálamo

Os animais dos grupos Controle e Fluoxetina foram eutanasiados por decapitação para retirada do hipotálamo na idade 180 dias de vida (n=6/grupo). As amostras foram mantidas congeladas a -80° C até o momento da dosagem da serotonina através do Kit Serotonin Research EIA – LDN (Mateos, Sanchez et al. 2009).

Antes da dosagem de serotonina foi necessário realizar a quantificação proteica no hipotálamo. Para isso, os hipotálamos foram homogeneizados individualmente em tubos contendo 1 ml de 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA e 1 mM EGTA (Homogenizador Ultra-Turrax tipo TP 18/10; Janke & Kunkel KG, Staufen, Alemanha). A seguir, o material homogeneizado foi centrifugado (11,000 g (RCF); 4° C) durante 30 minutos. O sobrenadante foi aliquoteado para determinar os níveis de 5-HT. O extrato do tecido foi utilizado para determinar a concentração de proteínas (Mateos, Sanchez et al. 2009) através do método Bradford. Este método consiste da formação de um composto de absorção de cor azul entre os

resíduos de aminoácidos básicos de proteínas e o corante azul de Comassie. A absorbância depende do conteúdo de aminoácidos e o conteúdo de proteína presente no tecido (Bradford 1976).

A dosagem serotonina foi realizada através do kit ELISA RE59121 (IBL, Hamburg, Alemanha) de acordo com o manual de instruções. Este ensaio imunoenzimático é baseado no princípio de interação específica entre antígeno e anticorpo. Anticorpo purificado encontra-se ligado à superfície interna de cada microcavidade da microplaca. O antígeno biotinilado e o antígeno não-biotinilado (serotonina da amostra) competem por um número fixo de locais de ligação de anticorpos. A quantidade de antígeno biotinilado que se liga ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração da amostra. Quando o sistema está em equilíbrio, o antígeno biotinilado livre é removido por um passo de lavagem e o antígeno biotinilado ligado ao anticorpo é determinado usando a enzima fosfatase alcalina. A quantificação da amostra é realizada por meio da comparação entre a atividade enzimática da amostra com uma curva resposta preparada utilizando padrões conhecidos. A determinação foi realizada em duplicata. Os resultados são expressos em ng/ μ g de proteína.

5.5 *Análise Estatística*

Os resultados experimentais foram expressos como médias $\pm$ SEM. Para análise do peso corporal da lactação aos 180 dias de vida e da Tolerância à glicose (variáveis Grupos vs Tempo) foi utilizada a ANOVA Two Way, *Bonferroni's Post Test*. A deposição de tecido adiposo abdominal e o consumo de dieta padrão(kcal/g de peso corporal) aos 180 dias foram analisados pelo *Student's T test*. A ANOVA One-Way, *Bonferroni Post Hoc*, foi utilizada para análise dos dados referentes ao consumo de dieta hipercalórica, consumo alimentar na SCS, análise da expressão gênica hipotalâmica, níveis de triglicerídeos e colesterol, glicemia de jejum e área *under the curve*. Os tempos de alimentação, limpeza e descanso na SCS foram expressos em MD $\pm$ SEM. A significância estatística foi dada para $P < 0,05$. A análise dos dados foi realizada por meio do programa estatístico GraphPad Prism $^{\circledR}$ (Graph Pad Software, Inc, 2007).

6. RESULTADOS

Os resultados estão expressos sob a forma de dois artigos:

O primeiro tem como título **Neonatal Serotonin Reuptake Inhibition promotes Increased Hypothalamic Expression of 5-HT_{2C} and reduces Metabolic Indicators in Adult Rats** e foi submetido ao *Journal of Experimental Neurology*.

O segundo é intitulado **Neonatal Selective Serotonin Reuptake Inhibition exposure stimulates satiety state and c-Fos immunoreactivity in the Hypothalamus and Nucleus Tractus Solitarius of Adulthood Rats** e foi submetido à revista *Nutritional Research*.

6.1 Artigo 1

Neonatal Serotonin Reuptake Inhibition promotes Increased Hypothalamic Expression of 5-HT_{2C} and reduces Metabolic Indicators in Adult Rats

ABSTRACT: Serotonin is the key neurotransmitter in ontogenesis and morphofunctional maturation of the nervous system. The 5-HT also is intrinsically related to energy balance. This article verified the effects of neonatal serotonin reuptake pharmacological inhibition on food intake central control and biochemical metabolic indicators in adult rats exposed or not to hypercaloric diet. The *Wistar* pups received daily single dose of sterile saline 0.9% (C, NaCl 0.9%, 1 µl / g, sc) or fluoxetine solution (F, 10mg/kg, 1 µl / g bw, sc) from 1st to 21st days PND. For each experiment were used, randomly, only two animals of each nurse (one of each group) to minimize genetic interference on results. The animals remained on diet *ad libitum* conditions up to 180 days. Since 180th PND, animals from C (n=10) and F (n=10) groups were euthanized for analysis of baseline gene expression and phenotypic characteristics. Another group of animals was submitted to hypercaloric diet for five weeks, constituting groups Cdiet (Cd, n=8) and Fdiet (Fd, n=8) (two from each group/nurse). We analyzed body weight, food intake, abdominal white tissue deposition, RNA expression of hypothalamic 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}, NPY and POMC, glucose tolerance and plasma levels of triglycerides and cholesterol before and after chronic hypercaloric diet. Animals treated with Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) during the neonatal period presented, in adulthood, lower body weight and food intake than controls. After feeding with hypercaloric diet, the animals in the Cd and Fd showed food consumption and weight gain equivalent. However the group Fd accumulated 64.32% of abdominal white adipose tissue in relation to F versus 100.96% Cd accumulation of in relation to C. Hypothalamic 5-HT_{2C} receptor expression was lower in rats exposed to neonatal serotonin reuptake inhibition (C= 1,08±0,02 vs F=0,8±0,04, n=4) (P<0,001). After overload energy, the group exposed to hypercaloric diet increased 5-HT_{2C} receptor mRNA expression compared with C group exposed to higher energy demand (Cd=1,06±0,03 vs *Fd=1,23±0,01, n=4, P<0,01) and Fluoxetine group (F=0,8±0,04 vs *Fd=1,23±0,01, n=4) (P<0,0001). The animals treated with SSRI during lactation also had lower fasting glucose levels and smaller increase in plasma cholesterol levels. The organisms submitted to neonatal serotonin inhibition had fewer phenotypic changes when exposed to hypercaloric demand in adulthood. Perhaps the greater availability of extracellular serotonin in the neonatal period and the change in gene expression of hypothalamic 5-HT_{2C} receptor is associated with phenotypic changes observed.

KEY WORDS: SSRI, Phenotypic Plasticity, Metabolic Syndrome, 5-HT_{2C}

INTRODUCTION

The serotonin (5-HT or 5-hydroxytryptamine) influence the expression of various genes and it makes this neurotransmitter an important factor for both development and plastic changes in living organism (Turlejski 1996). In mammalian, 5-HT appears early in ontogeny, and besides being indispensable to nervous system morphological and functional development it coordinates and integrates other physiological systems (Daws and Gould, 2011) being the structural basis of behavior. In rats, the profusion connections from neurotransmission serotonergic system and the activity of 5-HT in the brain are significant until 21st day after birth (Whitaker-Azmitia, 2005). Thus, perinatal insults during this vulnerable period may interfere on the neural circuits of development and reverberate on the control of complex behaviors (Turlejski 1996; Vitalis, Cases et al. 1998; Gingrich and Hen 2001; Whitaker-Azmitia 2001; Maciag, Simpson et al. 2006; Homberg, Olivier et al. 2011; Harris, Maciag et al. 2012; Germano, de Lima et al. 2013). The response to different environmental conditions during development can result in a range of distinct phenotypes (morphological or physiological states) potentially expressed by a genotype that is called phenotypic plasticity (West-Eberhard 2005; Gluckman, Lillycrop et al. 2007; Low, Gluckman et al. 2011). For example, several drugs that act on serotonin receptors or transporters (SERT or 5-HTT), if used during the perinatal period, appear to cause structural, physiological and behavioral phenotypic changes (Shuey, Sadler et al. 1993; Moiseiwitsch and Lauder 1995).

Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) act on the SERT for increasing the availability of serotonin in the synaptic cleft. Those drugs are used to treat behavioral and feeding disorders, including during pregnancy, lactation and infancy in humans (Weissman, Levy et al. 2004; Narboux-Neme, Pavone et al. 2008; Velasquez, Goeden et al. 2013). In mice, SSRIs inhibit depressive-like and anxiogenic-like behaviors in adults, while in neonates, these drugs promote behavioral problems until adulthood (Holmes, Murphy et al. 2003; Lira, Zhou et al. 2003). Also in neonatal mice, the use of clomipramine, potent SSRI, permanently reduces expression of the enzyme Tryptophan Hydroxylase 2 (TpH₂), which reduces permanently the serotonin production (Maciag, Simpson et al. 2006). These evidences suggests the existence of a critical period into which the increase of 5-HT by pharmacological inhibition can cause permanent changes (Borue, Chen et al. 2007).

Known as key hypothalamic peptides for food intake control, the POMC (melanocortins protein precursor) is associated with inhibition of food intake (Vergoni, Poggioli et al. 1986) while NPY is a potent orexigenic agent (Levine and Morley 1984). The

hypothalamic neurons that express POMC and NPY have serotonergic innervation that acts on them through 5HT_{2C} and 5HT_{1B} receptors. Serotonin promotes depolarization of POMC neurons through receptor 2C, and hyperpolarization of NPY neurons by acting on 1B receptors (Heisler, Jobst et al. 2006). The result is the characteristic hypophagic effect of 5-HT. At the hypothalamus, the serotonin receptor over expressed is the 5-HT_{2C} (Yadav, Oury et al. 2009). Knockout mice for 5-HT_{2C} receptor exhibit hyperphagia, chronic disturbances in metabolic rate, changes in hormones related to energy metabolism, increased consumption of dietary lipid and model of circadian Night-Eating syndrome, similar to that found in human obesity (Lam, Przydzial et al. 2008; Thomsen, Grottick et al. 2008; Hurren and Berlie 2011).

Our research group postulates a prominent role of the serotonergic neurotransmitter system on the underlying mechanisms phenotypic plasticity (Mendes-Da-Silva, De Souza *et al.*, 2002; Deiro, Manhaes-De-Castro *et al.*, 2004; Deiro, Manhaes-De-Castro *et al.*, 2006; Silva, Goncalves *et al.*, 2010). Preliminary evidence suggests that the metabolic syndrome may be associated with decreased serotonin function (Muldoon, Mackey et al. 2004; Muldoon, Mackey et al. 2006). The metabolic syndrome is characterized by glucose intolerance, hypertension and dyslipidemia (Barker and Clark 1997; Gluckman and Hanson 2004; Remacle, Bieswal et al. 2004). At this work, we investigated the effects of neonatal selective serotonin reuptake inhibition on feeding behavior and metabolic parameters in adult rats. Neonatal rats treated with SSRI had lower body weight and lower food consumption in adulthood. Interestingly, when subjected to hypercaloric diet accumulated proportionally less abdominal fat, although have obtained similar weight gain and consumption to untreated animals. The higher caloric demand among rats treated during the neonatal period with SSRI also seems to be associated with increased hypothalamic 5-HT_{2C} receptor, lower blood glucose and a smaller increase in plasmatic cholesterol. Thus, rats treated with SSRI during lactation appear to have plastic adaptation to the energy demand in adulthood.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experimental procedures obeyed the norms of handling, care and experimentation with animals that were established by National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals/ Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation of the Centro de Ciências Biológicas from Federal University of Pernambuco (protocol number 305/2010).

Virgin female *Wistar* rats weighting 220-250g were obtained from Nutrition Department –Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. The rats were housed under a 12:12h light–dark inverted cycle (lights on at 6:00p.m.) at a temperature of $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. Balanced commercial food pellets (Labina-Purina Brasil®) and water were provided *ad libitum*. O 1st PND litters were composed by the nurse plus 8 *Wistar* male pups weighting between 6 and 7g. In each litter, half of the pups composed the Control Group (C) and half the Fluoxetine Group (F). The groups received, respectively, sterile saline (C, 1 μ l/g, s.c.) or fluoxetine (F, 10 mg/kg, 1 μ l/g, s.c.). Each group received daily subcutaneous treatment, between 7:00 and 8:00 a.m. During the suckling period (from the 1st to the 21st) (Silva, Goncalves et al. 2010). Weaning was at 22nd postnatal day (Silva, Goncalves et al. 2010). Fluoxetine was obtained in the salt form (Fluoxetine Hydrochloride, Bristol, USA) and dissolved and diluted in saline. We used only two animals per litter (one animal per group) by each experiment to minimize interference in the genetic results.

First Experiment:

Since weaning until 170th, the rats were maintained into coletive cages with 2 or 3 animals under standart vivarium conditions, with water and chow *ad libitum*. Since 170th postnatal day until the end of the study, the animals were acclimatized in standart polipropilene cages (45x30x20 cm) with wood chip bedding, one per cage. So they still could see, hear and smell their conspexives in adjacent cages and were therefore not socially isolated (Rodgers, Holch et al. 2010). The experiments were performed between the ages of 180 to 200 PND.

Mensurement of body weight and food intake

The body weight of each animal was measured daily during lactational period and on the 30th, 60th, 90th, 120th, 150th and 180th postnatal days (Deiro, Manhaes-de-Castro et al. 2006; Silva, Goncalves et al. 2010). Since 180th postnatal day, after ten days habituation period, during with the animals attained a stable pattern of feeding, food intake was monitored every day, each 24 hours, during three consecutive days. The daily chow food consumption was determined at 24 hour intervals by measuring the difference between the amounts of pellet-food provided at 7:00 a.m to 7:00 a.m of the next day. The daily consumption of chow diet was given by the average consumer for three consecutive days.

Glucose Tolerance Test (GTT)

After fasting for 12 hours, at 185th PND, the animals were submitted to the first blood sample (time 0), by cutting a little the animal tail, to remove an aliquot of 10µl. Then was administered intraperitoneally (i.p.), a solution of 50% glucose (Equiplex Indústria Farmacêutica Ltda., Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) at 1 mg/g of body weight. Other blood samples were collected at 15, 30, 60, 90 and 120 minutes after intraperitoneal glucose. The analysis of the concentration of glucose in each of these times was performed using commercial apparatus (Accutrend Check – Roche®) (Fidalgo, Falcao-Tebas et al. 2012). Using the glycemia from each time was calculated the area under the curve (Le Floch, Escuyer et al. 1990).

Gene Expression in Hypothalamus

At 180 days of life, between 7:00 and 8:00 a.m. to avoid differences related to the light cycle, the animals were decapitated. The trunk blood was collected for plasma analysis. The brains were immediately dissected, rapidly frozen into chopped dry ice and stored in deep freezer (-80°C). Quantitative real time PCR experiments were conducted on RNAs extracted from whole hypothalamus. Total RNA was extracted using 1 mL Trizol reagent (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) with a homogenizer (Pellet Pestle with Cordless Motor, Fisher Scientific, USA). Total RNA was isolated following the manufacturer's suggested Invitrogen protocol and subsequently the quantity and quality of the purified RNA was evaluated using a NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). After, the RNAs was treated with gDNA Wipeout Buffer (Qiagen®, Hilden, Germany) to effectively to remove contaminating genomic DNA for 2 min at 42 °C, and stored on ice. Afterwards, 2.0 (g of purified RNA was reversed transcribed using QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen®, Hilden, Germany) at 42°C for 15 min and the enzyme was inactivated at 95°C for 3 min, in a total volume of 20/1 in RNase free water. cDNA preparation was then stored at -20°C until further use. Thereafter, 5/1 of each cDNA diluted sample was used as template for PCR amplification using SYBR Green (Qiagen®, Hilden, Germany) as fluorogenic intercalating dye and Real-Time PCR detection system instrument from Rotor Gene HRM-2Plex (Qiagen®, Hilden, Germany). PCR parameters were: an initial denaturation step of 5min at 95 °C followed by 45 cycles of 5s at 95 °C, and 10 s at 60 °C. The primers used for the amplification are presented in Table 1.

