



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA
E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

Allan Delano Urbano Cunha

**Programação fetal e desnutrição perinatal: efeitos da estimulação do sistema
serotoninérgico sobre aspectos moleculares da memória e comportamento
alimentar de ratos adultos**

RECIFE

2015

Allan Delano Urbano Cunha

Programação fetal e desnutrição perinatal: efeitos da estimulação do sistema serotoninérgico sobre aspectos moleculares da memória e comportamento alimentar de ratos adultos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Lopes Souza

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Rhowena Jane Barbosa Matos

RECIFE

2015

Catálogo da fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4

972p Cunha, Allan Delano Urbano

Programação fetal e desnutrição perinatal: efeitos da estimulação do sistema serotoninérgico sobre aspectos moleculares da memória e comportamento alimentar de ratos adultos / Allan Delano Urbano Cunha. – 2015.

84 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Sandra Lopes de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2015.

Inclui referências e anexos.

1. Serotonina. 2. Memória. 3. Desnutrição. 4. Comportamento alimentar. I. Souza, Sandra Lopes de (Orientadora). II. Título.

612.3

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-177)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria
e Ciências do Comportamento

Ao Colegiado

Comunicamos que, após a realização da defesa da dissertação intitulada: **“PROGRAMAÇÃO FETAL E DESNUTRIÇÃO PERINATAL: EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO SOBRE ASPECTOS MOLECULARES DA MEMÓRIA E COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE RATOS ADULTOS”**, apresentada em 13 de março de 2015 pelo mestrando **ALLAN DELANO URBANO CUNHA** aos componentes da Banca Examinadora integrada pelos Professores Doutores: Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues (Presidente da Banca), Matilde Cesiana da Silva (1º Examinador) e Karla Ferraz Lambertz (2º Examinador), os nomes solicitaram algumas exigências que, devido ao seu cumprimento, proferem parecer favorável para aprovação do referido mestrando.

Recife, 03 de junho de 2015.

Prof. Dr. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues
Presidente da Banca Examinadora

CPF

Profª Drª Matilde Cesiana da Silva

CPF

Profª Drª Karla Ferraz Lambertz

CPF

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre me abençoa.

À minha família, principalmente minha esposa Mayara que sempre me apoia.

Às minhas orientadoras professora Sandra Lopes de Souza que me deu oportunidade e professora Rhowena Matos que não mediu esforços para me ajudar nesta caminhada sempre com uma contribuição para meu crescimento.

À equipe de estagiários e pós graduandos orientados pela Profa. Rhowena Matos que são uma verdadeira família e me receberam como tal; Tercya, Matheus, Eloysa, Marília, Caroline, Waleska, Adler, Jefferson e Yohan.

Aos professores e técnicos do Departamento de Nutrição onde fiz a parte experimental do projeto e Djanah do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, meu muito obrigado.

Ao CNPq e à FACEPE pelos auxílios financeiros concedidos para realização

**“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais retornará
ao seu estado original”**

Einstein

RESUMO

Introdução: A desnutrição proteica perinatal interfere na maturação do áreas encefálicas, como hipotálamo e hipocampo, podendo ocasionar modificações tardias nas funções como memória e comportamento alimentar em animais adultos. Portanto, pode modificar os mecanismos de facilitação sináptica realizado pelo sistema serotoninérgico, com mediação do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) nessas áreas. **Objetivo:** Objetivou-se investigar os efeitos a longo prazo da desnutrição hipoproteica sobre a plasticidade sináptica, correlacionando a estimulação do sistema serotoninérgico com os processos de memória e o comportamento alimentar. **Materiais e métodos:** Ratos da linhagem Wistar foram divididos em 2 grupos experimentais de acordo com a dieta fornecida às mães durante gestação e lactação: controle (CTRL, caseína a 17% n= 24) e desnutridos (DESN, caseína a 8%, n= 29). Após o desmame, os filhotes provenientes de cada grupo receberam dieta padrão do biotério. Foi observado a evolução ponderal do 1º ao 180º dias de vida. Avaliou-se a ingestão alimentar e sequência comportamental de saciedade no 30, 80 e 175 dias. Aos 158 dias de vida os grupos foram divididos em subgrupos, segundo o tratamento farmacológico: administração de solução salina (CTRL SAL e DESN SAL: 0,9% NaCl, s.c., n= 24) ou de fluoxetina, um Inibidor Seletivo de Serotonina (ISRS) (CTRL FLU e DESN FLU, fluoxetina 10mg/Kg, s.c, n=24). Avaliou-se a ansiedade aos 170 dias e no intervalo de 175 a 180, observou-se o tempo de exploração de objetos para avaliar a memória de curta e longa duração. Em seguida, os animais foram eutanasiados por decapitação, os tecidos foram retirados e congelados a -80°C para análise da expressão gênica do BDNF, da monoaminoxidase MAO-a e o receptor 5HT1A. **Resultados:** Os animais desnutridos apresentaram uma redução de peso que se manteve mesmo após a aplicação de fluoxetina na idade adulta. Houve diferença no consumo alimentar, observou-se hiperfagia nos animais desnutridos aos 30 e 80 dias, bem como apresentaram retardo do aparecimento de saciedade. Porém, após a aplicação de fluoxetina, aos 175 dias não apresentaram hiperfagia, mas houve adiantamento de saciedade. No teste de memória de longa duração o grupo DESN FLU apresentou uma facilitação nos processos de memória de reconhecimento de objeto, explorando mais objeto o novo. Sobre expressão gênica do receptor serotoninérgico e fatores neurotróficos houve elevação significativa de BDNF, da MAO-A e do receptor 5-HT1A no grupo DESN FLU. Concluimos que o efeito da desnutrição precoce promoveu alterações tardias no perfil ponderal, da memória e do comportamento alimentar. Entretanto, a plasticidade neural apresentou-se maior naqueles animais adultos, submetidos à desnutrição precoce, pois houve modificações tanto moleculares como comportamentais, refletindo sobre os processos de memória de longa duração e sobre o controle homeostático do comportamento alimentar.

Palavras- Chave: Serotonina. Memória. Desnutrição. Comportamento Alimentar.

ABSTRACT

Introduction: Perinatal protein malnutrition interferes with the maturation of the brain areas such as the hypothalamus and hippocampus, which may cause late changes in functions such as memory and feeding behavior in adult animals. Therefore, you can modify synaptic mechanisms to facilitate serotonergic system realized, with mediation of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in these areas. **Objective:** The objective was to investigate the long-term effects of malnutrition on hypoproteic synaptic plasticity, correlating stimulation of the serotonergic system with memory processes and feeding behavior. **Methods:** Wistar rats were divided into two experimental groups according to the diet provided to mothers during pregnancy and lactation: control diet (CD, 17% casein n = 24) and malnourished, low protein (LP, casein to 8%, n = 29). After weaning, the pups from each group received standard diet biotery. The weight gain of the 1st to 180th days of life were observed. We assessed food intake and satiety in the behavioral sequence of 30, 80 and 175 days. On day 158 of life groups were divided into subgroups according to the pharmacological treatment: administration of saline (SAL CD and SAL LP 0.9% NaCl, sc, n = 24) or fluoxetine, a selective of serotonin selective reuptake inhibitor (FLU CD and FLU LP, fluoxetine 10 mg / kg, sc, n = 24). He evaluated the anxiety at 170 days and in the range 175-180, we observed the objects operating time to assess the short and long term memory. Then the animals were sacrificed by decapitation, tissues were removed and frozen at -80 for analysis of gene expression of BDNF, monoamine oxidase-A (MAO-A) and 5HT1A receptor. **Results:** The malnourished animals showed a weight reduction that remained even after application of fluoxetine in adulthood. There were differences in food intake, overeating was observed in animals malnourished at 30 and 80 days and showed a delayed onset of satiety. However, after the application of fluoxetine to 175 days they did not show hyperphagia, but there was satiety advance. Into long-term memory test FLU LP group showed a facilitation in object recognition memory processes, exploring the new object more. On gene expression of serotoninergetic receptor and neurotrophic factors BDNF was significantly elevated, MAO-A and 5-HT1A receptor in FLU LP group. We conclude that early malnutrition effect promoted late changes in weight profile, memory and feeding behavior. However, the neural plasticity was higher in those adult animals submitted to early malnutrition, as there was both molecular and behavioral changes, reflecting on the long-term memory processes and the homeostatic control of feeding behavior