Table 1: Sequences of primers used for the real-time PCR analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer	Gene bank
NPY	GTGGACTGACCCTCGCTCTATC	ATGAGATTGATGTAGTGTGCGCAGA	M20373
POMC	GAGGTAAAGGAGCAGTGAATAAGA	GTAGCAGAATCTCGGCATCTTCC	NM_033650
5HT1b	ATGGAGGAGCAGGGTATTCAGTG	TGGGAGAGGTTGGCGAGAGG	RGD:2846
5HT2c	GGGTTGCTGCCACTGCTTTG	GCTCTCGCTTACACACTACTAATCC	RGD:2848
®-ACTIN	ACGGTCAGGTCATCACTATCG	CAGCACTGTGTTGGCATAGAG	EF156276.1

Sample cycle threshold values were determined from plots of normalized fluorescence versus PCR cycle number during exponential amplification. Standard curves for all primer amplifications were generated by plotting average cycle threshold values against the logarithm of the quantity of target template molecules. All quantitations were normalized to the house-keeping gene (®-actin). The relative quantitation value of each target gene was analyzed using a comparative CT method (Livak and Schmittgen 2001). The following formula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) was used to calculate the relative amount of the transcript in the sample and normalized to an endogenous reference (®-actin): $2^{-\Delta\Delta CT}$, where ΔCT is the difference in CT between the gene of interest and ®-actin, and $\Delta\Delta CT$ for the sample = mean ΔCT of the sample - mean ΔCT of the control sample (used as calibration).

Biochemical Analyses and Abdominal Fat Mensuration

Trunk blood collected after decapitation was used for triglycerides and cholesterol analysis by colorimetric tests from Roche Diagnosis – Brazil ® (Samuelsson, Matthews et al. 2008). The mesenteric abdominal fat was collected and its weight was measured.

Second Experiment:

Since 170th postnatal day until the end of this experiment, the animals was acclimatized in standart polipropilene cages (45x30x20 cm) with wood chip bedding, one per cage. After ten days of adaptation, the rats were submitted to 5 weeks of hypercaloric pellet diet (421,4 Kcal/100g) (Alsio, Olszewski et al. 2010).

After receive hypercaloric diet, the animals from C and F groups were called Cdiet and Fdiet. This second experiment were analyzed: body weight gain weekly, glucose tolerance, gene expression of hypothalamic NPY, POMC, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}; quantification of abdominal adipose tissue and plasma levels of triglycerides and cholesterol. The method for these analyzes was described in the previous experiment.

Statistical Analysis

The experimental results were expressed as means $\pm$ SEM. The statistical body weight and food intake (kcal / g of body weight) differences between the groups were given, respectively, by ANOVA Two Way and Student's t-test before diet. The Two-Way ANOVA was also used to analyze the GTT using as variables Groups vs Time. The deposition of abdominal adipose tissue was analyzed by Student's t-test. For analysis of RNAm expression, blood metabolites, fasting glucose and area under the curve was used ANOVA One-Way, *Bonferroni's Post Hoc*. Statistical significance was given for $P < 0.05$. Data analysis was performed using the statistical programme GraphPad Prism ® (Graph Pad Software, Inc, 2007).

RESULTS

Body Weight

The ANOVA showed that the Fluoxetine Group animals had lower body weight than Control Group animals from 7th PND until adulthood ($P < 0.0001$) (Figure 1A). After receiving environmental stimuli with hypercaloric diet, the group pharmacologically manipulated during lactation continued with lower body weight every week showing interaction between diet and time [$F(1,65) = 169.9$]. However, the percentage of weight gain during this period was similar between groups (Figures 1B and C).

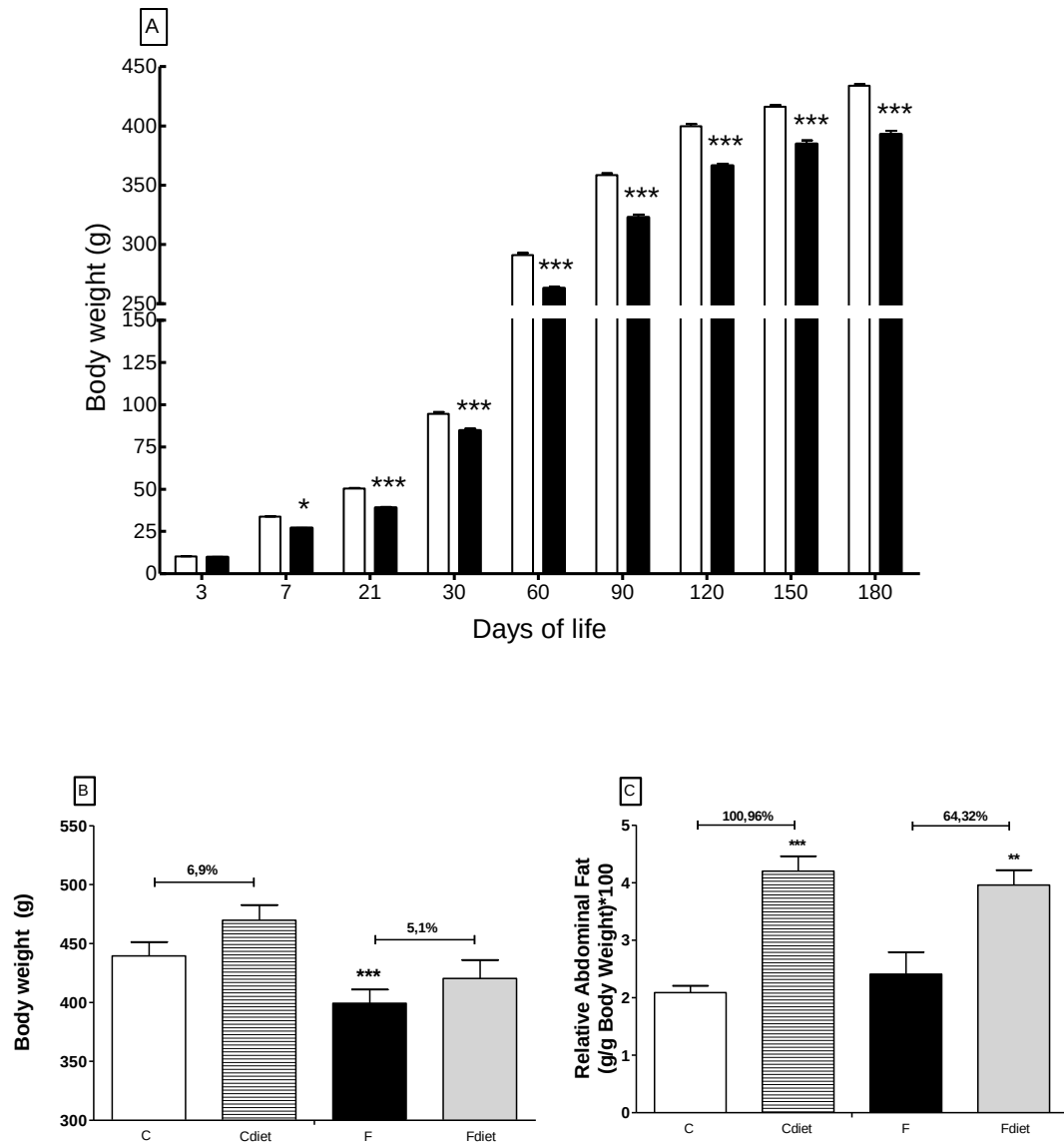


Figure 1: Effect of neonatal selective serotonin reuptake inhibition treatment on the Body Weight (A), Body weight before and after hypercaloric diet (B) and Relative Abdominal Fat Amount before and after hypercaloric diet (C). The rats were treated during lactation with saline sterile 0,9% (C, n=10, NaCl0,9%, 1µl/g, s.c) or fluoxetine (F, n=10, 10mg/Kg, 1µl/g B.W, s.c). Since 180th PND, the groups received five weeks of hypercaloric diet and were denominated Cdiet and Fdiet. A: ANOVA Two-Way, Bonferroni's Post Test. B and C: ANOVA One Way, Bonferroni Post Test. *P=0.01; **P=0,001***P=0,0001.

Chow and Hypercaloric Food Intake

Fluoxetine group had lower dietary intake of the standard diet at 180th PND (C=27,20±0,7 vs F=22,3±0,3) (n=10) (Figure 2A). The total consumption of hypercaloric during five weeks wasn't different between groups (Figure 2B).

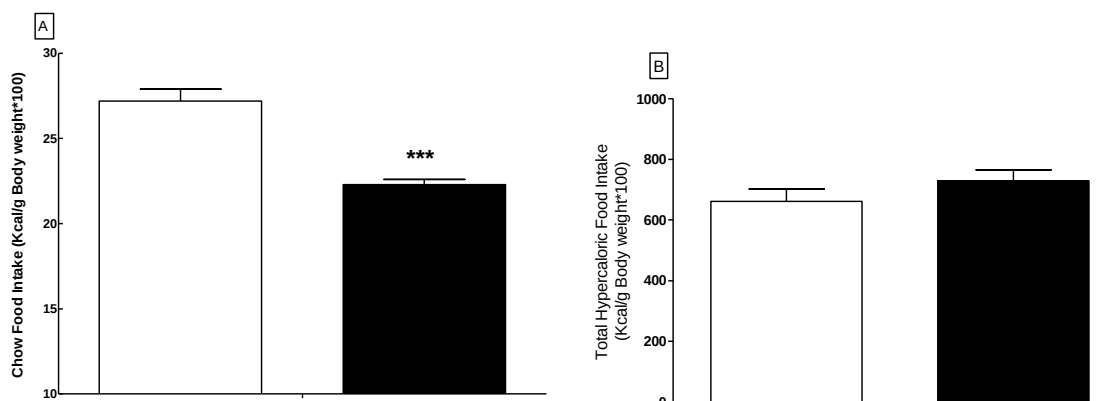


Figure 2: Chow Diet Intake (A) and Total Hypercaloric Intake (B) in adult rats. The rats were treated during lactation with saline sterile 0,9% (C, n=10, NaCl0,9%, 1 μ l/g, s.c) or fluoxetine (F, n=10, 10mg/Kg, 1 μ l/g B.W, s.c). Since 180th PND, the groups received five weeks of hypercaloric diet and passed up call Cdiet and Fdiet. T'test Student. ***P<0,0001. C and F (n=10/group); Cdiet and Fdiet (n=8/group).

Gene Expression in the Hypothalamus

A ANOVA *One-Way* showed a significant effect of chronic exposure to high calorie diet on hypothalamic NPY RNAm expression [$F(3,91)=42,3$] e 5-HT_{2C} [$F(3,91)=42,5$] in adult rats submitted or not to pharmacological serotonin at neonatal period. Regarding NPY (*Bonferroni Post Test*) Control Group got higher RNAm expression than both Cd and F groups ($C=1,06\pm0,00$ vs $Cd=0,95\pm0,03$, n=4) ($P<0,001$) ($C=1,06\pm0,00$ vs $F=0,97\pm0,01$, n=4) ($P<0,01$). After receiving hypercaloric diet the Control Group expressed more RNAm NPY than Fd ($C=1,06\pm0,00$ vs $Fd=0,8\pm0,01$, n=4) ($P<0,0001$). The animals from Fluoxetine Group reduced the genic expression of this orexigenic peptide after feeding with high calorie diet ($F=0,97\pm0,01$ vs $Fd=0,8\pm0,01$, n=4, $P<0,0001$).

Post Hoc analysis of RNAm 5-HT_{2C} hypothalamic expression showed lower expression of this receptor in animals that were treated with fluoxetine compared to the Control Group ($C=1,08\pm0,02$ vs $F=0,8\pm0,04$, n=4) ($P<0,001$). After eaten five-week of hypercaloric diet, the animals treated with SSRI during the neonatal period showed highest expression of the RNAm 5-HT_{2C} receptor compared with the control group fed the same diet ($Cd=1,06\pm0,03$ vs $Fd=1,23\pm0,01$, n=4) ($P<0,01$). The hypothalamic receptor 5-HT_{2C} still showed higher expression in Fluoxetine Group after chronic dietary stimuli compared to the Fluoxetine Group ($F=0,8\pm0,04$ vs $Fd=1,23\pm0,01$, n=4) ($P<0,0001$) (Figure 3).

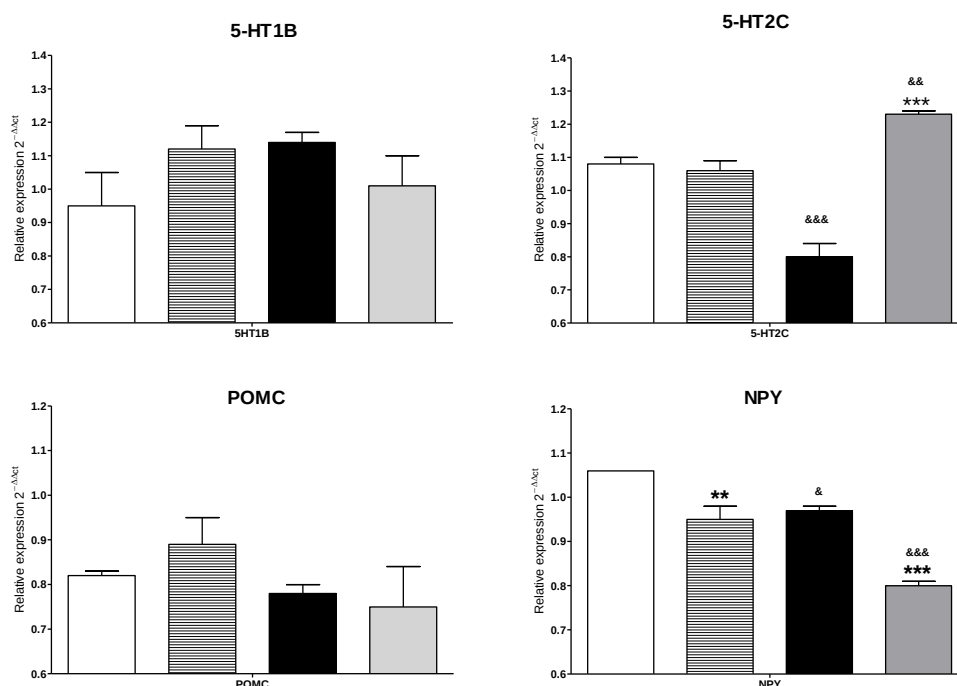
Galindo, LCM

Figure 3: Relative amount of hypothalamic RNAm 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}, NPY and POMC in adult rats. The rats were treated during lactation with saline sterile 0,9% (C, n=4, NaCl0,9%, 1μl/g, s.c) or fluoxetine (F, n=4, 10mg/Kg, 1μl/g B.W, s.c). Light bars represent the Control Group (C) and black bras represent the Fluoxetine Group (F). The striped bars represent the fluoxetine group after hypercaloric diet exposure (Cd) and gray bars represent fluoxetine group after hypercaloric exposure (Fd). The pairs of columns represent the expression of mRNA relative levels of 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}, NPY and POMC to endogenous β-actin amplified in the same sample under the same experimental conditions. Each pair of columns represents MD ± SEM of 4 different samples of mRNA. The analyzis were made in triplicates and there was less than 5% variation among the values obtained. ***P<0,0001: Intragroup diference; &&& P<0,0001: Intergroup diference. ANOVA One Way, Bonferroni's Post Hoc.

Biochemical Analyzes

In the glucose tolerance test, the ANOVA Two-Way identified interaction between groups C, F, Cd and [F(3,15)= 3,56] (P<0,0001). The *Bonferroni's Post Hoc* indicated the interaction among the groups C and F vs Cd vs Fd at 15 and 30 minutes after glucose injection [F(3,192)=20,12] (Figure 4A). Animals submitted to serotonin reuptake pharmacological inhibition had lower fasting glucose than the Control Group (C=93,0± 4,10, n=10 vs F=85,7±2,63, n=10, P<0,001) (Figure 4C). Upon exposure to hypercaloric diet, the Control Group increased fasting glucose as Fluoxetine Group, after dietary exposure, did not appear different from its control (C=93,0± 4,10, n=10 vs Cd=109,13±6,5, n=8, P<0,01) (Figura 4C). The *Bonferroni Post Test* showed no difference between groups when evaluating the area under the curve (Figure 4B).

There were changes in the amount of plasma cholesterol and the relative abdominal after five weeks of hypercaloric diet. The amount of triglycerides did not differ between groups. The ANOVA *One Way* showed interaction between calorie diet and plasma cholesterol levels [$F(3,65)=12,72$] (Table 2).

Table 2: Metabolic parameters after five weeks of palatable food in adulthood rats

PLASMA ANALYSIS	Control	Cdiet	Fluoxetine	Fdiet
Triglycerides (mg/dL)	60,12± 3,35	66,21±9,98	66,16±2,88	79,76±12,02
Colesterol (mg/dL)	33,64±0,88	54,66±4,24 ^{***}	30,81±1,39	39,94±3,86 ^{&}

*C vs Cd***P<0,0005; Cd vs Fd[&]P<0,05, One Way ANOVA, Bonferroni's Post Hoc.*

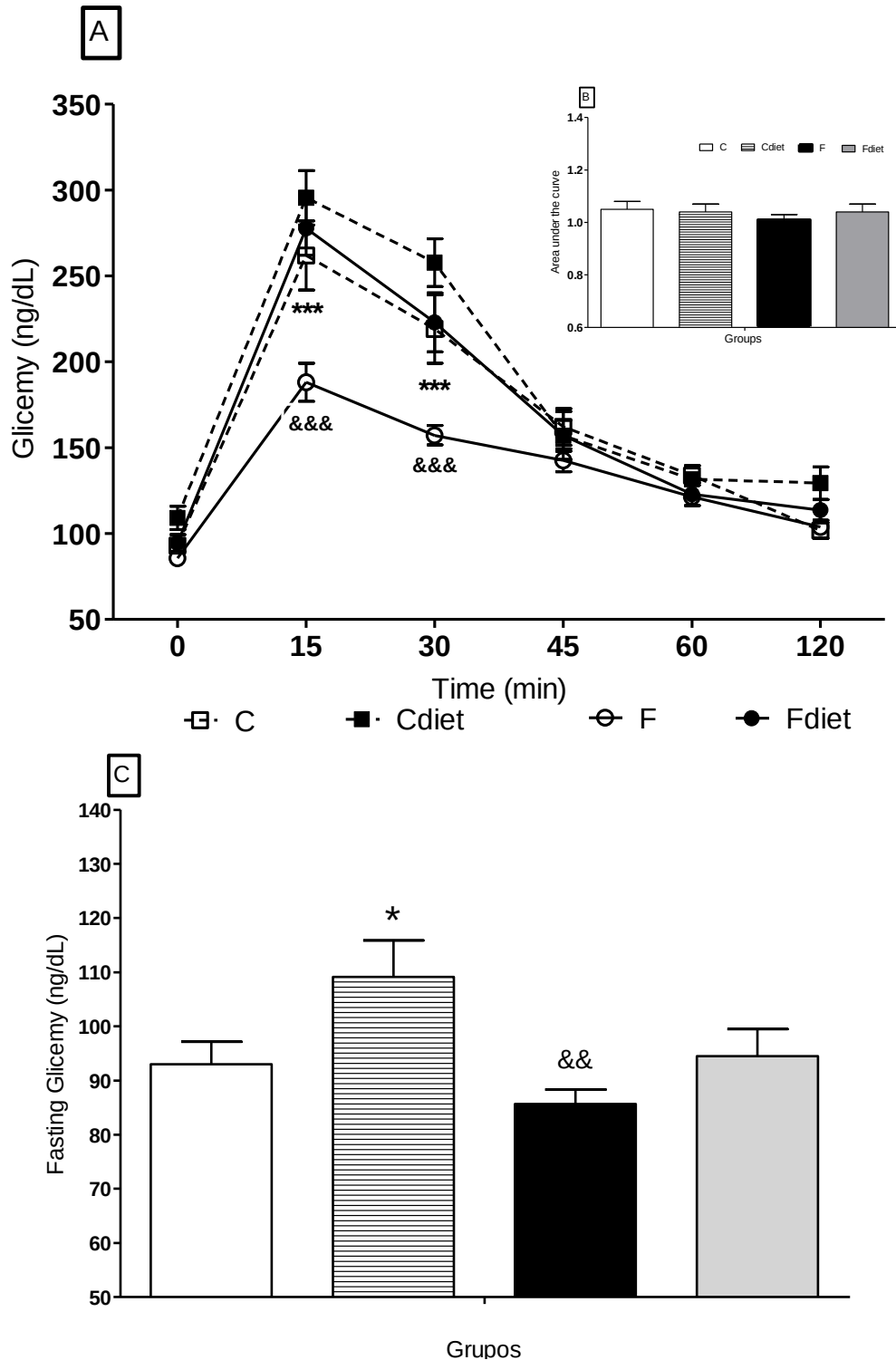


Figure 4: Glucose Tolerance Test (A); Fasting Glucose (B) and Area Under the Curve (C) in adult rats that experienced serotonergic system neonatal pharmacological manipulation. The rats were treated with saline (C, n = 10, NaCl 0.9%, 1 µl / g, s.c.) or fluoxetine (F, n = 10, 10 mg/kg, 1 µl/g b.w., s.c.). Bars and light squares represent the Control Group (C); black bars and white circles, the Fluoxetine Group (F); streaked bars and black squares, the control group after hypercaloric exposure (Cd, n = 8); gray bars and black circles, fluoxetine group hypercaloric exposure (Fd, n = 10). The hypercaloric diet was offered during five weeks. The GTT was performed after fasting 12 hours. * Indicates intragroup difference. & Indicates intergroup difference. ANOVA Two Way (A); ANOVA One Way (B and C). Bonferroni's Post Test.

DISCUSSION

The environment surrounding the nervous system critical periods of development can induce long lasting morphological and functional phenotypic adjustments (Resnick, Miller et al. 1979). The neonatal serotonin reuptake inhibition, by pharmacological way, was the environmental factor aim of this study. We observed that late phenotypic adaptations were expressed in the form of reduced body weight and food consumption in adulthood. To understand the possible mechanisms underlying these morphological and functional modifications, we analyze some key factors involved in the control of food intake further biochemical and phenotypic referentials. We verified that the mRNA expression of hypothalamic serotonin 5-HT_{2C} receptor and orexigenic peptide NPY were reduced in adult animals handled during the neonatal period. Peripheral metabolism indicators as plasma cholesterol and triglycerides weren't altered and fasting glucose presented decreased. To verify the phenotypic adaptations of adult animals after the overload energy, was offered them hypocaloric diet during five weeks. After energetic overload, happened an increase in gene expression of 5-HT_{2C} receptor and a reduction in NPY gene expression in rats with previous history of SERT inhibition. These animals also were more plastics in relation to blood glucose and cholesterol showing that this experimental model promoted phenotypical adaptation to overload energetic environment in adulthood.

Neste estudo, a inibição farmacológica da recaptação da serotonina promoveu menor peso corporal até a idade adulta. Frente à sobrecarga energética os animais manipulados farmacologicamente não ganharam peso em demasia. Nosso grupo de pesquisa tem verificado that lower body weight is characteristic of animals submitted to pharmacological serotonin reuptake inhibition during lactation (Mendes-da-Silva, de Souza et al. 2002; Deiro, Manhaes-de-Castro et al. 2004; Deiro, Manhaes-de-Castro et al. 2006; Silva, Goncalves et al. 2010). However, other studies report no body weight changes in organisms submitted to SERT inhibition or depletion of protein transport gene (Homberg, la Fleur et al. 2010; Kummet, Haskell et al. 2012). A recent study suggests that rats treated with fluoxetine from 8th to 21st PND present hypermetabolic state characterized by maintenance of body weight and increased food and oxygen consumption (VO₂). A maior disponibilidade neonatal de serotonina talvez tenha favorecido a adaptação do peso corporal ao longo da vida dos animais mesmo após sobrecarga energética.

When we submitted the animals to increased caloric intake environment for five weeks, both groups had increase abdominal fat deposition. However, the accumulation of

abdominal fat was about 36% lower in animals subjected to SERT pharmacological neonatal inhibition. The opposite was observed in SERT knockout female rats that showed higher accumulation of white adipose tissue and less body weight than the female SERT^{+/+} after high-fat and high-sugars diet (Homberg, la Fleur et al. 2010). In our experimental model, neonatal exposure to higher levels of extracellular serotonin may have facilitated the lipogenic action of insulin in preadipocytes as proposed by Gres (2013) (Gres, Canteiro et al. 2013). This could explain the lower fat percentage found in our experimental model. The diversity of serotonergic receptors may be the basis for differences in the 5-HT action. Knockout mice for the 5-HT_{2C} receptor are more likely to increase in body weight and development of obesity (Tecott 2007). The 5-HT_{2C} receptor is directly involved with energy metabolism being pathway of melanocortinergetic system component (Heisler, Cowley et al. 2003; Heisler, Jobst et al. 2006; Lam, Garfield et al. 2010). As the mRNA expression of this receptor presented increased in adult animals treated pharmacologically during lactation is possible to associate the balance between weight / food consumption and lower fat deposition to the increased expression of hypothalamic 5-HT_{2C} receptor.

In the present study, adult rats submitted to neonatal treatment with SSRI had lower chow intake and lower hypothalamic RNAm expression of NPY and 5-HT_{2C}. After five weeks of hypercaloric diet, the animals treated pharmacologically during lactation, decreased the gene expression of NPY and increased expression of hypothalamic 5-HT_{2C}. This finding suggests that SERT pharmacological inhibition is associated with increased activity of anorexigenic pathway and lower orexigenic pathway activity in adult rats that received higher energy demand. Chronic treatment with fluoxetine murine reduces the hypothalamic NPY mRNA in obese and lean rats, similar to the hypophagia induced response by dietary restriction in lean rats (Dryden, Frankish et al. 1996). As the Central Nervous System (CNS) serotonin levels further responding to specific pharmacological actions, respond to deficiency and excess of energy (Stunes, Reseland et al. 2011). Diets rich in sugars and lipids can alter the hypothalamic homeostatic control increasing hunger signals further blocking the satiety signals (Erlanson-Albertsson 2005). Hypercaloric diets, including, are associated with increased proliferation of hypothalamic neurons producing orexigenic peptides (Bouret, Gorski et al. 2008)) and decreased anorexic effects of serotonergic drugs (Foltin 2011). In this study, the neonatal serotonin increased availability by reuptake inhibition (Grove and Smith 2003) seems favorable to lower food intake by increasing mRNA expression of 5-HT_{2C} receptor. Since this receptor co-expressed in POMC neurons (Heisler, Cowley et al. 2003; Heisler, Jobst et al. 2006; Donovan and Tecott 2013) and, intrinsically, related to energy

balance we suggest that pharmacological inhibition of reuptake neonatal appears to play determinant role on serotonergic receptors distribution in various tissues which, together, can be related to phenotypic long-term characteristics observed in this study.

Peripherally, the neonatal reuptake serotonin inhibition caused a reduction in fasting glycemic and unaltered glucose tolerance, even after hypercaloric diet. Clinical and experimental research associate the use of serotonergic drugs such as fenfluramine, fluoxetine and sertraline to reducing fasting glucose, lower area under in GTT and, consequently, improved glucose tolerance (Arora, Dryden et al. 1994; Breum, Bjerre et al. 1995; Maheux, Ducros et al. 1997; Adeghate, Ponery et al. 1999; Ghaeli, Shahsavand et al. 2004; Weber-Hamann, Kopf et al. 2005; Hsiao, Chung et al. 2006; Lam and Heisler 2007). Specifically, the hypothalamic nuclei VMH, LHA and PVN are involved in both food intake and blood glucose regulation (Steffens, Scheurink et al. 1988) through neural connections with α and β pancreatic cells (Uyama, Geerts et al. 2004). Given the importance of serotonin at pancreatic cells development (Kim, Toyofuku et al. 2010) pregnant rats with decreased 5-HT production by tryptophan dietary restriction or tryptophan hydroxylase inhibition exhibited glucose intolerance by blocking expansion of pancreatic β -cells (Kim, Toyofuku et al. 2010). The same effect was observed by blocking the 5-HT_{2C} receptor in the pancreas (Kim, Toyofuku et al. 2010). At our study, the increased availability of extracellular serotonin by SERT pharmacological inhibition, although transient, triggered opposite effect promoted by the shortage of serotonin. The largest serotonergic tone during the neonatal period seems to have generated favorable adaptations in adulthood glucose homeostasis, even after contact with hypercaloric diet.

At our experimental model, the increased availability of extracellular serotonin by neonatal SERT inhibiting. In adulthood these animals showed a plastic phenotype related to plasmatic cholesterol levels as they were less oscillating after energetic overload. There wasn't influence of neonatal pharmacological manipulation neither dietary exposure on plasma triglycerides levels. Clinically, it was observed that fluoxetine decreased the plasma cholesterol and triglycerides in humans with depression and diabetes (Li, Chen et al. 2011; Shahsavand Ananloo, Ghaeli et al. 2013). Hypothalamic nuclei as VMH, LHA, and PVN, regulate glucose homeostasis and also act in regulating plasma levels of fatty acids (Steffens, Scheurink et al. 1988). In turn, the levels of plasma triglycerides are affected by expression of the 5-HT_{5A} receptor (Zhang, Smith et al. 2010). Leaving the central serotonergic pathway, it is noteworthy that peripheral serotonin is also associated with lipid metabolism (Watanabe, Rose et al. 2011). These authors support the hypothesis that the concentration of blood lipids

is homeostatically regulated by their uptake and release in various tissues through different serotonergic receptors. In this study, the pharmacological neonatal treatment was carried by subcutaneous way initiating changes in the availability of serotonin central and peripherally. The results suggest that this treatment seems to have been able to prevent the exaggerated increase in plasma cholesterol levels in adulthood.

Given the importance of 5-HT in mammalian ontogeny, we postulate that perinatal changes in the serotonergic system, are related to mechanisms underlying phenotypic plasticity. This study investigated whether the increased brain serotonergic tone during lactation could alter characteristics in phenotypic and genotypic control of feeding behavior and whether such changes are related to some biochemical parameters indicative of metabolic syndrome in adult rats exposed or not to hypercaloric diet. After energetic overload, pharmacologically treated rats during lactation showed better balance between body weight and consumption, lower abdominal fat deposition and increased expression of 5-HT_{2C} in response to increased energy demand. The higher expression of this receptor, intrinsically related to the melanocortin pathway, together with better adjustment in terms of blood glucose and cholesterol leads us to suggest that this organism is able to adapt better to higher energy demands.

REFERENCES

- ADEGHATE, E. et al. Distribution of serotonin and its effect on insulin and glucagon secretion in normal and diabetic pancreatic tissues in rat. *Neuro Endocrinol Lett*, v. 20, n. 5, p. 315-322, 1999.**
- ALSIO, J. et al. Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus accumbens upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats. *Neuroscience*, v. 171, n. 3, p. 779-87, Dec 15 2010.**
- ARORA, R. et al. Acute dexfenfluramine administration normalizes glucose tolerance in rats with insulin-deficient diabetes. *Eur J Clin Invest*, v. 24, n. 3, p. 182-7, Mar 1994.**
- BARKER, D. J.; CLARK, P. M. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod*, v. 2, n. 2, p. 105-12, May 1997.**
- BORUE, X.; CHEN, J.; CONDRON, B. G. Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies. *Int J Dev Neurosci*, v. 25, n. 6, p. 341-7, Oct 2007.**
- BOURET, S. G. et al. Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. *Cell Metab*, v. 7, n. 2, p. 179-85, Feb 2008.**

BREUM, L. et al. Long-term effects of fluoxetine on glycemic control in obese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus or glucose intolerance: influence on muscle glycogen synthase and insulin receptor kinase activity. *Metabolism*, v. 44, n. 12, p. 1570-6, Dec 1995.

DEIRO, T. C. et al. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiol Behav*, v. 87, n. 2, p. 338-44, Feb 28 2006.

DEIRO, T. C. et al. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. *Braz J Med Biol Res*, v. 37, n. 10, p. 1503-9, Oct 2004.