Key- words: Serotonin. Memory. Malnutrition. Feeding Behavior

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- COMPOSIÇÃO DA DIETA EXPERIMENTAL	30
TABELA 2- DISTRIBUIÇÃO CALÓRICA DA DIETA PADRÃO	31
TABELA 3- TABELA DOS PRIMERS	35
TABELA 4- TABELA MÉDIA DE PESO.....	40

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

FIGURA 1 – MODELO EXPERIMENTAL	30
FIGURA 2 – DESENHO EXPERIMENTAL.....	30
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO DA PESAGEM DOS ANIMAIS	31
FIGURA 4 – LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	34
FIGURA 5 – CAMPO ABERTO E OBJETOS DO TESTE DE MEMÓRIA.....	37
FIGURA 6 – GRÁFICO DO EVOLUÇÃO PONDERAL.....	39
FIGURA 7 – GRÁFICO DO GANHO PONDERAL APÓS APLICAÇÃO DE FLUOXETINA	40
FIGURA 8 – GRÁFICO DA INGESTÃO ALIMENTAR AOS 30 E 80 DIAS.....	41
FIGURA 9 – GRÁFICO DA INGESTÃO ALIMENTAR AOS 175 DIAS	42
FIGURA 10 - GRÁFICO DA SEQUÊNCIA COMPORTAMENTAL DE SACIEDADE 30 E 80 DIAS	43
FIGURA 11- GRÁFICO DA SEQUÊNCIA COMPORTAMENTAL DE SACIEDADE 175 DIAS	44
FIGURA 12- GRÁFICO DE DURAÇÃO DA ALIMENTAÇÃO 30 E 80 DIAS.....	45
FIGURA 13 - GRÁFICO DE DURAÇÃO DA ALIMENTAÇÃO 175 DIAS.....	46
FIGURA 14 – GRÁFICO DO TESTE DE ANSIEDADE.....	47
FIGURA 15 – GRÁFICO DA EXPRESSÃO GÊNICA 5-HT1A	48
FIGURA 16 – GRÁFICO DA EXPRESSÃO GÊNICA MAO	49
FIGURA 17 – GRÁFICO DA EXPRESSÃO GÊNICA BDNF	50
FIGURA 18 – GRÁFICO DO TESTE MEMÓRIA: TREINO.....	51
FIGURA 19 – GRÁFICO DO TESTE MEMÓRIA: MEMÓRIA CURTA DURAÇÃO	52
FIGURA 20 – GRÁFICO DO TESTE MEMÓRIA: MEMÓRIA LONGA DURAÇÃO	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

5-HT: 5-hidroxi-triptamina (serotonina)

5-HT_{1A}: receptor de 5-hidroxi-triptamina da família 1 A

ISRS: inibidor seletivo de recaptura da serotonina

TrKB : tirosina kinase B

DOHaD: origem desenvolvimentista da saúde e da doença

SC: subcutâneo

SCS: sequência comportamental de saciedade

SERT: transportador de serotonina

IGF1: fator de crescimento da insulina

CREB: do inglês, “cAMP response element-binding”, proteína de ligação que responde ao AMP_C

MAO-A: monoamino oxidase A

AMP_C: adenosina monofosfato cíclica

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

ERK: quinase de receptor extra celular

POMC: pro-ópio-melanocortina

CART: transcrito regulado por cocaína e afetamina

AGRP: proteína relacionada agouti

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3	HIPÓTESE.....	27
4	OBJETIVOS.....	27
4.1	OBJETIVO GERAL.....	27
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
5.1	AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO PONDERAL.....	31
5.2	AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR.....	32
5.3	AVALIAÇÃO DA SEQUENCIA COMPORTAMENTAL DA SACIEDADE.....	32
5.4	TESTE DE ANSIEDADE.....	33
5.5	EXPRESSÃO GÊNICA: PCR EM TEMPO REAL.....	34
5.6	TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM CAMPO ABERTO.....	37
6	RESULTADO.....	38
6.1	EFEITOS TARDIOS DA DESNUTRIÇÃO PRECOCE E DA MANIPULAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO SOBRE A EVOLUÇÃO PONDERAL.....	38
6.2	EFEITOS TARDIOS DA DESNUTRIÇÃO PRECOCE E DA MANIPULAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO SOBRE A INGESTÃO ALIMENTAR.....	41
6.3	EFEITOS TARDIOS DA DESNUTRIÇÃO PRECOCE E DA MANIPULAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO SOBRE A SEQUÊNCIA COMPORTAMENTAL.....	42
6.4	EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PRECOCE E APLICAÇÃO DE FLUOXETINA SOBRE A ANSIEDADE.....	46
6.5	EFEITOS TARDIOS DA DESNUTRIÇÃO PRECOCE E DA MANIPULAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA.....	47
6.6	EFEITO TARDIO DA MANIPULAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINERGICO SOBRE A MEMÓRIA DE CURTA E LONGA DURAÇÃO.....	50
7	DISCUSSÃO.....	54
8	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	ANEXOS.....	84

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central se desenvolve em um processo dinâmico de síntese de componentes celulares, neurogênese e gliogênese, migração e diferenciação celular, aumento do volume das células e por último, maturação morfofuncional (Dobbing e Sands, 1985; Morgane, Mokler *et al.*, 2002). Vários fatores genéticos e não genéticos podem interferir nesse processo e conseqüentemente podem alterar as capacidades fisiológicas do organismo (Morgane, Mokler *et al.*, 2002). Entre os não genéticos, exógenos, a nutrição é um dos fatores principais que influencia os eventos de desenvolvimento no cérebro (Morgane, Austin-Lafrance *et al.*, 1993).

Estudos mostram que déficit de nutrientes, especialmente de proteína, durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso induz alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas do crescimento cerebral com impactos durante toda vida (Morgane, Austin-Lafrance *et al.*, 1993; Dauncey e Bicknell, 1999). O mecanismo subjacente a esse processo parece estar associado aos efeitos irreversíveis da desnutrição no período crítico do desenvolvimento, alterando o padrão de eventos celulares com conseqüências deletérias tanto na aquisição de padrões fisiológicos maduros do organismo, quanto para a ocorrência de eventos metabólicos (Lucas 1991).

As alterações no início da vida podem provocar não só patologias na idade adulta, como também, podem ser transmitidas de maneira transversal para a geração seguinte (Barker 2007; Hernandez 2008; Vickers 2014). Fatores externos como stress, hipóxia, atividade física e nutricional estão diretamente relacionados a um ambiente que predispõe o desenvolvimento de doenças crônicas na idade adulta, envolvendo também alteração de expressão de genes (Lucas 1991; Gluckman e Hanson, 2004; Baker 2007; Vickers 2014), pode modificar assim o fenótipo do organismo. Esses aspectos são norteadores da área de estudo atualmente conhecida como Origem desenvolvimentista da saúde e da doença (do inglês, “Developmental Origins of Health and Disease” - DOHaD).

Dados na literatura científica durante as últimas décadas vêm ratificando essa relação sobre os diversos sistemas do organismo como alteração endócrina (Remacle, Dumortier *et al.*, 2007; Vieau, Sebaai *et al.*, 2007), alterações musculoesqueléticas (Bayol, Jones *et al.*, 2004; Toscano, Manhaes-De-Castro *et al.*, 2008), comprometimento da arquitetura de componentes do sistema nervoso (Cintra, Aguilar *et al.*, 1997; Wang e Xu, 2007; Mehedint, Craciunescu *et al.*, 2010), entre outros.

Especificamente, as alterações envolvendo a memória, há comprometimento estrutural e na plasticidade sináptica sob efeitos da restrição de nutrientes no período perinatal no sistema nervoso. Entre outros estudos pode-se destacar: atraso na maturação glial do corpo caloso (Lai *et al.*, 1980), déficit no número de células granulares do giro denteado (Cintra *et al.*, 1990; Stead *et al.*, 2006; Jahnke e Bedi, 2007), bem como diminuição de novos neurônios no giro denteado (Matos *et al.*, 2011). Essas mudanças podem favorecer alterações nos circuitos neuronais, comprometendo a lógica, a memória e os processos cognitivos (Kawaguchi e Hama, 1988, Valadares e De Sousa Almeida, 2005), como também repercutir sobre níveis de expressão dos fatores neurotróficos no hipocampo (Coupe *et al.*, 2009).

Em outras áreas encefálicas, como o hipotálamo, evidencia-se que a desnutrição hipoproteica perinatal provoca, no adulto, alterações da expressão gênica de neuropeptídeos relacionados ao controle homeostático do comportamento alimentar (Orozco-Solís *et al.*, 2011, Rocha *et al.*, 2014), assim como dos sensores nutricionais hipotalâmicos (Orozco-Solís *et al.*, 2013; Guzmán-Quevedo *et al.*, 2013). Nesses indivíduos acometidos por tais mudanças podem ser susceptíveis ao estresse ou reduzir a responsividade à fármacos psicoativos (Lopes de Souza *et al.*, 2008, Morgane *et al.* 2002).

Outrossim, do ponto de vista experimental, observa-se que há uma regulação promovido pelas mudanças no sistema da serotonina em indivíduos desnutridos. Estudos têm demonstrado que o tratamento com inibidor de recaptura da serotonina (ISRSs), como a fluoxetina promove déficit no crescimento somático, desenvolvimento sensório-motor e comportamento alimentar em ratos (Halford e Blundell, 1996; De Souza, Nogueira *et al.*, 2004). Considerando que os ISRSs são

utilizados freqüentemente para o tratamento de depressão materna durante a gestação e/ou lactação, os efeitos do aumento da serotonina no encéfalo humano que passaram por uma agressão nutricional nessa fase da vida permanecem desconhecidos (Oberlander, Eckstein Grunau *et al.*, 2002).

Os achados conduzem a hipótese de que a atividade serotoninérgica é importante para os fenômenos relacionados com a plasticidade neural em ratos desnutridos. Por exemplo, o tratamento com inibidor de recaptura da serotonina promove déficit no crescimento somático, desenvolvimento sensorio motor e comportamento alimentar em ratos tanto na idade precoce (Halford e Blundell, 1996; Deiró *et al.*, 2005, Souza *et al.*, 2004), como na vida adulta (Lopes de Souza *et al.*, 2008). Assim como, pode induzir modificações na circuitaria neuronal do hipocampo (Gerozissis *et al.*, 2001; Barbas *et al.*, 2003; Jensen *et al.* 2010).

Sabe-se que o tratamento crônico com a fluoxetina em animais normonutridos também podem induzir rearranjos estruturais e mudanças na transmissão sináptica da circuitaria hipocampal, tais como neurogênese no adulto, plasticidade axonal e dendrítica nos neurônios do giro denteado (Wiggins *et al.*, 1984; Almeida *et al.*, 1996) e remodelamento das espinhas dendríticas (McAvoy *et al.*, 2015).

Outros dados da literatura demonstram que mudanças na transmissão serotoninérgica estão associadas com alterações na proliferação celular. A ativação de subtipos de receptores 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A e 5-HT2C estão seletivamente envolvidos nessa proliferação, indução de novas células neurais (Brezun and Daszuta, 2000). Além disso, no cérebro maduro a serotonina participa da sinalização em circuitos neuronais, facilitando processos de memória e aprendizado, o que já é evidenciado (Molodtsova *et al.*, 2008), porém dados sobre seus mecanismos em um cérebro já desenvolvido e que foi submetido a desnutrição hipoproteica, durante período crítico do desenvolvimento, são escassos.

A serotonina, como outros fatores moleculares, como as neurotrofinas também podem modificar a proliferação celular, participar de eventos de memória e de neurogênese no adulto em camadas celulares do hipocampo. Dentre as neurotrofinas está o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Bellar *et al.*, 2011) que regulam os eventos de memória (Wang e Xu, 2007) e há evidências que o

BDNF pode modular elementos pré e pós-sinápticos relacionados ao sistema serotoninérgico (Deltheil *et al.*, 2008), que consequentemente poderá interferir no processo de aprendizagem e da capacidade cognitiva (Molodtsova *et al.*, 2008), bem como no comportamento alimentar. Dessa forma, como um organismo adulto, desnutrido na fase perinatal, possuem respostas moleculares na plasticidade sináptica sobre um quando há um maior estímulo sobre a modulação serotoninérgica? Ocorrerá repercussões sobre o comportamento alimentar e de memória?

2 REVISÃO DE LITERATURA

A desnutrição é um dos fatores de morbidade e mortalidade na infância sendo responsável por 45% das mortes de crianças no mundo (Oruamabo, 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a desnutrição é considerada uma das cinco principais causas de mortalidade infantil (Valle, Santos *et al.*, 2004). No Brasil, aproximadamente 31% da população é desnutrida (Monte, 2000) e estudos mais recentes apontam para um processo de redução da desnutrição em todo o país (Coutinho, Gentil *et al.*, 2008), devido a transição nutricional (Batista-Filho e Rissin, 2003, Ramires *et al.*, 2014). Apesar de melhorias sócio-econômicas nos últimos anos, a desnutrição continua a ser uma preocupação dos países em desenvolvimento. A desnutrição provoca um aumento da mortalidade e da morbidade, diminuição do desenvolvimento físico e intelectual, baixa produtividade e danos a curto e longo prazo a saúde (Spieldenner, 2010).

O sistema nervoso possui células que têm a capacidade para modificar sua organização morfo-funcional em resposta a mudanças internas ou demandas externas, caracterizando-se assim a plasticidade cerebral. As etapas de crescimento e desenvolvimento das funções e estruturas do organismo dependem de uma alimentação adequada (Gniuli, Calcagno *et al.*, 2008). As fases de gestação, lactação e primeira infância são caracterizadas por crescimento rápido, maturação de órgãos e sistemas, replicação e diferenciação celular, sendo chamado de período crítico do desenvolvimento (Dobbing e Sands, 1985). Neste intervalo de tempo o organismo se encontra mais vulnerável a insultos ambientais (Adams, Barone *et al.*, 2000). No sistema nervoso dos mamíferos, esse período crítico de desenvolvimento compreende o período pré-natal e início da fase pós-natal, com a maturação durante

a lactação (Smart, 1981; Carlson, Stead *et al.*, 2007).

Em humanos e roedores a aceleração do crescimento do encéfalo é mais evidente no último terço da gestação, sendo que humanos a curva de crescimento cerebral apresenta um pico coincidindo com o nascimento, enquanto que em ratos esse pico ocorre na segunda semana pós-natal (Morgane, Mokler *et al.*, 2002). Estudos mostram que déficit de nutrientes, especialmente de proteína, durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso induz alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas do crescimento cerebral com impactos a longo prazo (Morgane, Austin-Lafrance *et al.*, 1993; Dauncey e Bicknell, 1999).

Um dos primeiros trabalhos, que destacou as origens fetais das doenças não transmissíveis nos adultos, foi um estudo populacional em Hertfordshire, Inglaterra, de Hales e Barker (1991), demonstrando uma relação entre o baixo peso ao nascer e o aumento da taxa de mortalidade por doença isquêmica do coração, a intolerância à glicose e a diabetes tipo 2. Isso levou à hipótese do Fenótipo poupador, sobre a ideia proposta de que a má nutrição materna pode induzir adaptações fetais que produzem mudanças permanentes no metabolismo da insulina e da glicose, aumentando o risco de desenvolver a síndrome metabólica na idade adulta (Hales e Barker, 2001).