DONOVAN, M. H.; TECOTT, L. H. Serotonin and the regulation of mammalian energy balance. *Front Neurosci*, v. 7, p. 36, 2013.

DRYDEN, S. et al. The serotonergic agent fluoxetine reduces neuropeptide Y levels and neuropeptide Y secretion in the hypothalamus of lean and obese rats. *Neuroscience*, v. 72, n. 2, p. 557-66, May 1996.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, v. 97, n. 2, p. 61-73, Aug 2005.

FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. *Br J Nutr*, p. 1-8, May 1 2012.

FOLTIN, R. W. Consumption of palatable food decreases the anorectic effects of serotonergic, but not dopaminergic drugs in baboons. *Physiol Behav*, v. 103, n. 5, p. 493-500, Jul 6 2011.

GERMANO, P. C. et al. Hypercaloric high-lipid diet and brain development: Effects on cortical spreading depression in adult rats. *Nutr Neurosci*, Feb 16 2013.

GHAELI, P. et al. Comparing the effects of 8-week treatment with fluoxetine and imipramine on fasting blood glucose of patients with major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol*, v. 24, n. 4, p. 386-8, Aug 2004.

GINGRICH, J. A.; HEN, R. Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 155, n. 1, p. 1-10, Apr 2001.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab*, v. 15, n. 4, p. 183-7, May-Jun 2004.

GLUCKMAN, P. D. et al. Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 31, p. 12796-800, Jul 31 2007.

GRES, S. et al. Oxidation of high doses of serotonin favors lipid accumulation in mouse and human fat cells. *Mol Nutr Food Res*, Feb 6 2013.

GROVE, K. L.; SMITH, M. S. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav*, v. 79, n. 1, p. 47-63, Jun 2003.

HARRIS, S. S. et al. Dose-dependent effects of neonatal SSRI exposure on adult behavior in the rat. *Brain Res*, v. 1429, p. 52-60, Jan 6 2012.

HEISLER, L. K. et al. Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*, v. 994, p. 169-74, Jun 2003.

HEISLER, L. K. et al. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron*, v. 51, n. 2, p. 239-49, Jul 20 2006.

HOLMES, A.; MURPHY, D. L.; CRAWLEY, J. N. Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression. *Biol Psychiatry*, v. 54, n. 10, p. 953-9, Nov 15 2003.

HOMBERG, J. R.; LA FLEUR, S. E.; CUPPEN, E. Serotonin transporter deficiency increases abdominal fat in female, but not male rats. *Obesity (Silver Spring)*, v. 18, n. 1, p. 137-45, Jan 2010.

HOMBERG, J. R. et al. Fluoxetine exerts age-dependent effects on behavior and amygdala neuroplasticity in the rat. *PLoS One*, v. 6, n. 1, p. e16646, 2011.

HSIAO, S. H. et al. Chronic fluoxetine administration desensitizes the hyperglycemia but not the anorexia induced by serotonin in rats receiving fructose-enriched chow. *Neurosci Lett*, v. 404, n. 1-2, p. 6-8, Aug 14 2006.

HURREN, K. M.; BERLIE, H. D. Lorcaserin: an investigational serotonin 2C agonist for weight loss. *Am J Health Syst Pharm*, v. 68, n. 21, p. 2029-37, Nov 1 2011.

KIM, H. et al. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med*, v. 16, n. 7, p. 804-8, Jul 2010.

KUMMET, G. J. et al. Neonatal SSRI Exposure Programs a Hypermetabolic State in Adult Mice. *J Nutr Metab*, v. 2012, p. 431574, 2012.

LAM, D. D. et al. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 97, n. 1, p. 84-91, Nov 2010.

LAM, D. D.; HEISLER, L. K. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. *Expert Rev Mol Med*, v. 9, n. 5, p. 1-24, 2007.

LAM, D. D. et al. Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. *Endocrinology*, v. 149, n. 3, p. 1323-8, Mar 2008.

LE FLOCH, J. P. et al. Blood glucose area under the curve. Methodological aspects. *Diabetes Care*, v. 13, n. 2, p. 172-5, Feb 1990.

LEVINE, A. S.; MORLEY, J. E. Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides*, v. 5, n. 6, p. 1025-9, Nov-Dec 1984.

LI, Q. et al. Metabolic effects of bariatric surgery in type 2 diabetic patients with body mass index < 35 kg/m². *Diabetes Obes Metab*, v. 14, n. 3, p. 262-70, Mar 2011.

LIRA, A. et al. Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry*, v. 54, n. 10, p. 960-71, Nov 15 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LOW, F. M.; GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental plasticity and epigenetic mechanisms underpinning metabolic and cardiovascular diseases. *Epigenomics*, v. 3, n. 3, p. 279-94, Jun 2011.

MACIAG, D. et al. Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry. *Neuropsychopharmacology*, v. 31, n. 1, p. 47-57, Jan 2006.

MAHEUX, P. et al. Fluoxetine improves insulin sensitivity in obese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus independently of weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 21, n. 2, p. 97-102, Feb 1997.

MENDES-DA-SILVA, C. et al. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 60, n. 4, p. 928-31, Dec 2002.

MOISEWITSCH, J. R.; LAUDER, J. M. Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, n. 16, p. 7182-6, Aug 1 1995.

MULDOON, M. F. et al. The metabolic syndrome is associated with reduced central serotonergic responsivity in healthy community volunteers. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 91, n. 2, p. 718-21, Feb 2006.

MULDOON, M. F. et al. Low central nervous system serotonergic responsivity is associated with the metabolic syndrome and physical inactivity. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 89, n. 1, p. 266-71, Jan 2004.

NARBOUX-NEME, N. et al. Serotonin transporter transgenic (SERT^{cre}) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). *Neuropharmacology*, v. 55, n. 6, p. 994-1005, Nov 2008.

REMACLE, C.; BIESWAL, F.; REUSENS, B. Programming of obesity and cardiovascular disease. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v. 28 Suppl 3, p. S46-53, Nov 2004.

RESNICK, O. et al. Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 3, n. 4, p. 233-46, Winter 1979.

RODGERS, R. J.; HOLCH, P.; TALLETT, A. J. Behavioural satiety sequence (BSS): separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 97, n. 1, p. 3-14, Nov 2010.

SAMUELSSON, A. M. et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*, v. 51, n. 2, p. 383-92, Feb 2008.

SHAHSAVAND ANANLOO, E. et al. Comparing the effects of fluoxetine and imipramine on total cholesterol, triglyceride, and weight in patients with major depression. *Daru*, v. 21, n. 1, p. 4, 2013.

SHUEY, D. L. et al. Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. *Anat Embryol (Berl)*, v. 187, n. 1, p. 75-85, Jan 1993.

SILVA, C. M. et al. Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. *Neurosci Lett*, v. 483, n. 3, p. 179-83, Oct 15 2010.

STEFFENS, A. B. et al. Hypothalamic food intake regulating areas are involved in the homeostasis of blood glucose and plasma FFA levels. *Physiol Behav*, v. 44, n. 4-5, p. 581-9, 1988.

STUNES, A. K. et al. Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation. *Diabetes Obes Metab*, v. 13, n. 6, p. 551-8, Jun 2011.

TECOTT, L. H. Serotonin and the orchestration of energy balance. *Cell Metab*, v. 6, n. 5, p. 352-61, Nov 2007.

THOMSEN, W. J. et al. Lorcaserin, a novel selective human 5-hydroxytryptamine_{2C} agonist: in vitro and in vivo pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 325, n. 2, p. 577-87, May 2008.

TURLEJSKI, K. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, v. 56, n. 2, p. 619-36, 1996.

UYAMA, N.; GEERTS, A.; REYNAERT, H. Neural connections between the hypothalamus and the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, v. 280, n. 1, p. 808-20, Sep 2004.

VELASQUEZ, J. C.; GOEDEN, N.; BONNIN, A. Placental serotonin: implications for the developmental effects of SSRIs and maternal depression. *Front Cell Neurosci*, v. 7, p. 47, 2013.

VERGONI, A. V.; POGGIOLI, R.; BERTOLINI, A. Corticotropin inhibits food intake in rats. *Neuropeptides*, v. 7, n. 2, p. 153-8, Feb-Mar 1986.

VITALIS, T. et al. Effects of monoamine oxidase A inhibition on barrel formation in the mouse somatosensory cortex: determination of a sensitive developmental period. J Comp Neurol, v. 393, n. 2, p. 169-84, Apr 6 1998.

WATANABE, H.; ROSE, M. T.; ASO, H. Role of peripheral serotonin in glucose and lipid metabolism. Curr Opin Lipidol, v. 22, n. 3, p. 186-91, Jun 2011.

WEBER-HAMANN, B. et al. Activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal system and oral glucose tolerance in depressed patients. Neuroendocrinology, v. 81, n. 3, p. 200-4, 2005.

WEISSMAN, A. M. et al. Pooled analysis of antidepressant levels in lactating mothers, breast milk, and nursing infants. Am J Psychiatry, v. 161, n. 6, p. 1066-78, Jun 2004.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. J Exp Zool B Mol Dev Evol, v. 304, n. 6, p. 610-8, Nov 15 2005.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. Brain Res Bull, v. 56, n. 5, p. 479-85, Nov 15 2001.

YADAV, V. K. et al. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. Cell, v. 138, n. 5, p. 976-89, Sep 4 2009.

6.2 Artigo 2

Title: Neonatal Serotonin Reuptake Inhibition increases Hypothalamic Serotonin Levels and antecipated responses of satiety in Adulthood Rats

ABSTRACT

Alterations in serotonergic system neurotransmission during the perinatal period are associated with morphological and functional adjustments in nervous system and behavioral changes in adulthood. Serotonin is a potent stimulator of satiety, acting in different brain regions, particularly in the nucleus of the solitary tract (NTS) and in the arcuate nucleus (Arc). The aim of this study was to analyze the effects of neonatal inhibition of serotonin reuptake on the expression of satiety in adult life. The *Wistar* rat pups received daily 0.9% sterile saline (C, n = 10, NaCl0, 9%, 1µl / g, sc) or fluoxetine solution (F, n=10, 10mg/kg, 1µl/g BW, s.c.) from 1st to 21st post natal day (PND). Each group received a single daily subcutaneous injection and were used only one or two animals from each group per dam per experiment. In adulthood, behavioral sequence of satiety after intraperitoneal acute dose of fluoxetine (10 mg/Kg; 1µl/g B.W., i.p.). Other experiment tested the *C-fos* protein expression in NTS and Arc after fasting followed by 90 minutes of chow food exposition. We also measured the hypothalamic serotonin levels by ELISA. The pharmacological inhibition of serotonin during the lactational period promoted anticipation of satiety, reduced food intake and less feeding duration in adult animals tested by BBS. In contrast, the neuronal immunoreactivity of NTS and arcuate nucleus in response to food stimuli evidenced by *C-fos* expression was higher in this group. The neonatal reuptake serotonin inhibiton exposure was associated with increased hypothalamic serotonin levels in adulthood rats. Taken together, the results of this study suggest that pharmacologic neonatal serotonin reuptake inhibition promotes both increased sensitivity to the onset of satiety with reduced meal size and higher neuronal feeding responsiveness. Behavioral and cellular changes observed in this study suggest long-term effects secondary to inhibition of selective serotonin reuptake inhibition during neonatal life. These findings support our hypothesis that early changes in the serotonergic system components are inducers of phenotypic plasticity.

Key words: Serotonin, SSRI, phenotypic plasticity, feeding behavior

INTRODUCTION

The selective serotonin reuptake inhibition is among the most common strategies for treating depression and anxiety-related disorders including during pregnancy, lactation and infancy (Homberg, Schubert et al. 2010). The use of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) increases the 5-HT permanence in the extracellular space by extra duration of your activity on the serotonergic pre (5-HT_{1A/1B}) and post (5-HT_{1A/2A/2C}) synaptic receptors (Homberg, Schubert et al. 2010). Because serotonin receptors mediate the action of this neurotransmitter and further exerts trophic role during the ontogenesis, the use of SSRIs during development can produce changes in transcriptional cellular and molecular mechanisms associated with plasticity (Krishnan and Nestler 2008). In addition, drugs that act on serotonin receptors or transporters 5-HT are used during the perinatal period and appear to cause structural changes in physiological and behavioral characteristics (Shuey, Sadler et al. 1993; Moiseiwitsch and Lauder 1995). According to the phenotypic plasticity perspective, early environmental conditions (e.g., malnutrition, tobacco, antigens and drugs) generate distinct phenotypes (morphological or physiological states) expressed by a potential genotype that can promote the onset of disease in adulthood life (Gluckman, Hanson et al. 2011).

Environmental factors that affect serotonergic signaling during nervous system ontogeny may modify the plasticity of the brain circuits (Bonnin, Torii et al. 2007, Silva, Goncalves et al. 2010) and behavioral expression in adult life (Ansorge, Zhou et al. 2004; Jacobsen Siesser et al. 2012). The feeding may be primarily considered a regulatory behavior with the function of supplying the body tissues energy needs (Lebrun, Bariohay and Jean, 2006). Eating behavior is expressed by the complex interaction between peripheral and central mechanisms that control hunger and satiety (York 1999). The BSS is produced by the presence of caloric load in the intestine (York 1999) and/or pre-absorptive satiety factors (Verbaeys, Leon-Tamariz et al. 2009). Studies have shown that BBS with the stroke-induced increase in the levels of 5-HT by administration of SSRI, reduces food intake without changing the duration of feeding, but increases the duration of the resting (Halford and Blundell 1996). In addition, fenfluramine a stimulating serotonin release and blocking the serotonin reuptake reduces both food consumption and feeding behavior duration and increases the resting duration (Hewitt, Lee et al. 2002). This shows that serotonin regulates feeding behavior stimulating satiety.

The hypothalamus and the brainstem are important mediators of the serotonergic effects on satiety and are considered centers for detection and response to signals of hunger and satiety. The NTS displays distinct neuronal populations that express Neuropeptide Y

(NPY) or Cocaine and Amphetamine Regulated Transcribed (CART) and proopiomelanocortin (POMC). NTS POMC neurons are activated by vagal afferents and circulating sacioenic inputs that contribute to limit intake (Appleyard, Bailey et al. 2005). The NTS relays visceral information to hypothalamic centers responsible for homeostatic control (Zhang, Fogel et al. 1999; Jiang, Fogel et al. 2003; Zhang, Cui et al. 2003). In the hypothalamus 5-HT hyperpolarizes and inhibits AgRP neurons promoting a reduction in the inhibition of POMC cells by 5-HT_{1B} receptors and simultaneously your action on 5-HT_{2C} receptors promotes the activation of POMC neurons. Thus the action of serotonin at the 5-HT_{1B} and 5-HT_{2C} receptors modulates food intake (Heisler, Jobst et al. 2006). In addition the hypothalamus, the brainstem is an important mediator of the serotonergic effects on satiety. Mice brainless reduces food intake in response to fenfluramine (drug that induces serotonin release and inhibits its recapture) (Grill et al. 1997; Kaplan, Donahey et al. 1997). Injection of fenfluramine or mCPP(?) induces an increase in the number of C-fos immunoreactive neurons (indicating neuronal activation) in regions of the brainstem, including the nucleus of the solitary tract (NTS) (Rowland, Robertson et al. 2001).

Our research group postulated a major role of the serotonergic neurotransmission system in the mechanisms underlying the phenotypic plasticity. We identified several effects of neonatal pharmacological inhibition of serotonin reuptake on morphological and behavioral characteristics in rats in adulthood (Mendes-da-Silva, de Souza et al. 2002; Deiro, Manhaes-de-Castro et al. 2004; Deiro, Manhaes-de-Castro et al. 2006; Silva, Goncalves et al. 2010). The aim of this study was to verify whether inhibition of serotonin reuptake neonatal promotes phenotypic changes on satiety, NTS and arcuate nucleus C-fos positive neurons after feeding and basal levels of hypothalamic serotonin in adulthood rats.

EXPERIMENTAL METHODS

Animals

All experimental procedures obeyed the norms of handling, care and experimentation with animals that were established by National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals/ Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation of the Centro de Ciências Biológicas from Federal University of Pernambuco (protocol number 305/2010).

Virgin female Wistar rats weighing 220-250g were obtained from Nutrition Department – Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. The rats were housed under a 12:12-h light–

dark inverted cycle (lights on at 6:00p.m.) at a temperature of $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. Balanced commercial food pellets (Labina-Purina Brasil®) and water were provided ad libitum. At the 1st postnatal day (P1), the litters were composed by the dam and eight pups male *Wistar* rats weighting between 6 and 7 g, were divided into two groups: Control (C) and Fluoxetine (F). Each group received a single daily subcutaneous (s.c.) injection of drug vehicle (sterile 0.9% saline 1 μ l/g) or fluoxetine (10 mg/kg, 1 μ l/g), respectively, at 7:00 a.m. during the suckling period (from the 1st to the 21st postnatal day) (Silva, Goncalves et al. 2010). Fluoxetine was obtained in the salt form (fluoxetine hydrochloride, Bristol, USA) and dissolved and diluted in saline. The concentration used in this study was determined in a previous study of dose–effect relationships. Pharmacological treatment was stopped at 21st postnatal day. The weaning was at 22nd postnatal day (Silva, Goncalves et al. 2010).

Serotonin Levels

At 180 days of age, was performed decapitation followed by rapid excision of brains and dissecting the hypothalamus. All animals were decapitated between 7:00 and 8:00am to prevent differences associated with circadian rhythm. The hypothalamus were immediately frozen on dry ice and stored in freezer at -80°C . The dosage of serotonin was performed after determination of the protein concentration by the Bradford method (Bradford 1976). The concentration of serotonin was determined by ELISA essay (ELISA - RE59121, IBL Hamburg, Germany). The analysis was performed in duplicate and the results were expressed in ng/mg protein.

Behavioral satiety sequence

The analysis of the BSS was performed at 180 days of life, as described by Halford (1998) (Halford, Wanninayake et al. 1998). On the test day, after three hours of fasting were offered 30g of standard diet for animals. From this moment, the duration was recorded (in seconds) of feeding behavior, cleaning and resting position during an hour. The test was conducted from 12:00 am to 1:00 pm (6 hours after onset of the dark phase of the cycle). The records were obtained through image capture system and recorded on computer. Only one investigator, without knowledge of experimental groups, watched the movies and recorded the results in a protocol. Food intake was calculated as the difference between the quantity of feed offered initially and the amount of food rest after a period of 1h. The feed rate was calculated by the ratio between the relative consumption and feeding time. In order to determine the effect of acute dose of fluoxetine on the BSS, the animals were injected, via intraperitoneal,

with fluoxetine (10mg/Kg B.W., i.p.) 60 minutes before behavioral record. Thus, the groups were control-fluoxetine (CF) and fluoxetine-fluoxetine (FF).

c-fos immunochemistry

Ten days after performing the BSS, the rats were fasted three hours and then exposed to the food for 90 minutes. After dietary exposure, the animals were anesthetized and transcardially perfused with saline (NaCl 0.9%) followed by a fixation solution (4% paraformaldehyde of PBS, pH 7.4, 4 °C). After perfusion, the brains were removed from skull, post-fixed in the same fixative solution plus sucrose (30%) for 4 hours and stored in cryoprotectant solution (PBS and 20% sucrose) for 6-24 hours. Coronal sections (40µm) were cut on a cryostat (SM 2000 R, Leica, Germany) and collected in PBS. Five series of sections were collected for each animal. A series of coronal sections were subjected to immunohistochemical reactions against Fos second routine protocol (Darcel, Fromentin et al. 2,005). The sections were incubated with primary antibody solution anti-Fos (rabbit done) for 48 h and then incubated in secondary antibody solution for 90 min. After staining, sections were mounted on gelatinized slides previously submitted to dehydration, diafanization and covered with coverslips.

Quantitative analysis of neurons immunoreactive FOS (FOS-IR) was performed in bright field microscopy. Cells were quantified with strong staining in the arcuate nucleus of the hypothalamus and nucleus of the solitary tract (rostral and medial). For each nucleus, all coronal sections of a series were considered in the analysis in which this nucleus was evidenced. All cells were counted in each slice for each nucleus. For delineation of the nuclei was used stereotactic atlas using the following bregmas (Arc: -2,92; Rostral NTS: -12,72 to -12,96; Medial NTS: -13,92 to 14,15) (PAXINOS; WATSON, 2005).

RESULTS

Body weight, food intake and Serotonin level

At 180 days of age, the rats of the fluoxetine group had lower body weight ($C = 433.8 \pm 4.7$ vs. 392.9 ± 9.1) ($P < 0.0001$) and lower food intake (g) ($C = 27.2 \pm 0.7$ vs $F = 22.3 \pm 0.3$) ($P < 0.0001$) when compared to control group. The pharmacological manipulation neonatal promoted elevated levels of serotonin in the hypothalamus in adult life ($C=3,3\pm0,1$ vs $F=4,4\pm0,3$) ($P<0,05$)(Figure 1).

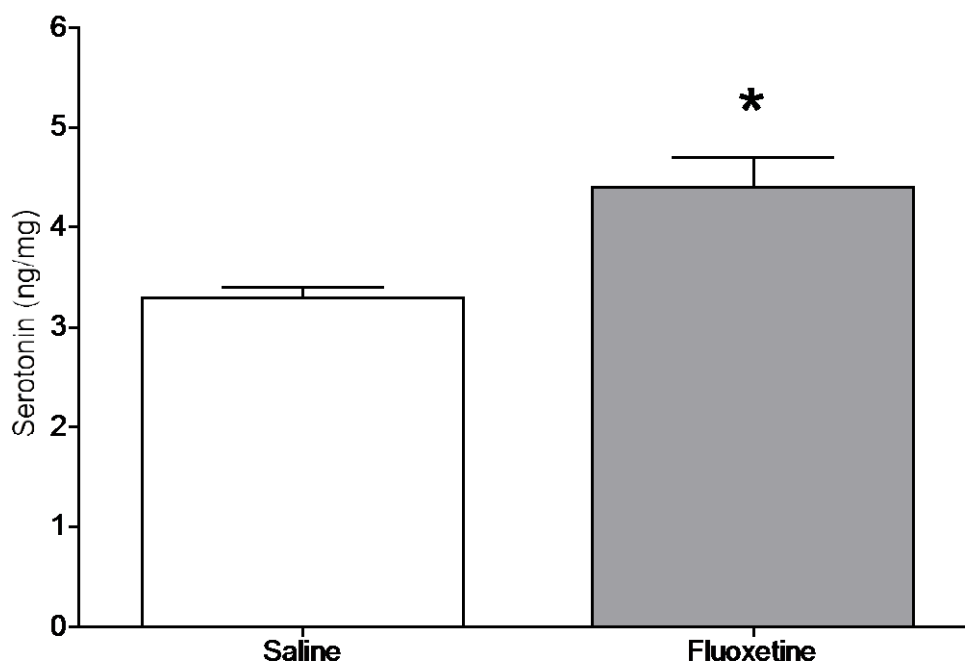


Figure 1: Concentration of serotonin in hypothalamus of adulthood rats. Rats received sterile saline (Control Group, C, n=3, NaCl0, 9%, 1µl/g BW, s.c.) or fluoxetine (Fluoxetine Group, n=4, 10mg/kg, 1µl/g BW, s.c.) from 1st to 21st day of postnatal life. At 180th day of life, the animals were beheaded and their brains dissected to obtain the hypothalamus. The dosage of serotonin was performed by ELISA. White bar means control group, gray bar means fluoxetine group. Student's t-test. * P <0,05.

Behavioral Satiety Sequence

In the analysis of BSS was observed that the acute dose of Fluoxetine in adulthood produced advancing of the satiety for control group (Figure 2A and 2B), but not for fluoxetine group (Figure 2C and 2D). One Way ANOVA identified neonatal effect of fluoxetine treatment on food intake [$F(3,5) = 11.34$] ($P < 0.0001$) and feed speed [$F(3,33) = 5.56$] ($P < 0.001$). When compared to the control group, the fluoxetine group had reduced food intake in the test of BSS. There was a reduction of food intake after acute dose of fluoxetine in the control ($C = 14.6 \pm 1.6$ vs $CF = 6.6 \pm 0.7$) and fluoxetine groups ($F = 9.4 \pm 1$ vs $FF = 4.6 \pm 0.5$) (Figure 4A). The duration of food intake was reduced by acute dose of fluoxetine in the control group ($C = 955 \pm 66$ vs $CF = 646.4 \pm 79$) but not in the fluoxetine group ($F = 639.9 \pm 69$ vs $FF = 533.9 \pm 52$). There was a reduction of the duration of food intake for fluoxetine group compared with the control group (Figure 4B). The feed rate was reduced after acute

dose only in fluoxetine group ($F = 15.7 \pm 2.3$ vs 8.7 ± 0.6). There was no difference in feeding rate between the control and fluoxetine groups (Figure 4C).

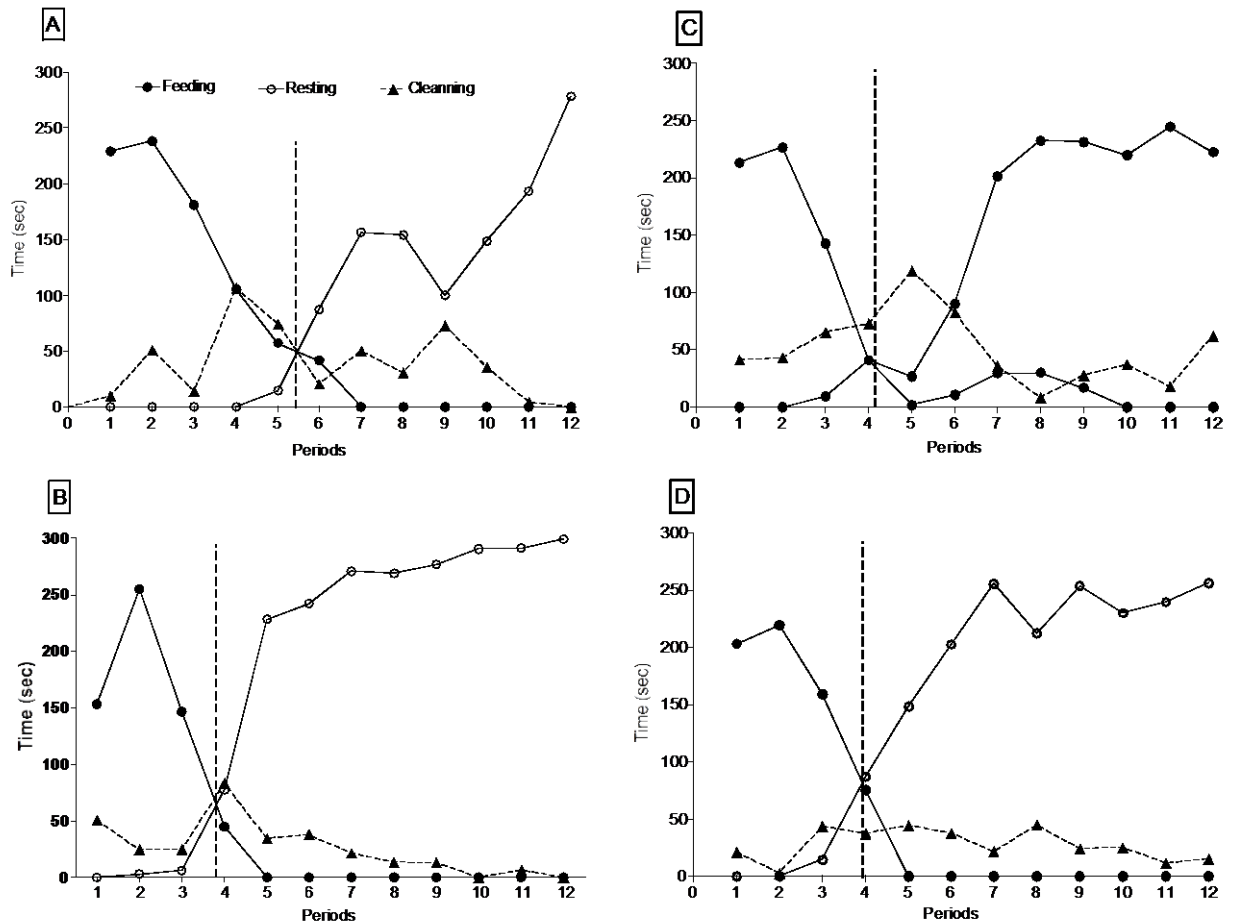


Figure 2: Effect of neonatal SSRI treatment on the acute action of fluoxetine on BSS in adulthood rats. Rats received saline (Control Group (C) , NaCl 0, 9%, 1 μ l/g, s.c.) or fluoxetine (Fluoxetine group (F), 10mg/kg, 1 μ l/ g bw, s.c.) of 1 $^{\circ}$ ao 21 $^{\circ}$ days of postnatal life. At 180 days of age, after fasting for two hours, the animals received acute dose of saline (NaCl0, 9%, 1 μ l / g, ip) or fluoxetine (10mg/kg bw; 1 μ l / g, ip), compounding the (A) C, (B) CF, (C) F or (D) FF, with n = 8. One hour after injection, was offered diet and BSS was filmed for 60 min. After this time, the consumption was measured and the videos were analyzed. Data are given as $X \pm SD$.

Immunoreactivity for arcuate nucleus and tract solitary nucleus

After chow food stimulus, the fluoxetine group had higher number of the fos immunoreactive neurons in the arcuate nucleus ($C = 33.2 \pm 1.3$ vs 53.4 ± 3.2) ($P < 0.0001$) and in rostral ($C = 105.1 \pm 11.3$ vs 207.2 ± 11.3) ($P < 0.001$) and medial regions of the NTS ($C = 98.2 \pm 10.1$ vs 154.8 ± 15.0) ($P < 0.01$) when compared to the control group (Figure 3).

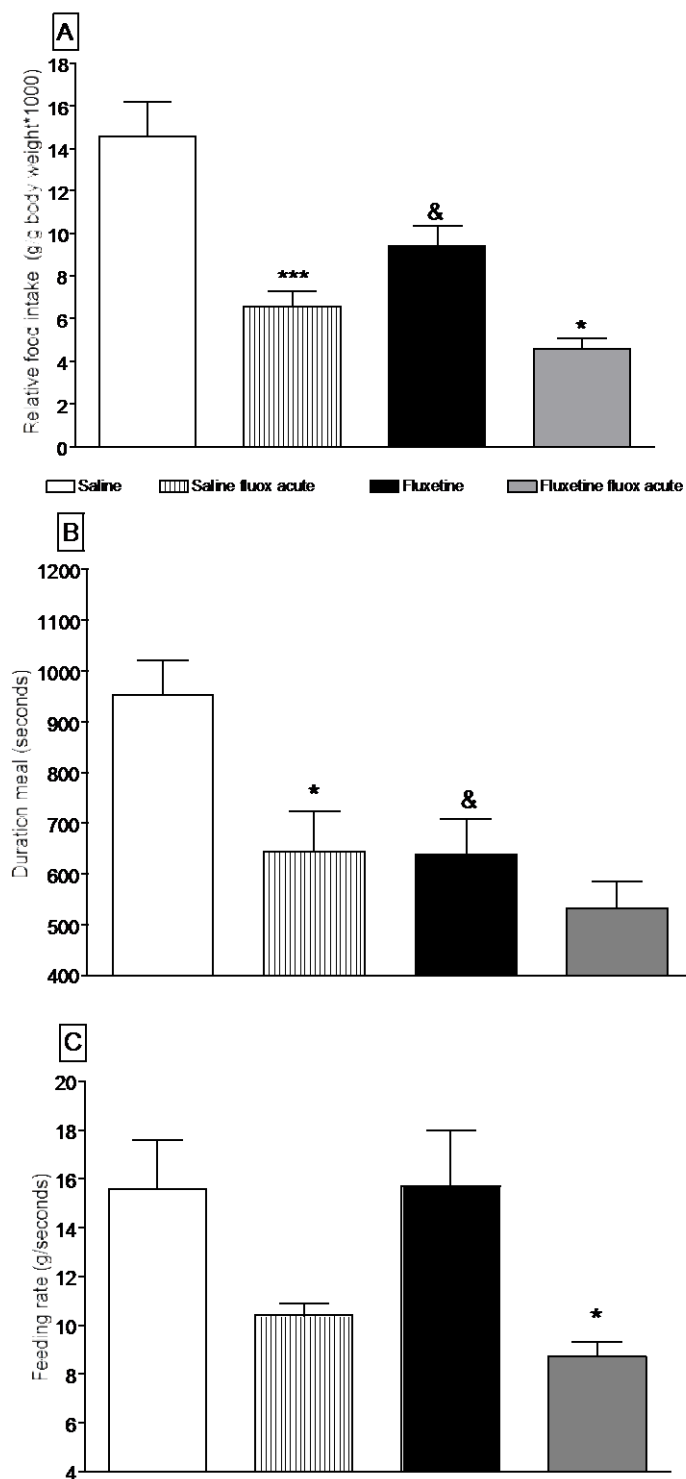


Figure 3: Effect of neonatal SSRI microstructure on the behavioral sequence of satiety. Mice received saline (control group, $n = 3$, NaCl 0, 9%, $1\mu\text{l} / \text{g}$, sc) or fluoxetine (fluoxetine group, $n = 4$, 10mg/kg, $1\mu\text{l} / \text{g}$ bw, sc) of 10-210 days of life postnatal. At 180 days of age, after fasting for two hours, the animals received acute dose of saline (NaCl 0, 9%, $1\mu\text{l} / \text{g}$, ip) or fluoxetine (10mg/kg bw; $1\mu\text{l} / \text{g}$, ip), compounding (A) C, (B) CF, (C) F or (D) FF, with $n = 8$. One hour after injection, was offered diet and SCS was filmed for 60 min. After this time, the consumption was measured and the videos were analyzed. Data are given as $X \pm \text{SD}$.