Uma hipótese mais recente é a resposta adaptativa preditiva (do inglês, "Predictive Adaptive Response"), propõe-se que o feto realiza adaptações na vida intrauterina ou durante o período de desenvolvimento pós-natal precoce, com base no ambiente previsto pós-natal (Gluckman e Hanson, 2004a). Quando a resposta adaptativa preditiva é apropriada o fenótipo será adaptado, no entanto, quando os ambientes previstos e reais não coincidem, a doença se manifesta (Gluckman e Hanson, 2004 a, b). A programação fetal ou plasticidade fenotípica corresponde a uma tentativa do feto de adaptar-se às condições adversas encontradas no útero (Gluckman e Hanson, 2004 a, b). Estas adaptações podem ou não ser benéficas na idade adulta, tornando-se prejudicial, por exemplo da dieta hipercalórica, que pode favorecer o aparecimento de obesidade (Veloska *et al.*, 2011).

A programação fetal pode ocorrer através de uma adaptação dos sistemas orgânicos a uma situação de má nutrição precoce. Os sistemas vascular, endócrino

e renal tem sua função e estrutura alteradas e estas alterações permanecem até a idade adulta. Para Barker et al, 2007, esta falta de nutrientes no início da vida tem como consequência o desenvolvimento de doenças crônicas como hipertensão, diabetes e obesidade. Em estudos experimentais com ratos, a desnutrição durante a gestação leva a baixo peso ao nascer e, após a fase da lactação, estes animais apresentam crescimento acelerado devido ao chamado efeito “catch up”, ou seja ganharam mais peso do que os animais que não sofreram a desnutrição (Gluckman e Hanson, 2004a). Outros estudos produziram resultados semelhantes, demonstrando ainda distúrbios metabólicos quando uma dieta altamente palatável ou de alto teor de gordura é introduzida após o nascimento, comprovando a alteração metabólica no período crítico (Veloska et al., 2011; Jang et al., 2014).

A desnutrição proteica na fase pré-natal interfere no desenvolvimento dos sistemas orgânicos principalmente o sistema nervoso. Na fase fetal, o sistema nervoso se desenvolve rapidamente e necessita de uma variedade de nutrientes e fatores de crescimento, sendo que este suporte é fornecido através da placenta. Assim, quando a mãe passa por processo de desnutrição, interfere diretamente no desenvolvimento fetal (Morgane, 1993). Sendo o suprimento adequado de nutrientes imprescindível para a manutenção do crescimento e desenvolvimento funcional de todos os sistemas orgânicos, a desnutrição se mostra como um dos principais fatores não genéticos capazes de afetar o desenvolvimento do sistema nervoso (Levitisky e Barnes, 1972; Morgane, 1993).

Os efeitos da programação fetal no sistema nervoso incluem desequilíbrio na regulação nos hormônios e/ou neurotransmissores reguladores dos processos de memória e do controle do comportamento alimentar. Um dos principais neuromoduladores é a serotonina, envolvida em vários processos fisiológicos tanto no sistema nervoso como fora dele e, junto com outros sistemas, como dopaminérgicos, estão relacionados com o tratamento de distúrbios cognitivos e alimentares. Estes sistemas podem ter seu desenvolvimento e integração alterados por agressões no período pré-natal (Manjarrez-Gutierrez et al, 2012).

Estas agressões podem acarretar modificações neuroquímicas (Winick et al., 1972), inclusive dos níveis de neurotransmissores, como por exemplo, da serotonina

(Morgane et al., 1978; Chen et al., 1995), com repercussões na excitabilidade (Guedes et al., 1996; Rocha-de-Melo et al., 1997) e no comportamento (Medeiros et al., 2001; Manhães-de-Castro et al., 2001; Lopes de Souza, 2008) e também em outros parâmetros (De Oliveira et al, 2002; De Moura et al, 2007; Toscano et al., 2008; Moura et al, 2008;). Mesmo períodos curtos de restrição alimentar alteram o metabolismo da serotonina (Ishida et al, 1997). Foi observado que as repercussões sobre o sistema serotoninérgico se estendem até a idade adulta (Chen et al, 1995).

Áreas encefálicas como o hipotálamo, importante região que possui conexões e neuropeptídeos que regulam o controle homeostático do comportamento alimentar e do controle do peso (Plagemann et al, 2000), apresenta seu período crítico de diferenciação e maturação durante as três primeiras semanas de vida pós-natais (Dorner et al, 1985; Pozzo-Miller e Aoki 1992). Vários neurotransmissores, dentre os quais, pode-se enfatizar a serotonina tem sido descrito como o neuromodulador que regula a circuitaria hipotalâmica inibindo a ingestão alimentar (Elmqvist et al, 1995; Inui, 2000), bem como no processo de memória como por exemplo eventos mediados pelas neurotrofinas. Atualmente, vem estabelecendo-se que seus níveis, tais como, IGF-I (fator de crescimento como a insulina tipo 1) (Bellar *et al.*, 2011) podem participar de eventos de memória (Wang e Xu, 2007) e há evidências que o BDNF pode modular elementos pré e pós-sinápticos relacionados ao sistema serotoninérgico (Deltheil *et al.*, 2008), além dos processos celulares que envolvem o controle do ingestão alimentar (Hashimoto et al., 2005).

A ingestão alimentar é uma etapa do comportamento alimentar e refere-se à interação de diversos processos que envolvem a escolha do alimento, início e término da alimentação, a frequência, o tempo e o tamanho da refeição (Morton et al., 2006), sendo regulado por um sistema complexo de mecanismos homeostáticos e hedônicos através da integração de sinais do sistema nervoso central e órgãos periféricos, que se interrelacionam para modular a resposta à ingestão de nutrientes (Swart et al., 2002).

O hipotálamo é uma dessas áreas envolvidas. É região do diencefalo, constituído de núcleos e áreas que se interligam para promover a regulação do comportamento alimentar: o núcleo paraventricular (PVN), Hipotálamo Ventromedial

(VMH), Hipotálamo Dorsomedial (DMH), Hipotálamo Lateral (LH) e em particular, o Núcleo Arqueado (ARC) tem um proeminente papel na detecção de reservas de energia, e consequentemente na regulação da ingestão de alimentos, sendo um dos núcleos hipotalâmicos mais estudados (Aponte et al., 2011).

O ARC é posicionado em torno do terceiro ventrículo, onde a barreira hemato-encefálica é particularmente permeável, e isso o torna idealmente posicionado para detectar e responder a uma miríade de sinais periféricos como hormônios e nutrientes (Rodriguez; Blázquez; Guerra, 2010). O ARC contém duas populações de neurônios importantes: as produtoras do Neuropeptídeo Y (NPY) que co-expressam a Proteína Relacionada ao Agouti (AGRP), neuropeptídeos orexígenos; e as que produzem a Pro-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART). O POMC ainda é precursor do hormônio estimulante α -melanócito (α -MSH) que são neuropeptídios anorexígenos (Dietrich; Horvath, 2009; Simpson; Martin; Bloom, 2009).

As populações neurais do ARC, que produzem NPY e POMC, recebem informações e são regulados de formas opostas por sinais de status de energia periférica. 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 provoca efeito oposto (Zhan et al., 2013; Diano et al., 2011; Schwartz et al., 2000). A estimulação e/ou inibição dos neuropeptídeos depende do balanço energético corporal, contribuindo assim para desencadear respostas anabólicas ou catabólicas (Valassi et al., 2008).