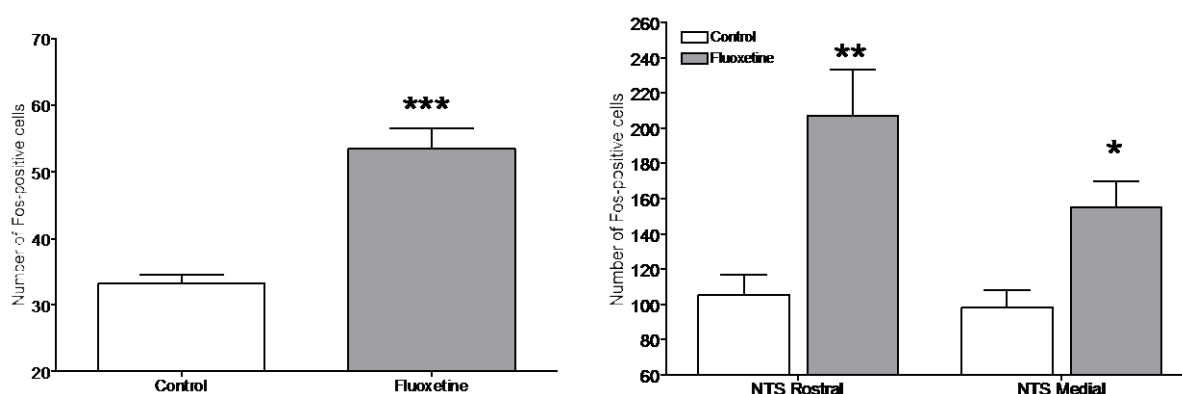


Figure 4: Neuronal immunoreactivity in the ARC and NTS in response to food stimuli in adult rats treated with SSRI during the neonatal period. Mice received saline (control group, $n = 3$, NaCl 0, 9%, 1 μ l / g, sc) or fluoxetine (fluoxetine group, $n = 4$, 10mg/kg, 1 μ l / g bw, sc) of 1 $^{\circ}$ ao 21 $^{\circ}$ days of postnatal life. After 90 min of food stimulation, the animals were anesthetized and underwent to transcardiac perfusion (NaCl, 0.9%, 4% paraformaldehyde). After perfusion, the brains were crio-sectioned in coronal sections (40 μ m). We collected five sets of cuts. A series was subjected to reactions against Fos immunohistochemistry. Quantitative analysis of neurons immunoreactive FOS (FOS-IR) was performed in bright field microscopy. Cells were quantified with marking evident in the arcuate nucleus of the hypothalamus and nucleus of the solitary tract (rostral and medial). Data are given as $X \pm SEM$, Student's t test.

DISCUSSION

In the present study it was observed that selective inhibition of serotonin reuptake during lactation produced, in adult life, advance satiety with reduced food intake. Together with these results, there was higher neuronal immunoreactivity in the nucleus of the solitary tract and in the arcuate nucleus the hypothalamus. The profile of the BSS showed characteristics similar to those of acute responses to serotonergic drugs. The high levels of hypothalamic serotonin found in adult animals submitted to pharmacological manipulation show the plastic effect of the neonatal alteration in the serotonergic system. The literature has described for decades a relationship between neonatal SERT inhibition and increased anxiety and depression in adulthood in rats (Olivier et al., 2008). However, the effects of manipulation of SERT on the feeding behavior are not explored.

It was observed in the present study the persistence of high levels of serotonin in adulthood by neonatal treatment with SSRI. Pharmacological inhibition or genetic manipulations of SERT during development of the nervous system, can promote permanent adjustments in the reuptake and levels of serotonin in the brain, as well as in the activity of its receptors (Yang, Qiu et al. 2006). For example, treatment with citalopram (5 mg) in 8th to 21st PND rats caused a reduction in immunoreactivity for limiting enzyme in serotonin synthesis

(tryptophan hydroxylase 2) in the dorsal and medial raphe nucleus and in immunoreactive fibers for SERT in the somatosensory cortex (62%) and medial prefrontal (61%) (Maciag, Simpson et al. 2006). These findings were observed at 22 and 130 days of life (Maciag, Simpson et al. 2006). In another study, neonatal treatment with citalopram showed a reduction in the density of immunoreactive fibers for SERT in the hippocampus. There was no change in subcortical structures such as the caudate putamen and dorsal thalamus (Weaver et al., 2010). Although the data indicate reduced enzyme serotonin synthesis, we can not affirm that these results conflict with the findings in the present study. One reason is that neurotransmitter levels may be elevated due to compensatory mechanisms such as reducing the SERT. Another mechanism may be the reduction of density and function of 5-HT_{1A} auto-receptor in the raphe nuclei, as it exerts negative feedback on serotonergic neurotransmission and its desensitization may result in increased release of serotonin (Rayen, van den Hove et al. 2011). The brain region analyzed may also be another factor of conflict between the results, because the levels of serotonin can be differentiated depending on the brain region analyzed. Within this last factor, only one recent study evaluated the hypothalamic serotonin after neonatal treatment with SSRI (Berg, Backstrom et al. 2013). In this study, using an experimental model species *X. tropicalis* tadpoles was observed low 5HIAA (serotonin metabolite) in the hypothalamus after treatment with fluoxetine during the development period (Berg, Backstrom et al. 2013). This change may indicate increased release of serotonin in the hypothalamus. Another study of hypothalamic analysis, found that neonatal treatment with clomipramine (inhibiting the reuptake of serotonin and norepinephrine) decreased serotonin levels and increased DOPAC in the hypothalamus of rats with a year of life (Feenstra, van Galen et al. 1996). In this case, the inhibitor may have different effects by also inhibiting the reuptake of norepinephrine.

Inhibition of neonatal serotonin reuptake influences satiety and neuronal reactivity in the NTS and in the arcuate nucleus. It was observed in these animals similar satiety pattern that of in response to acute injection of drugs that stimulate the serotonergic system, ie advance of satiety with reduced food intake (Halford et al Wanninayake. 1998; Dalton, Lee et al. 2006 .) This indicates that the higher neonatal serotonergic tone promoted long-term repercussions on the feeding behavior (Halford, Wanninayake et al. 1998; Dalton, Lee et al. 2006). We expected this experimental model would respond with hyperphagia, as with malnourished animals where brain serotonin levels are also increased (Manjarrez, Manuel et al. 2003). In the case of perinatal malnutrition the largest encephalic serotonergic tone is caused by changes in the sensitivity of the enzyme tryptophan hydroxylase that is limiting the synthesis

of 5-HT pharmacological inhibition in neonatal while the target is the carrier protein (SERT), which induces an increase in serotonergic tone. It is possible that the differences in dietary response between the two experimental models in question are secondary to the targets of the attacks early.

The nucleus of the solitary tract and the arcuate nucleus of the hypothalamus are regions that receive nutritional information of the gastrointestinal tract, being directly involved in the initial mechanism of satiety. Serotonin plays a role on satiety acting on these two regions. In the present study, the largest number of activated neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus and NTS in response to food stimuli may indicate functional changes promoted by neonatal treatment with SSRI toward a state of greater satiety. The pattern of satiety observed is similar to that promoted by agonist injection SSRI or 5-HT_{1B} and 5-HT_{2C} (Halford and Harrold 2008). In the central nervous system, are present only POMC neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus and in the NTS, and these have 5HT_{2C} receptors (Xu, Sari et al. 2,004). In the nucleus of the solitary tract fibers reach many of serotonergic raphe nuclei (Yamamoto, Steinbusch et al. 1981) and there are several of his receivers, as 5HT_{2C}, 5HT_{1A} and 5HT₃ (Thor, Blitz-Siebert et al. 1992; Steward, West et al. 1993). Projections from the arcuate nucleus to the brainstem are involved in the expression of behavior by modulating satiation meal size by POMC neurons (Fan, Ellacott et al. 2004). The effects of CCK on satiety in the NTS seem to be modulated by the 5HT_{2C} receptor (Asarian 2009). Cholecystokinin, a peptide for the promotion of satiety, increases the number of c-fos immunoreactive neurons in the NTS (Asarian 2009). This action seems to be modulated by 5-HT_{2C} receptor, since no increase was observed in the expression of c-fos in the NTS in knockout mice for 5-HT_{2C} (Asarian 2009). The increased expression of c-fos in the NTS in response to gastric distension and CCK also appears to depend on the 5-HT₃ receptor (Hayes and Covasa 2006). In the arcuate nucleus of the hypothalamus, serotonin acts on 5-HT_{1B} receptor located on POMC neurons and 5-HT_{2C} receptors located in neurons neuropeptide Y. In the present study, we observed high level of serotonin in the hypothalamus, thus a possible mechanism responsible for the activation of satiety in animals subjected to early pharmacological manipulation. At the highest concentration in the hypothalamus may act by stimulating anorexigenic (POMC) serotonin neurons and inhibiting the orexigenic (NPY) (Heisler, Jobst et al. 2,006), resulting in greater expression of satiety in those animals.

The highest levels of hypothalamic serotonin in adult rats subjected to selective inhibition of neonatal serotonin reuptake reinforce the hypothesis that this neurotransmitter is an important inducer of phenotypic plasticity. Perhaps the biggest hypothalamic serotonergic tone is

associated with the anticipation of satiety evident in animals treated pharmacologically. However, the greater susceptibility of our experimental model is expressed satiety in front of large neuronal activation in the NTS and Arc. This model has characteristics of satiety opposing models of perinatal malnutrition perhaps due to the duration of the injury or environmental mechanism inducing increased levels of 5-HT in the brain.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FACEPE, CAPES and CNPq.

We thank the gentle availability of Professor PhD Rubem Carlos Araujo Guedes for giving the facilities of the "Laboratory of Nutrition Physiology Naíde Teodósio - Federal University of Pernambuco" for carrying out the encephalics histological crossections.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest

REFERENCES

- Bindra, D. and J. Blond (1958). "A time-sample method for measuring general activity and its components." Can J Psychol **12**(2): 74-76.
- Bolles, R. C. (1960). "Grooming behavior in the rat." J Comp Physiol Psychol **53**: 306-310.
- Cone, R. D. (2005). "Anatomy and regulation of the central melanocortin system." Nat Neurosci **8**(5): 571-578.
- Dalton, G. L., M. D. Lee, et al. (2006). "Serotonin 1B and 2C receptor interactions in the modulation of feeding behaviour in the mouse." Psychopharmacology (Berl) **185**(1): 45-57.
- Deiro, T. C., R. Manhaes-de-Castro, et al. (2006). "Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats." Physiol Behav **87**(2): 338-344.
- Deiro, T. C., R. Manhaes-de-Castro, et al. (2004). "Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats." Braz J Med Biol Res **37**(10): 1503-1509.
- Gluckman, P. D., M. A. Hanson, et al. (2011). "The role of developmental plasticity and epigenetics in human health." Birth Defects Res C Embryo Today **93**(1): 12-18.
- Halford, J. C. and J. E. Blundell (1996). "Metergoline antagonizes fluoxetine-induced suppression of food intake but not changes in the behavioural satiety sequence." Pharmacol Biochem Behav **54**(4): 745-751.
- Halford, J. C., J. A. Harrold, et al. (2005). "Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity." Curr Drug Targets **6**(2): 201-213.
- Halford, J. C., S. C. Wanninayake, et al. (1998). "Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake." Pharmacol Biochem Behav **61**(2): 159-168.

- Hewitt, K. N., M. D. Lee, et al. (2002). "Serotonin 2C receptor agonists and the behavioural satiety sequence in mice." Pharmacol Biochem Behav **71**(4): 691-700.
- Homberg, J. R., D. Schubert, et al. (2010). "New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs." Trends Pharmacol Sci **31**(2): 60-65.
- Jiang, C., R. Fogel, et al. (2003). "Lateral hypothalamus modulates gut-sensitive neurons in the dorsal vagal complex." Brain Res **980**(1): 31-47.
- Krishnan, V. and E. J. Nestler (2008). "The molecular neurobiology of depression." Nature **455**(7215): 894-902.
- Mendes-da-Silva, C., S. L. de Souza, et al. (2002). "Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats." Arq Neuropsiquiatr **60**(4): 928-931.
- Moiseiwitsch, J. R. and J. M. Lauder (1995). "Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7182-7186.
- Montgomery, A. M. and P. Willner (1988). "Fenfluramine disrupts the behavioural satiety sequence in rats." Psychopharmacology (Berl) **94**(3): 397-401.
- Morton, G. J., D. E. Cummings, et al. (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." Nature **443**(7109): 289-295.
- Rayen, I., D. L. van den Hove, et al. (2011). "Fluoxetine during development reverses the effects of prenatal stress on depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis in adolescence." PLoS One **6**(9): e24003.
- Schreiber, R., K. Selbach, et al. (2000). "Effects of serotonin(1/2) receptor agonists on dark-phase food and water intake in rats." Pharmacol Biochem Behav **67**(2): 291-305.
- Schwartz, G. J. (2006). "Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1471): 1275-1280.
- Shuey, D. L., T. W. Sadler, et al. (1993). "Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse." Anat Embryol (Berl) **187**(1): 75-85.
- Silva, C. M., L. Goncalves, et al. (2010). "Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats." Neurosci Lett **483**(3): 179-183.
- Smith, G. P., J. Gibbs, et al. (1974). "Cholecystokinin and intestinal satiety in the rat." Fed Proc **33**(5): 1146-1149.
- Verbaeys, I., F. Leon-Tamariz, et al. (2009). "Dose-response effects of PEGylated cholecystokinin on the behavioral satiety sequence." Physiol Behav **98**(1-2): 198-204.
- York, D. A. (1999). "Peripheral and central mechanisms regulating food intake and macronutrient selection." Obes Surg **9**(5): 471-479.
- Zhang, X., J. Cui, et al. (2003). "The central nucleus of the amygdala modulates gut-related neurons in the dorsal vagal complex in rats." J Physiol **553**(Pt 3): 1005-1018.
- Zhang, X., R. Fogel, et al. (1999). "Stimulation of the paraventricular nucleus modulates the activity of gut-sensitive neurons in the vagal complex." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): G79-90.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS e PERSPECTIVAS

A inibição da recaptação da serotonina no período neonatal foi associada a alterações na expressão fenotípica do comportamento alimentar na vida adulta. Os níveis elevados de serotonina no hipotálamo podem ser correlacionados ao estado de maior sensibilidade à saciedade desencadeada via núcleos arqueado e do trato solitário.

Os animais adultos submetidos à inibição neonatal da recaptação da serotonina apresentaram baixa susceptibilidade à fenótipos característicos da síndrome metabólica quando submetidos à sobrecarga calórica na vida adulta.

Foi observada redução do peso corporal e consumo alimentar ao longo da vida. Essas alterações foram acompanhadas por elevada ativação neuronal em regiões de controle da saciedade, o que pode ter sido responsável pela redução do tamanho da refeição observado nesses animais submetidos à inibição da recaptação da serotonina. A menor sensibilidade ao estímulo calórico pode ter como mecanismo subjacente a menor expressão de peptídeo orexigênico (NPY) e, particularmente, à maior expressão de receptor 5-HT_{2C} no hipotálamo.

Sendo assim, é evidente que a inibição neonatal da recaptação da serotonina promove alterações morfofisiológicas e comportamentais em longo prazo. Entretanto, ao contrário do que hipotetizamos, neste modelo experimental as características comportamentais e gênicas bem como os indicadores bioquímicos sugerem que a plasticidade fenotípica deste organismo direciona-se à menor ingestão alimentar, menor armazenamento de energia e maior resistência à variação dos indicadores bioquímicos plasmáticos de síndrome metabólica em resposta a sobrecarga energética. Dessa forma, este modelo experimental parece ser mais adaptável a condições de aumento de demanda energética ambiental apresentando-se menos susceptível à obesidade e a problemas metabólicos.

A partir do perfil observado no modelo experimental em questão, surgem alguns questionamentos relacionados ao consumo alimentar e à utilização de energia que nos levam a elaborar as seguintes perspectivas:

- ✓ Analisar os efeitos da inibição da recaptação da serotonina durante a lactação sobre a ação de agonistas serotoninérgicos no consumo alimentar.
- ✓ Avaliar a imunoresponsividade de neurônios hipotalâmicos à injeção intracerebroventricular de agonistas 5-HT_{1B} e 5HT_{2C} em animais submetidos a inibição de recaptação de serotonina durante a lactação.

- ✓ Investigar a termogênese e o metabolismo do tecido adiposo marrom em animais adultos submetidos ao mesmo estímulo perinatal já que nosso grande questionamento agora é sobre a utilização/armazenamento de energia em animais neonatalmente submetidos à inibição neonatal da recaptação da serotonina.

REFERÊNCIAS

- Adeghate, E., A. S. Ponery, et al. (1999). "Distribution of serotonin and its effect on insulin and glucagon secretion in normal and diabetic pancreatic tissues in rat." Neuro Endocrinol Lett **20**(5): 315-322.
- Alsio, J., P. K. Olszewski, et al. (2010). "Dopamine D1 receptor gene expression decreases in the nucleus accumbens upon long-term exposure to palatable food and differs depending on diet-induced obesity phenotype in rats." Neuroscience **171**(3): 779-787.
- Antin, J., J. Gibbs, et al. (1975). "Cholecystokinin elicits the complete behavioral sequence of satiety in rats." J Comp Physiol Psychol **89**(7): 784-790.
- Appleyard, S. M., T. W. Bailey, et al. (2005). "Proopiomelanocortin neurons in nucleus tractus solitarius are activated by visceral afferents: regulation by cholecystokinin and opioids." J Neurosci **25**(14): 3578-3585.
- Arora, R., S. Dryden, et al. (1994). "Acute dexfenfluramine administration normalizes glucose tolerance in rats with insulin-deficient diabetes." Eur J Clin Invest **24**(3): 182-187.
- Audet, M. A., L. Descarries, et al. (1989). "Quantified regional and laminar distribution of the serotonin innervation in the anterior half of adult rat cerebral cortex." J Chem Neuroanat **2**(1): 29-44.
- Azmitia, E. C. (2001). "Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis." Brain Res Bull **56**(5): 413-424.
- Barker, D. J., A. R. Bull, et al. (1990). "Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life." BMJ **301**(6746): 259-262.
- Barker, D. J. and P. M. Clark (1997). "Fetal undernutrition and disease in later life." Rev Reprod **2**(2): 105-112.
- Barker, D. J., J. G. Eriksson, et al. (2002). "Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis." Int J Epidemiol **31**(6): 1235-1239.
- Barker, D. J., C. Osmond, et al. (1989). "Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease." BMJ **298**(6673): 564-567.
- Baumann, P. and B. Rochat (1995). "Comparative pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors: a look behind the mirror." Int Clin Psychopharmacol **10 Suppl 1**: 15-21.
- Bayer, S. A., J. Altman, et al. (1993). "Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat." Neurotoxicology **14**(1): 83-144.
- Bendotti, C. and R. Samanin (1986). "8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons." Eur J Pharmacol **121**(1): 147-150.
- Berthoud, H. R. (2002). "Multiple neural systems controlling food intake and body weight." Neurosci Biobehav Rev **26**(4): 393-428.
- Blundell, J. (1991). "Pharmacological approaches to appetite suppression." Trends Pharmacol Sci **12**(4): 147-157.
- Blundell, J. E., P. J. Rogers, et al. (1985). "Behavioural structure and mechanisms of anorexia: calibration of natural and abnormal inhibition of eating." Brain Res Bull **15**(4): 371-376.
- Bolanos-Jimenez, F., R. M. Manhaes de Castro, et al. (1995). "Effects of stress on the functional properties of pre- and postsynaptic 5-HT_{1B} receptors in the rat brain." Eur J Pharmacol **294**(2-3): 531-540.

- Borue, X., J. Chen, et al. (2007). "Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies." *Int J Dev Neurosci* **25**(6): 341-347.
- Bouret, S. G., J. N. Gorski, et al. (2008). "Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats." *Cell Metab* **7**(2): 179-185.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Breum, L., U. Bjerre, et al. (1995). "Long-term effects of fluoxetine on glycemic control in obese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus or glucose intolerance: influence on muscle glycogen synthase and insulin receptor kinase activity." *Metabolism* **44**(12): 1570-1576.
- Brodie, B. B. and P. A. Shore (1957). "A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain." *Ann N Y Acad Sci* **66**(3): 631-642.
- Buznikov, G. A. (1991). "The biogenic monoamines as regulators of early (pre-nervous) embryogenesis: new data." *Adv Exp Med Biol* **296**: 33-48.
- Chen, K., J. Yan, et al. (2011). "c-Fos expression in rat brainstem following intake of sucrose or saccharin." *Front Med* **5**(3): 294-301.
- Clifton, P. G., M. D. Lee, et al. (2000). "Similarities in the action of Ro 60-0175, a 5-HT_{2C} receptor agonist and d-fenfluramine on feeding patterns in the rat." *Psychopharmacology (Berl)* **152**(3): 256-267.
- Cone, R. D. (2005). "Anatomy and regulation of the central melanocortin system." *Nat Neurosci* **8**(5): 571-578.
- Cote, F., C. Fligny, et al. (2007). "Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(1): 329-334.
- Dalton, G. L., M. D. Lee, et al. (2006). "Serotonin 1B and 2C receptor interactions in the modulation of feeding behaviour in the mouse." *Psychopharmacology (Berl)* **185**(1): 45-57.
- Darcel, N., G. Fromentin, et al. (2005). "Fos-positive neurons are increased in the nucleus of the solitary tract and decreased in the ventromedial hypothalamus and amygdala by a high-protein diet in rats." *J Nutr* **135**(6): 1486-1490.
- Davidowa, H. and A. Plagemann (2000). "Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats." *Neuroreport* **11**(12): 2795-2798.
- Deiro, T. C., R. Manhaes-de-Castro, et al. (2006). "Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats." *Physiol Behav* **87**(2): 338-344.
- Deiro, T. C., R. Manhaes-de-Castro, et al. (2004). "Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats." *Braz J Med Biol Res* **37**(10): 1503-1509.
- Donovan, M. H. and L. H. Tecott (2013). "Serotonin and the regulation of mammalian energy balance." *Front Neurosci* **7**: 36.
- Dryden, S., H. M. Frankish, et al. (1996). "The serotonergic agent fluoxetine reduces neuropeptide Y levels and neuropeptide Y secretion in the hypothalamus of lean and obese rats." *Neuroscience* **72**(2): 557-566.
- Dulloo, A. G. (2008). "Thrifty energy metabolism in catch-up growth trajectories to insulin and leptin resistance." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **22**(1): 155-171.
- Ellacott, K. L., I. G. Halatchev, et al. (2006). "Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem." *Endocrinology* **147**(7): 3190-3195.
- Erlanson-Albertsson, C. (2005). "How palatable food disrupts appetite regulation." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **97**(2): 61-73.
- Fabre, V. and M. Hamon (2003). "[Mechanisms of action of antidepressants: new data from Escitalopram]." *Encephale* **29**(3 Pt 1): 259-265.

- Ferraz-Pereira, B.-S. A. S. J. A. S. A. I. G. L. C. M. and L. C. V. G. M.-d.-C. R. K. N.; Lopes de Souza S. (2012). "Critérios para escolha da amostra em experimentos com ratos wistar." RESBCAL **1**(1): 121-129.
- Fidalgo, M., F. Falcao-Tebas, et al. (2012). "Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training." Br J Nutr: 1-8.
- Firmino, A. A., F. C. Fonseca, et al. (2013). "Transcriptome analysis in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests." PLoS One **8**(12): e85079.
- Foltin, R. W. (2011). "Consumption of palatable food decreases the anorectic effects of serotonergic, but not dopaminergic drugs in baboons." Physiol Behav **103**(5): 493-500.
- Fraser, K. A. and J. S. Davison (1993). "Meal-induced c-fos expression in brain stem is not dependent on cholecystokinin release." Am J Physiol **265**(1 Pt 2): R235-239.
- Gaspar, P., O. Cases, et al. (2003). "The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics." Nat Rev Neurosci **4**(12): 1002-1012.
- Germano, P. C., E. S. D. de Lima, et al. (2013). "Hypercaloric high-lipid diet and brain development: Effects on cortical spreading depression in adult rats." Nutr Neurosci.
- Ghaeli, P., E. Shahsavand, et al. (2004). "Comparing the effects of 8-week treatment with fluoxetine and imipramine on fasting blood glucose of patients with major depressive disorder." J Clin Psychopharmacol **24**(4): 386-388.
- Gilibert, S., A. E. Kwitek, et al. (2008). "Effects of chromosome 17 on features of the metabolic syndrome in the Lyon hypertensive rat." Physiol Genomics **33**(2): 212-217.
- Gingrich, J. A. and R. Hen (2001). "Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice." Psychopharmacology (Berl) **155**(1): 1-10.
- Gluckman, P. D. and M. A. Hanson (2004). "The developmental origins of the metabolic syndrome." Trends Endocrinol Metab **15**(4): 183-187.
- Gluckman, P. D., M. A. Hanson, et al. (2011). "The role of developmental plasticity and epigenetics in human health." Birth Defects Res C Embryo Today **93**(1): 12-18.
- Gluckman, P. D., K. A. Lillycrop, et al. (2007). "Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(31): 12796-12800.
- Godfrey, K. M., P. D. Gluckman, et al. (2010). "Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives." Trends Endocrinol Metab **21**(4): 199-205.
- Gres, S., S. Canteiro, et al. (2013). "Oxidation of high doses of serotonin favors lipid accumulation in mouse and human fat cells." Mol Nutr Food Res.
- Grignaschi, G., F. Sironi, et al. (1996). "Stimulation of 5-HT_{2A} receptors in the paraventricular hypothalamus attenuates neuropeptide Y-induced hyperphagia through activation of corticotropin releasing factor." Brain Res **708**(1-2): 173-176.
- Grill, H. J. (2010). "Leptin and the systems neuroscience of meal size control." Front Neuroendocrinol **31**(1): 61-78.
- Gross, Z. and N. Galili (1999). "N-Substituted Corroles: A Novel Class of Chiral Ligands." Angew Chem Int Ed Engl **38**(16): 2366-2369.
- Grove, K. L. and M. S. Smith (2003). "Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system." Physiol Behav **79**(1): 47-63.
- Gur, E., M. E. Newman, et al. (2003). "The differential effects of food restriction on 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor mediated control of serotonergic transmission in the hippocampus and hypothalamus of rats." Nutr Neurosci **6**(3): 169-175.

- Hales, C. N. and D. J. Barker (1992). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis." *Diabetologia* **35**(7): 595-601.
- Hales, C. N. and D. J. Barker (2001). "The thrifty phenotype hypothesis." *Br Med Bull* **60**: 5-20.
- Halford, J. C. and J. E. Blundell (1996). "The 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence." *Physiol Behav* **60**(3): 933-939.
- Halford, J. C. and J. E. Blundell (1996). "Metergoline antagonizes fluoxetine-induced suppression of food intake but not changes in the behavioural satiety sequence." *Pharmacol Biochem Behav* **54**(4): 745-751.
- Halford, J. C., J. A. Harrold, et al. (2005). "Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity." *Curr Drug Targets* **6**(2): 201-213.
- Halford, J. C., S. C. Wanninayake, et al. (1998). "Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake." *Pharmacol Biochem Behav* **61**(2): 159-168.
- Harris, S. S., D. Maciag, et al. (2012). "Dose-dependent effects of neonatal SSRI exposure on adult behavior in the rat." *Brain Res* **1429**: 52-60.
- Hayes, M. R., L. Bradley, et al. (2009). "Endogenous hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation contributes to the control of food intake by mediating gastric satiation signaling." *Endocrinology* **150**(6): 2654-2659.
- Heisler, L. K., M. A. Cowley, et al. (2003). "Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis." *Ann N Y Acad Sci* **994**: 169-174.
- Heisler, L. K., E. E. Jobst, et al. (2006). "Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake." *Neuron* **51**(2): 239-249.
- Hendrick, V., Z. N. Stowe, et al. (2003). "Placental passage of antidepressant medications." *Am J Psychiatry* **160**(5): 993-996.
- Hewitt, K. N., M. D. Lee, et al. (2002). "Serotonin 2C receptor agonists and the behavioural satiety sequence in mice." *Pharmacol Biochem Behav* **71**(4): 691-700.
- Holmes, A., D. L. Murphy, et al. (2003). "Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression." *Biol Psychiatry* **54**(10): 953-959.
- Homberg, J. R., S. E. la Fleur, et al. (2010). "Serotonin transporter deficiency increases abdominal fat in female, but not male rats." *Obesity (Silver Spring)* **18**(1): 137-145.
- Homberg, J. R., J. D. Olivier, et al. (2011). "Fluoxetine exerts age-dependent effects on behavior and amygdala neuroplasticity in the rat." *PLoS One* **6**(1): e16646.
- Homberg, J. R., D. Schubert, et al. (2010). "New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs." *Trends Pharmacol Sci* **31**(2): 60-65.
- Hoyer, D., J. P. Hannon, et al. (2002). "Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors." *Pharmacol Biochem Behav* **71**(4): 533-554.
- Hsiao, S. H., H. H. Chung, et al. (2006). "Chronic fluoxetine administration desensitizes the hyperglycemia but not the anorexia induced by serotonin in rats receiving fructose-enriched chow." *Neurosci Lett* **404**(1-2): 6-8.
- Hurren, K. M. and H. D. Berlie (2011). "Lorcaserin: an investigational serotonin 2C agonist for weight loss." *Am J Health Syst Pharm* **68**(21): 2029-2037.
- Jiang, C., R. Fogel, et al. (2003). "Lateral hypothalamus modulates gut-sensitive neurons in the dorsal vagal complex." *Brain Res* **980**(1): 31-47.
- Kenny, P. J. (2011). "Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction." *Nat Rev Neurosci* **12**(11): 638-651.
- Kim, H., Y. Toyofuku, et al. (2010). "Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy." *Nat Med* **16**(7): 804-808.