Os neuropeptídeos e o sistema hormonal hipotalâmicos do ARC são componentes fundamentais, porém outras moléculas e outras áreas hipotalâmicas atuam em conjunto para integrar e disseminar os sinais celulares envolvidos na regulação do comportamento alimentar e da homeostase energética. A ativação de neurônios POMC e AGRP/NPY, chamados de primeira ordem, ocorre de forma combinada e simultânea. A liberação de POMC atua estimulando os neurônios de segunda ordem do HL a produzirem o neuropeptídeo Hormônio α -melanócito estimulante (α -MSH), que se liga ao seu receptor (MC4R) e em conjunto inibem a alimentação e promovem o gasto de energia. Concomitantemente, os neurônios

hipotalâmicos AGRP/NPY liberam neuropeptídeo AGRP para inibir a liberação α -MSH. O NPY é considerado um potente estimulador fisiológico do apetite conhecido em mamíferos (Lu et al., 2013).

Dados na literatura mostram que esses neuropeptídeos podem ser alterados na vida adulta após desnutrição hipoproteica perinatal. Além disso a desnutrição pré-natal é um tipo de estresse nutricional que também pode programar mudanças no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e circuitos de alimentação (Spencer, 2013). Na literatura comprovam-se os efeitos da desnutrição perinatal, induzindo a plasticidade fenotípica em várias regiões hipotalâmicas, confirmando que a plasticidade pode ocorrer no hipotálamo seja por alteração nas sinapses hipotalâmicas (Plagemann et al., 2000), como também por alterações dos sensores nutricionais e assim, induzirem modificações na regulação do comportamento alimentar (Ferno, 2011).

Nesse aspecto, foi observado que ratos submetidos à restrição proteica durante a gestação e a lactação apresentam, depois do desmame, hiperfagia e uma preferência para alimentos com alto teor de gordura (Desai et al., 2007; Lopes de Souza et al., 2008). Em uma análise mais profunda do comportamento alimentar, verificou-se que esta hiperfagia ocorre por retardo no aparecimento da saciedade acompanhado por aumento no tamanho da refeição (Orozco-sólis et al., 2009). Somado a essas observações comportamentais, os animais desnutridos apresentam aumento do nível de expressão no hipotálamo do NPY e AGRP que são peptídeos orexígenos (Ikenasio-thorpe et al., 2007; Orozco-sólis et al., 2009), e da diminuição do nível de expressão do POMC, peptídeo anorexígeno. (Orozco-sólis et al., 2009).

Sabe-se que a ação regulatória da serotonina sobre essa circuitaria hipotalâmica provoca inibição da ingestão alimentar através da ativação de tipos de receptores: 5HT_{1B}, 1C e 2 (Curson, 1990). Resultados em estudos utilizando agonistas desses subtipos de receptores, RU 24969 e 1-(3-chlorofenil) piperazina (mCPP) causam hipofagia nos indivíduos no estado alimentado e durante a restrição alimentar (Kennett et al., 1987). Dados de Heisler et al. (2006), evidenciaram que a serotonina age em receptores 5-HT_{1B}, presentes nos neurônios que produzem NPY, tendo a resposta de inibição da neuronal e da liberação do GABA. Em contrapartida,

estimula os neurônios que produzem POMC a liberarem α -MSH, através da ligação com os receptores 5-HT_{2C}, tendo como resposta a hipofagia (Lam et al., 2008), similar às respostas dos sinais adipocitários (Heiler et al., 2006).

O estabelecimento da rede neuronal hipotalâmica em roedores ocorre predominantemente após o nascimento (Kagotani et al., 1989; Grove & Smith, 2003). Entretanto, quando ocorre uma restrição proteica durante a gestação e lactação há redução do número de neurônios imunopositivos para o NPY (Plagemann et al., 2000a). Por conseguinte, restrição calórica (Vickers et al., 2000) ou proteica (Bellinger et al., 2006) seguido de supernutrição, estimula o aumento de ingestão alimentar, provocando assim a hiperfagia. A desnutrição perinatal altera a regulação da serotonina sobre o comportamento alimentar e é dependente do tipo de desnutrição, como também em que período ocorre essa restrição. A desnutrição perinatal altera a regulação da serotonina sobre o comportamento alimentar e é dependente do tipo de desnutrição, como também em que período ocorre essa restrição. A restrição proteica durante o desenvolvimento do sistema nervoso atenua a ação inibitória da serotonina sobre a ingestão alimentar via dessensibilização do receptor 5HT_{1B}, reduzindo o efeito da serotonina, cujo efeito é de inibir o consumo alimentar, assim resultando no comportamento hiperfágico nesses animais (Lopes e Souza et al, 2008).

Recentemente, evidências na literatura científica indicam também uma função importante do BDNF na via hipotalâmica, participando do controle do peso corporal e da homeostase da energia (Cordeira; Rios, 2011). Gray et al (2006) verificaram que ratos com deficiência de BDNF são obesos. Em outros trabalhos da literatura, observa-se que a administração central de BDNF induz a supressão do apetite e perda de peso (Rothman et al., 2012; Wang et al., 2007b,c, 2010) e aumenta a taxa metabólica de repouso (Wang et al., 2007a, 2010). Portanto, considera-se que o BDNF pode reduzir a ingestão de alimentos, seja através da alteração sináptica ou por modificação na expressão de receptores nos núcleos hipotalâmicos (Cordeira; Rios, 2011) via processos que envolvem o sistema serotoninérgico.

A serotonina modula o comportamento alimentar e outras funções, como a memória, assim como outras funções, devido às suas projeções neurais originárias

nos núcleos da rafe atingirem todas as áreas encefálicas (Galter e Klaus Unsicker, 2000). Para os neurônios serotoninérgicos terem seu fenótipo estabelecido, é necessário a co-ativação resultante da sinalização dependente da proteína de ligação a adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e a ativação dos receptores tirosina quinase B (TrkB) (Galter e Unsicker, 2000). A influência do BDNF no fenótipo, plasticidade estrutural e função dos neurônios serotoninérgicos têm sido documentadas em estudos *in vitro* e *in vivo*, que desempenha um papel na maturação dos neurônios serotoninérgicos. Isto acontece através da modulação de vias intracelulares ativadas pela sua ligação aos seus receptores de alta afinidade, o TrkB (Homberg, 2014).

Para que os comportamentos surjam é necessário que haja a plasticidade neural, exemplos da sináptica seriam processos de memória e aprendizado. O BDNF tem uma função essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso e plasticidade sináptica, está relacionado com processos cognitivos como a memória (Luine et al., 2013, Bekinschtein et al., 2013), através da serotonina, que modula as sinapses glutamatérgicas no hipocampo (Rubio et al., 2013). No hipocampo, a circuitaria que envolve os processos de memória tem a participação dos receptores 5-HT_{1A} (Izquierdo et al., 1998). Estudos sobre a aprendizagem e a memória em modelos animais têm identificado produtos de genes que são necessários para que esses processos ocorram, entre eles está o BDNF, um pequeno dímero de proteína e o seu principal receptor, o TrkB, os quais são amplamente expressos no cérebro de mamíferos adultos (Murer, Yan e Raisman-Vozari, 2001).

Dados na literatura científica indicam que alterações de sinalização do BDNF, sugere déficits cognitivos. Estes déficits têm sido associados as alterações da neurogênese, sinaptogênese e plasticidade sináptica (Dringenberg et al., 2014). O declínio cognitivo em doenças neurodegenerativas pode ser resultante do declínio da função sináptica devido à diminuição da sinalização do BDNF (Liu et al., 2014).

Em relação à sinalização, em estudos pré-clínicos sugerem que aplicação de inibidores seletivos de recaptura da serotonina (ISRS) aumentam a cognição e estudos experimentais mostram que aumentam os níveis de BDNF no soro de ratos com demência provocada por lesão vascular encefálico (Liu et al., 2014). Ademais, outras pesquisas mostram que a administração de ISRS aumenta a expressão da

proteína de ligação responsiva AMPc (CREB) e a neurogênese no hipocampo de ratos adultos (Nibuya et al., 1996; Malberg et al., 2000). Este aumento também foi encontrado no córtex frontal e pré-frontal, embora a magnitude e especificidade anatômica dessas alterações podem depender de um certo número de variáveis, como: duração do tratamento, dosagem e tipo de fármaco envolvido (Calabrese et al., 2009). Entretanto, o mecanismo pelo qual os níveis de BDNF aumentam após aplicação dessa categoria de fármacos, ainda continuam desconhecidos (Liu et al., 2014).

O BDNF se liga à membrana e ativa duas diferentes proteínas receptoras transmembranas: a tropomiosina relacionada à quinase TrkB, receptor com alta afinidade, e a pan neurotrofina p75NTR, receptor com baixa afinidade. Praticamente todos os efeitos do BDNF são atribuídos à ativação do receptor TrkB. O Pro BDNF, p75NTR e isoformas de TrkB podem ser consideradas como mecanismos reguladores inibidores da associação do BDNF/TrkB, com consequentes efeitos na plasticidade sináptica, talvez para a memória (Zagaar et al., 2013). Em contrapartida, a ativação do receptor TrkB pelo BDNF inicia três grandes vias de cascatas de sinalização: fosfolipase Cy (PLC), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a cascata regulada por quinases (ERK). A ativação da via fosfolipase Cy (PLC) está relacionada ao aumento de Ca^{++} intracelular e à ativação da calmodulina quinase dependente de Ca^{++} (CaMKII). A elevação de Ca^{++} intracelular é resultante da sinalização do BDNF na célula pós-sináptica e além disso, a CaMKII ativa o fator de transcrição CREB, ativando desse modo a transcrição do BDNF (Choi et al., 2009).

Assim, o BDNF pode regular a expressão através da ativação da sinalização da CaMKII e também pode ativar a via PI3K através da interação direta entre IRS1/IRS2 e PI3K, a qual medeia os efeitos de proteção do BDNF em vários tipos de células neuronais *in vitro*, incluindo neurônios do hipocampo. O BDNF também facilita a tradução de proteínas locais por ativação dos dendritos do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) via PI3K (Alonso, Vianna, Izquierdo, et al., 2002). A ativação diferencial e o papel dessas cascatas na sobrevivência neuronal irão depender do tipo de célula e o envolvimento de estímulos fisiológicos ou patológicos específicos. O BDNF induz efeitos rápidos na transmissão sináptica e na excitabilidade da membrana, principalmente através da ativação dessas vias de

sinalização e pode induzir à liberação pré-sináptica de glutamato e GABA através da fosforilação TrkB/ERK (Jovanovic et al., 2000).

O BDNF é estudado extensivamente pela sua função na transmissão sináptica e plasticidade no hipocampo, uma região do cérebro crítica para aprendizagem, memória e comportamentos afetivos (Edmann et al., 2014). Estes processos envolvem indução de cascatas, sistema de segundos mensageiros, síntese proteica e alteração na expressão gênica para que aconteça o armazenamento da memória de longo prazo. Alterações estruturais da complexidade dendríticas favorece o armazenamento a longo prazo de memórias remotas (Wartman e Holand, 2014).

A ligação do BDNF com seu receptor induz a formação da LTP (do inglês, “later long term potentiation”, LTP) em sinapses glutamatérgicas em várias regiões do cérebro, como hipocampo (Lesli et al., 2012). Na sua forma madura é armazenado neurônios glutamatérgicos e liberado em resposta a estímulos utilizados para induzir LTP,, há evidências anatômicas e funcionais do armazenamento e liberação de BDNF pré e pós-sináptico nestes neurônios (Panja et al., 2014). Além disso, administração de fluoxetina, um antidepressivo (da categoria dos ISRS), promove modificações estruturais e funcionais nos neurônios hipocámpais (Rubio et al., 2013). A plasticidade neural para acontecer também depende da disponibilidade de BDNF para induzir a LTP. A LTP não ocorre apenas nas sinapses excitatórias do hipocampo, mas em outras sinapses em uma variedade de regiões do cérebro, incluindo o córtex, a amígdala e o cerebelo (Zagrebelsky e Korte, 2013).

Resultados dos estudos utilizando dieta hipoproteica em ratos jovens mostraram que há uma redução dos níveis protéicos de BDNF e alteração nos testes de memória espacial, utilizando o labirinto aquático de Morris (Wang e Xu, 2007). Em outros dados a restrição alimentar aumenta células positivas ao BDNF no estágio inicial neonatal e depois há um declínio da expressão em regiões hipocámpais (Coupé et al., 2009). Contudo, quando a desnutrição está associada ao treinamento físico, a desnutrição aplicada em ratos hipertensos, promove um efeito sinérgico entre as duas intervenções ambientais, levando a prevenção do declínio

cognitivo e a uma regulação positiva de BDNF. Isto sugere que a combinação de desnutrição com outros indutores positivos da plasticidade do cérebro, pode fornecer estratégias mais eficazes para prevenir o declínio cognitivo (Murphy et al, 2014).

A prole submetida à dieta hipoproteica (8% caseína) apresenta diminuição visuo-espacial e alterações da memória. Essas alterações podem ser repercutidas no período pós-natal até a idade adulta. Outrossim, a desnutrição proteica precoce também promove a redução de resposta da potenciação de longa duração, um processo da plasticidade sináptica, a longo prazo (Hernandez et al., 2008). Outros estudos evidenciam que a desnutrição hipoproteica altera eventos maturacionais no cérebro, resultando em alterações gênicas no córtex pré-frontal e hipocampo, que podem aumentar o risco de transtornos mentais (Xu et al., 2014) e modificar o comportamento alimentar. Dados ratificam essa hipótese, pois após oferta de dieta com restrição calórica de 70% para mãe no período pré-natal e lactação, observa-se, na prole, alterações cognitivas e habilidades motoras (Akitake, 2014).

Diante desse contexto, é de particular interesse, tanto em termos clínico e experimental, compreender os mecanismos subjacentes que podem estar afetando as populações em fase de transição nutricional. Desta forma, torna-se necessário conhecer aspectos plásticos no sistema nervoso de indivíduos desnutridos precocemente, podendo interferir no comportamento alimentar e memória através da manipulação serotoninérgica na idade adulta. Considerando-se que a desnutrição interfere diretamente na ação do BDNF e no sistema serotoninérgico. Além disso, ao se propor a investigação comportamental, celular e molecular de mecanismos-chaves para o controle do comportamento alimentar e os aspectos cognitivos em modelos de programação metabólica, o presente estudo tem, portanto, interesse socioeconômico para o Brasil e, do ponto de vista científico, sai dos aspectos descritivos, base para a teoria de Hales e Baker (1992, 1998), para tentar compreender os mecanismos moleculares, fisiológicos e comportamentais acerca do problema. O comportamento alimentar tem particular interesse por ser um fator determinante para o desenvolvimento geral dos indivíduos, e pela incompleta compreensão da resposta de seus mecanismos de controle às agressões na vida precoce. Em contrapartida, para que os comportamentos surjam são necessários processos plásticos neurais como a memória e a aprendizagem, uma vez que é

sabido que esses processos são alterados em indivíduos acometidos pela desnutrição.

3 HIPÓTESE

Um organismo adulto, desnutrido na gestação e lactação, altera o seu comportamento alimentar, aumentando a ingestão alimentar, retardando o aparecimento da sequência comportamental de saciedade. Além disso, reduz a memória de reconhecimento e reduz a expressão gênica de 5HT1A, MAO-A e BDNF, porém quando ocorre a manipulação do sistema serotoninérgico na idade adulta há maior plasticidade, revertendo esses efeitos a longo prazo da desnutrição, que ocorreu no início da vida.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Investigar os efeitos a longo prazo da desnutrição hipoprotéica sobre a plasticidade sináptica, correlacionando a estimulação do sistema serotoninérgico com os processos de memória e aprendizado e o comportamento alimentar.