- Koishi, S., K. Yamamoto, et al. (2006). "Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population." Brain Dev **28**(4): 257-260.
- Krishnan, V. and E. J. Nestler (2008). "The molecular neurobiology of depression." Nature **455**(7215): 894-902.
- Kummet, G. J., S. E. Haskell, et al. (2012). "Neonatal SSRI Exposure Programs a Hypermetabolic State in Adult Mice." J Nutr Metab **2012**: 431574.
- Lam, D. D., A. S. Garfield, et al. (2010). "Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight." Pharmacol Biochem Behav **97**(1): 84-91.
- Lam, D. D. and L. K. Heisler (2007). "Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes." Expert Rev Mol Med **9**(5): 1-24.
- Lam, D. D., M. J. Przydzial, et al. (2008). "Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors." Endocrinology **149**(3): 1323-1328.
- Lauder, J. M. (1990). "Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal." Ann N Y Acad Sci **600**: 297-313; discussion 314.
- Le Floch, J. P., P. Escuyer, et al. (1990). "Blood glucose area under the curve. Methodological aspects." Diabetes Care **13**(2): 172-175.
- Lee, M. D., G. A. Kennett, et al. (2002). "5-HT_{1B} receptors modulate components of satiety in the rat: behavioural and pharmacological analyses of the selective serotonin_{1B} agonist CP-94,253." Psychopharmacology (Berl) **164**(1): 49-60.
- Leibowitz, S. F. and J. T. Alexander (1998). "Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight." Biol Psychiatry **44**(9): 851-864.
- Leibowitz, S. F., G. F. Weiss, et al. (1989). "Medial hypothalamic serotonin: role in circadian patterns of feeding and macronutrient selection." Brain Res **503**(1): 132-140.
- Levine, A. S. and J. E. Morley (1984). "Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats." Peptides **5**(6): 1025-1029.
- Li, Q., L. Chen, et al. (2011). "Metabolic effects of bariatric surgery in type 2 diabetic patients with body mass index < 35 kg/m²." Diabetes Obes Metab **14**(3): 262-270.
- Lira, A., M. Zhou, et al. (2003). "Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice." Biol Psychiatry **54**(10): 960-971.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lopes de Souza, S., R. Orozco-Solis, et al. (2008). "Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake." Eur J Neurosci **27**(6): 1400-1408.
- Low, F. M., P. D. Gluckman, et al. (2011). "Developmental plasticity and epigenetic mechanisms underpinning metabolic and cardiovascular diseases." Epigenomics **3**(3): 279-294.
- Lucas, J. J., A. Yamamoto, et al. (1998). "Absence of fenfluramine-induced anorexia and reduced c-Fos induction in the hypothalamus and central amygdaloid complex of serotonin 1B receptor knock-out mice." J Neurosci **18**(14): 5537-5544.
- Maciag, D., K. L. Simpson, et al. (2006). "Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry." Neuropsychopharmacology **31**(1): 47-57.
- Maheux, P., F. Ducros, et al. (1997). "Fluoxetine improves insulin sensitivity in obese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus independently of weight loss." Int J Obes Relat Metab Disord **21**(2): 97-102.

- Mateos, S. S., C. L. Sanchez, et al. (2009). "Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats." Basic Clin Pharmacol Toxicol **104**(1): 52-59.
- McCance, R. A. and E. M. Widdowson (1974). "The determinants of growth and form." Proc R Soc Lond B Biol Sci **185**(78): 1-17.
- Meier, Y., J. J. Eloranta, et al. (2007). "Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract." Drug Metab Dispos **35**(4): 590-594.
- Meister, B. (2007). "Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight." Physiol Behav **92**(1-2): 263-271.
- Mendes-da-Silva, C., S. L. de Souza, et al. (2002). "Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats." Arq Neuropsiquiatr **60**(4): 928-931.
- Moiseiwitsch, J. R. and J. M. Lauder (1995). "Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7182-7186.
- Morton, G. J., D. E. Cummings, et al. (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." Nature **443**(7109): 289-295.
- Muldoon, M. F., R. H. Mackey, et al. (2006). "The metabolic syndrome is associated with reduced central serotonergic responsivity in healthy community volunteers." J Clin Endocrinol Metab **91**(2): 718-721.
- Muldoon, M. F., R. H. Mackey, et al. (2004). "Low central nervous system serotonergic responsivity is associated with the metabolic syndrome and physical inactivity." J Clin Endocrinol Metab **89**(1): 266-271.
- Narboux-Neme, N., L. M. Pavone, et al. (2008). "Serotonin transporter transgenic (SERTcre) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs)." Neuropharmacology **55**(6): 994-1005.
- Nishi, R. (1994). "Neurotrophic factors: two are better than one." Science **265**(5175): 1052-1053.
- Nogueira, M. I., C. Barbieri, et al. (1997). "A practical device for histological fixative procedures that limits formaldehyde deleterious effects in laboratory environments." J Neurosci Methods **72**(1): 65-70.
- Ogawa, M., T. Miyata, et al. (1995). "The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons." Neuron **14**(5): 899-912.
- Ozanne, S. E. and C. N. Hales (2002). "Early programming of glucose-insulin metabolism." Trends Endocrinol Metab **13**(9): 368-373.
- Parent, A. (1981). "Comparative anatomy of the serotonergic systems." J Physiol (Paris) **77**(2-3): 147-156.
- Park, S., J. A. Harrold, et al. (1999). "Increased binding at 5-HT(1A), 5-HT(1B), and 5-HT(2A) receptors and 5-HT transporters in diet-induced obese rats." Brain Res **847**(1): 90-97.
- Pawluski, J. L. (2012). "Perinatal selective serotonin reuptake inhibitor exposure: impact on brain development and neural plasticity." Neuroendocrinology **95**(1): 39-46.
- Ravelli, G. P., Z. A. Stein, et al. (1976). "Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy." N Engl J Med **295**(7): 349-353.
- Ravna, A. W., I. Sylte, et al. (2006). "Putative drug binding conformations of monoamine transporters." Bioorg Med Chem **14**(3): 666-675.
- Raybould, H. E., R. J. Gayton, et al. (1988). "Mechanisms of action of peripherally administered cholecystikinin octapeptide on brain stem neurons in the rat." J Neurosci **8**(8): 3018-3024.

- Rayen, I., D. L. van den Hove, et al. (2011). "Fluoxetine during development reverses the effects of prenatal stress on depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis in adolescence." *PLoS One* **6**(9): e24003.
- Remacle, C., F. Bieswal, et al. (2004). "Programming of obesity and cardiovascular disease." *Int J Obes Relat Metab Disord* **28 Suppl 3**: S46-53.
- Resnick, O., M. Miller, et al. (1979). "Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat." *Neurosci Biobehav Rev* **3**(4): 233-246.
- Rinaman, L. (2010). "Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure." *Brain Res* **1350**: 18-34.
- Rinaman, L., E. A. Baker, et al. (1998). "Medullary c-Fos activation in rats after ingestion of a satiating meal." *Am J Physiol* **275**(1 Pt 2): R262-268.
- Rodgers, R. J., P. Holch, et al. (2010). "Behavioural satiety sequence (BSS): separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite." *Pharmacol Biochem Behav* **97**(1): 3-14.
- Sagar, S. M., F. R. Sharp, et al. (1988). "Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level." *Science* **240**(4857): 1328-1331.
- Samuelsson, A. M., P. A. Matthews, et al. (2008). "Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming." *Hypertension* **51**(2): 383-392.
- Schreiber, R., K. Selbach, et al. (2000). "Effects of serotonin(1/2) receptor agonists on dark-phase food and water intake in rats." *Pharmacol Biochem Behav* **67**(2): 291-305.
- Schwartz, G. J. (2006). "Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**(1471): 1275-1280.
- Shahsavand Ananloo, E., P. Ghaeli, et al. (2013). "Comparing the effects of fluoxetine and imipramine on total cholesterol, triglyceride, and weight in patients with major depression." *Daru* **21**(1): 4.
- Shuey, D. L., T. W. Sadler, et al. (1993). "Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse." *Anat Embryol (Berl)* **187**(1): 75-85.
- Silva, C. M., L. Goncalves, et al. (2010). "Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats." *Neurosci Lett* **483**(3): 179-183.
- Simansky, K. J. and D. M. Nicklous (2002). "Parabrachial infusion of D-fenfluramine reduces food intake. Blockade by the 5-HT(1B) antagonist SB-216641." *Pharmacol Biochem Behav* **71**(4): 681-690.
- Stearns, S., G. de Jong, et al. (1991). "The effects of phenotypic plasticity on genetic correlations." *Trends in ecology & evolution* **6**(4): 122-126.
- Steffens, A. B., A. J. Scheurink, et al. (1988). "Hypothalamic food intake regulating areas are involved in the homeostasis of blood glucose and plasma FFA levels." *Physiol Behav* **44**(4-5): 581-589.
- Stunes, A. K., J. E. Reseland, et al. (2011). "Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation." *Diabetes Obes Metab* **13**(6): 551-558.
- Tecott, L. H. (2007). "Serotonin and the orchestration of energy balance." *Cell Metab* **6**(5): 352-361.
- Tecott, L. H., L. M. Sun, et al. (1995). "Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors." *Nature* **374**(6522): 542-546.
- Thomsen, W. J., A. J. Grottick, et al. (2008). "Lorcaserin, a novel selective human 5-hydroxytryptamine_{2C} agonist: in vitro and in vivo pharmacological characterization." *J Pharmacol Exp Ther* **325**(2): 577-587.

- Turlejski, K. (1996). "Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development." Acta Neurobiol Exp (Wars) **56**(2): 619-636.
- Uyama, N., A. Geerts, et al. (2004). "Neural connections between the hypothalamus and the liver." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **280**(1): 808-820.
- Velasquez, J. C., N. Goeden, et al. (2013). "Placental serotonin: implications for the developmental effects of SSRIs and maternal depression." Front Cell Neurosci **7**: 47.
- Verbaeys, I., F. Leon-Tamariz, et al. (2009). "Dose-response effects of PEGylated cholecystokinin on the behavioral satiety sequence." Physiol Behav **98**(1-2): 198-204.
- Verge, D. and A. Calas (2000). "Serotonergic neurons and serotonin receptors: gains from cytochemical approaches." J Chem Neuroanat **18**(1-2): 41-56.
- Vergoni, A. V., R. Poggioli, et al. (1986). "Corticotropin inhibits food intake in rats." Neuropeptides **7**(2): 153-158.
- Vialou, V., L. Balasse, et al. (2007). "Neurochemical characterization of pathways expressing plasma membrane monoamine transporter in the rat brain." Neuroscience **144**(2): 616-622.
- Vitalis, T., O. Cases, et al. (1998). "Effects of monoamine oxidase A inhibition on barrel formation in the mouse somatosensory cortex: determination of a sensitive developmental period." J Comp Neurol **393**(2): 169-184.
- Warden, S. J., M. M. Bliziotis, et al. (2005). "Neural regulation of bone and the skeletal effects of serotonin (5-hydroxytryptamine)." Mol Cell Endocrinol **242**(1-2): 1-9.
- Watanabe, H., M. T. Rose, et al. (2011). "Role of peripheral serotonin in glucose and lipid metabolism." Curr Opin Lipidol **22**(3): 186-191.
- Weber-Hamann, B., D. Kopf, et al. (2005). "Activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal system and oral glucose tolerance in depressed patients." Neuroendocrinology **81**(3): 200-204.
- Weissman, A. M., B. T. Levy, et al. (2004). "Pooled analysis of antidepressant levels in lactating mothers, breast milk, and nursing infants." Am J Psychiatry **161**(6): 1066-1078.
- Wells, J. C. (2010). "Maternal capital and the metabolic ghetto: An evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities." Am J Hum Biol **22**(1): 1-17.
- Wells, J. C. (2011). "The thrifty phenotype: An adaptation in growth or metabolism?" American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council **23**(1): 65-75.
- West-Eberhard, M. J. (1986). "Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review)." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**(5): 1388-1392.
- West-Eberhard, M. J. (2005). "Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity." J Exp Zool B Mol Dev Evol **304**(6): 610-618.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (2001). "Serotonin and brain development: role in human developmental diseases." Brain Res Bull **56**(5): 479-485.
- Willing, A. E. and H. R. Berthoud (1997). "Gastric distension-induced c-fos expression in catecholaminergic neurons of rat dorsal vagal complex." Am J Physiol **272**(1 Pt 2): R59-67.
- Wright, D. E., K. B. Seroogy, et al. (1995). "Comparative localization of serotonin1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain." J Comp Neurol **351**(3): 357-373.
- Yadav, V. K., F. Oury, et al. (2009). "A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure." Cell **138**(5): 976-989.
- York, D. A. (1999). "Peripheral and central mechanisms regulating food intake and macronutrient selection." Obes Surg **9**(5): 471-479.

- Zhang, X., J. Cui, et al. (2003). "The central nucleus of the amygdala modulates gut-related neurons in the dorsal vagal complex in rats." J Physiol **553**(Pt 3): 1005-1018.
- Zhang, X., R. Fogel, et al. (1999). "Stimulation of the paraventricular nucleus modulates the activity of gut-sensitive neurons in the vagal complex." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): G79-90.
- Zhang, Y., E. M. Smith, et al. (2010). "Serotonin (5-HT) receptor 5A sequence variants affect human plasma triglyceride levels." Physiol Genomics **42**(2): 168-176.
- Zittel, T. T., R. De Giorgio, et al. (1994). "Fos protein expression in the nucleus of the solitary tract in response to intestinal nutrients in awake rats." Brain Res **663**(2): 266-270.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 11 de agosto de 2010.

Ofício nº 305/2010

Da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª: Lígia Cristina Monteiro Galindo**
Departamento Nutrição – CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.024394/2010-93

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, ***“Possíveis efeitos da manipulação farmacológica perinatal do sistema serotoninérgico sobre o comportamento alimentar, o metabolismo da glicose e o perfil lipídico em ratos.”***

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Observação:

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição.
Animais: Ratos, linhagem Wistar: sexo: Machos; Idade: Neonatos (1º ao 21º dia), Jovens (30 dias) e adultos; Nº de Animais : 140 (cento e quarenta).

Atenciosamente,

 Prof. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 1

Experimental Neurology

Contact us
Help ?

 Elsevier

>> EES and Internet Explorer 10 ... [more](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: Lígia Galindo

Role: Author

Version: [EES 2013](#)

Submissions Being Processed for Author Lígia Cristina Monteiro Galindo, M.D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Neonatal Serotonin Reuptake Inhibition Promotes Increased Hypothalamic Expression of 5-HT _{2C} and Reduces Metabolic Indicators in Adult Rats	Jun 07, 2013	Jun 07, 2013	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Title: Neonatal Serotonin Reuptake Inhibition Promotes Increased Hypothalamic Expression of 5-HT_{2C} and Reduces Metabolic Indicators in Adult Rats

Corresponding Author: Dr Lígia Cristina Monteiro Galindo

Authors: Lígia Cristina Monteiro Galindo, M.D.; Manuella da Luz Duarte Barros, Graduation; Rhowena J Matos Barbosa, PhD; Julliet A de Souza, Graduate; Carol G Leandro, PhD; Sandra Lopes De Souza, PhD; Raul Manhães de Castro, PhD

Dear Dr Galindo,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Experimental Neurology.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/yexnr/>

Your username is: Lígia Galindo

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/yexnr/automail_query.asp.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Experimental Neurology. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

For guidelines on how to track your manuscript in EES please go the following address: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/89

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

Experimental Neurology

Elsevier

525 B Street, Suite 1900

San Diego, CA 92101-4495 USA

E-mail: expn@elsevier.com

ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO ARTIGO 2

NUTRITION RESEARCH Contact us Help ? >> EES and Internet Explorer 10 ... more

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Username: Lígia Galindo Role: Author Version: EES 2013.3

Submissions Being Processed for Author Lígia Galindo

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display: 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Neonatal Selective Serotonin Reuptake Inhibition Exposure Stimulates Satiety State and Fos-like Immunoreactivity in the Hypothalamus and Nucleus Tractus Solitarius of Adulthood Rats	Jun 08, 2013	Jun 08, 2013	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display: 10 results per page.

<< Author Main Menu

Dear Mrs Ligia Galindo,

Your submission entitled "Neonatal Selective Serotonin Reuptake Inhibition Exposure Stimulates Satiety State and Fos-like Immunoreactivity in the Hypothalamus and Nucleus Tractus Solitarius of Adulthood Rats" has been received by Nutrition Research

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/nr/>.

Your username is:

If you need to retrieve password details please go to:

http://ees.elsevier.com/nr/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System