4.2 Objetivos Específicos:

Avaliar no rato adulto os efeitos da desnutrição proteica precoce após a aplicação crônica de fluoxetina na vida adulta nos aspectos sobre:

- O ganho de peso;
- O consumo alimentar;
- A sequência comportamental de saciedade;
- A presença de traços de ansiedade;
- A memória de curto e longo prazo na idade adulta;
- A variação da expressão gênica de alguns componentes do sistema serotoninérgico: o receptor, 5-HT1A; a enzima de degradação, MAO-A e o fator envolvido com processos de memória: BDNF.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Grupos experimentais:

Ratos machos da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE, foram mantidos em biotério de experimentação com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em ciclo claro-escuro de 12/12 horas (claro das 6h00min às 18h00min, escuro das 18h00min às 6h00min) com livre acesso a água e ração. Os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética e experimentação animal do centro de ciências biológicas da UFPE (CEEACCB-UFPE, protocolo nº: 23076.023433/2013-88), ver anexo.

Para o acasalamento, após o tempo de 15 dias de habituação ao Biotério de Experimentação, ratas primíparas com peso de aproximadamente 220-250g foram alocadas em gaiolas de poliestireno juntamente com machos (300-350g) na proporção de três ratas para um macho por um período máximo de 3 dias. Para detecção de prenhez positiva, realizou-se a técnica de esfregaço vaginal para coleta de muco e ao microscópio de luz observou-se a presença de espermatozóides. Em seguida, as ratas gestantes foram transferidas para gaiolas individuais e o seu ganho de peso semanal acompanhado. As ratas foram divididas de forma aleatória em 2 grupos experimentais de acordo com a dieta fornecida durante a gestação e lactação: controle (CTRL, dieta com proteína Caseína a 17%, n=8) e desnutridos (DESN, dieta com proteína a 8%, n=7), desde o início da gestação até o desmame dos filhotes, aos 21 dias, Figura 1.

O dia de nascimento da ninhada foi considerado o dia zero e a manipulação para redução da ninhada (8 filhotes para cada gaiola) foi realizada no 1º dia de vida, sendo apenas os filhotes machos utilizados nesse experimento. Aos 21 dias, os filhotes foram desmamados e passaram a receber a dieta padrão de biotério Presence® *ad libitum*. Aos 158 dias os grupos CTRL e DESN foram subdivididos aleatoriamente, segundo à aplicação de Salina (SAL, NaCl a 0,9%, s.c., n=24) ou Fluoxetina (FLU, 10mg/Kg, s.c., n=29), durante 22 dias, no mesmo horário, às 17h, Figura 1. As análises de evolução ponderal e testes comportamentais: de seqüência de saciedade, ansiedade e memória de reconhecimentos e consumo alimentar foram avaliados nos respectivos dias contidos no delineamento experimental, sempre no mesmo horário, início do ciclo escuro, Figura 2. Ao final deste período,

aos 180 dias de vida, os animais foram eutanasiados por decapitação e em seguida os seus tecidos foram retirados e congelados a -80°C , para posterior análises da expressão gênica.

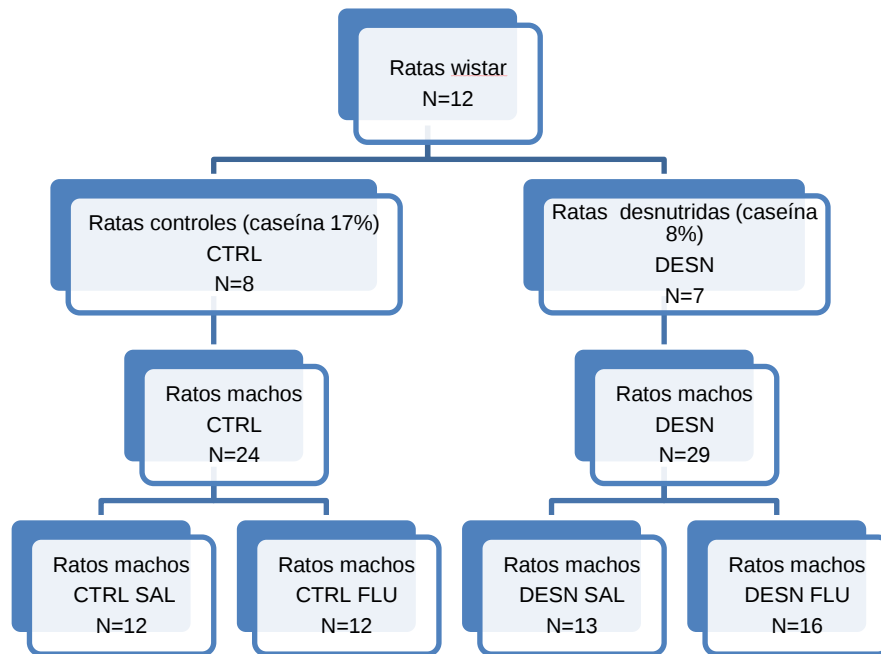


Figura 1. Diagrama demonstrando a divisão dos diferentes grupos experimentais do estudo.

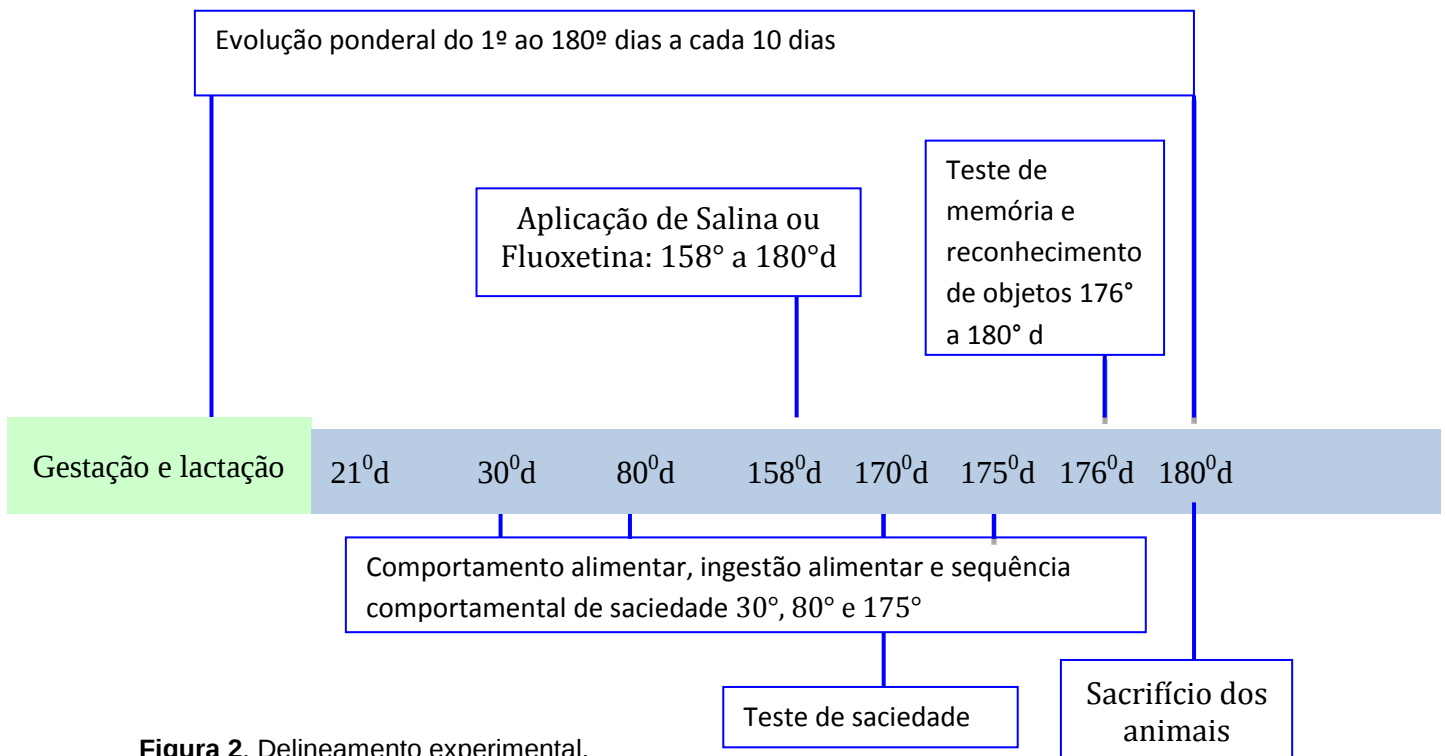


Figura 2. Delineamento experimental.

Composição das dietas: normoprotéica e hipoprotéica

As dietas à base de caseína foram confeccionadas no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, baseada nas recomendações de Reeves et al (1993) (Tabela 1), sendo isocalóricas, com alteração apenas do conteúdo de proteínas (Tabela 2). Após o desmame os animais foram alimentados com a dieta padrão do biotério (Presence®), Tabela 2.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais.

Ingredientes	Quantidade/kg de dieta	
	<i>Dieta hipoproteica</i>	<i>Dieta normoproteica</i>
	<i>(8% de caseína)</i>	<i>(17% de caseína)</i>
Caseína (80%)	100,0g	212,5g
Mix de vitaminas*	10,0g	10,0g
Mix de sais minerais†	35g	35g
Celulose	50g	50g
Bitartarato de colina	2,5g	2,5g
DL-metionina	3,0g	3,0g
Óleo de soja	70ml	70ml
Amido	629,5g	516,9g
Sacarose	100g	100g
BTH	0,0014g	0,0014g

* Mistura de vitaminas contendo (em mg.kg⁻¹ de dieta): retinol, 12; colecalciferol, 0,125; tiamina, 40; riboflavina, 30; ácido pantotênico, 140; piridoxina, 20; inositol, 300; cianocobalamina, 0,1; menadiona, 80; ácido nicotínico, 200; colina, 2720; ácido fólico, 10; ácido p-aminobenzoico, 100; e biotina, 0,6.

† Mistura mineral contendo (em mg.kg⁻¹ de dieta): CaHPO₄, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄.7H₂O, 200; e elementos-traço, 400 (MnSO₄.H₂O, 98; CuSO₄.5H₂O, 20; ZnSO₄.7H₂O, 80; CoSO₄.7H₂O, 0,16; e KI, 0,32; com amido para completar 40g [por kg de dieta]

Tabela 2. Distribuição calórica das dietas experimentais.

	Proteína a 8%	Proteína a 17%	Dieta padrão
Carboidratos (g/100g)	64,77	54,98	55,49
Lipídeos (g/100g)	6,55	6,67	2,82
Proteínas (g/100g)	8	17	23,22
VCT (kcal/100g)	350	348	340,22
VCT (kcal/g)	3,5	3,5	3,4

5.1 Avaliação da Evolução Ponderal

Para observar os efeitos a curto e longo prazo da desnutrição no período da gestação e lactação sobre o perfil ponderal, os animais foram pesados do 1º dia ao 21º, semanalmente. Após o desmame, os pesos foram registrados a cada 10 dias, utilizando-se balança digital (Marte, modelo S-1000, capacidade de 1Kg e sensibilidade de 0,1g), Figura 3.



Figura 3. Representação da pesagem na balança eletrônica digital (Marte, modelo S-1000).

5.2 Avaliação do consumo alimentar

O consumo alimentar foi avaliado em três fases: logo após o desmame, devido à maturidade de regiões encefálicas envolvidas no controle do comportamento alimentar (dos 27 ao 30 dias), antes ao período de estimulação do sistema serotoninérgico com a aplicação da Fluoxetina (dos 77 aos 80 dias) e após (172 aos 175 dias). Com a finalidade de verificar a quantidade de ingestão de alimentos, verificou-se a diferença do peso entre a quantidade (g) de ração oferecida menos a rejeitada no período de 1h, logo após o jejum de 1h. Para estimular a ingestão, a dieta foi oferecida em recipiente, contendo a mistura de dieta padrão (Presence®) em pó e água, na proporção de 1:2 (SCLAFANI; XENAKIS, 1984). Os animais foram colocados em gaiolas individuais e o alimento foi fornecido no comedouro logo após ao preparo. Os testes sempre foram realizados no mesmo horário, às 18 horas. Esse procedimento foi realizado durante quatro dias consecutivos, sendo que os dois primeiros dias corresponderam aos dias de adaptação ao novo ambiente e manipulação, assim consideramos os dois últimos dias para análise de consumo. Tendo em vista os dados apresentarem um padrão de diferença em um teste prévio e para evitar muitos dias de manipulação devido ao estresse ao novo ambiente que poderia provocar ao animal, optou-se realizar o teste por 4 dias. Os resultados estão representados pela média $\pm$ DP de consumo em gramas de cada animal durante os dias de teste por 100 gramas de peso corporal (g/100g de peso corporal).

5.3 Avaliação da sequência comportamental de saciedade

Nos dias 30, 80 e 175 pós natal, a SCS foi realizada e avaliada de acordo com Halford, Wanninayake e Blundell (1998), onde permitiu-se verificar a frequência e a duração de uma sequência de comportamentos progressivos em relação ao tempo, permitindo a identificação do processo de saciação (término da refeição) e o desenvolvimento da saciedade (inibição pós-ingestiva da alimentação). Para esta análise os animais foram transferidos para gaiolas individuais com dimensões adequadas para a análise da SCS. Os animais foram mantidos em jejum por 1 hora

antes da oferta do alimento de peso conhecido. O peso dos animais também foi aferido antes do jejum, depois do jejum e ao final do teste. A ração utilizada no teste foi a padrão de biotério consumida pelos animais desde o desmame e oferecida com a consistência alterada para estimular o comportamento, como descrito no item anterior. Os testes foram realizados sempre às 18:00 horas. Com auxílio de luz vermelha de baixa intensidade, a SCS foi registrada por um examinador previamente treinado quanto aos tipos de comportamentos avaliados. Ao finalizar esse período de teste o consumo alimentar era verificado mensurando-se a ração rejeitada. Foi avaliado a frequência e duração (em segundos) dos comportamentos classificados como: a) Alimentação: o rato apresentava-se ingerindo alimento, roendo, mastigando e segurando a ração com as patas; b) Exploração: realização de movimentos ao redor da gaiola ou cheirando o ambiente; c) Limpeza: apresentação de cuidados com o corpo, lambendo as patas anteriores e as movimentando sobre a cabeça, continuando com o lamber da região ventral, do dorso e das patas posteriores; d) Repouso: o rato apresentava-se em posição de descanso, apresentando o corpo repousado sobre o assoalho da gaiola ou dormindo.

A partir da observação comportamental da alimentação, outras medidas também foram registradas: O ponto de saciedade, intersecção entre o momento de alimentação e o descanso (Orosco-Sólis et al., 2008); bem como a duração da refeição (monitoramento do tempo em que o animal está comendo ao longo do período do teste). Os resultados de comportamentos estão representados em média em minutos (min), ou percentual (%), a ingestão alimentar em g/100 de peso corporal do animal e a duração da alimentação em segundos (s) $\pm$ DP.

5.4 Teste de ansiedade

Para avaliar traços de ansiedade devido às aplicações e observar se os desnutridos já possuíam tal comportamento, os ratos foram colocados em um labirinto em cruz elevado aos 170 dias de vida, sempre no mesmo horário às 18 horas. O modelo do labirinto em cruz elevado baseado em PELLOW et al (1985) é constituído por dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x10x 40 cm), estendendo-se a partir de uma plataforma central comum (10x10cm) com piso e paredes escuros de madeira, elevado a uma altura de 50 cm a partir do nível do piso e iluminado sob uma luz vermelha de baixa voltagem (15 w) acima da área central

(Figura 4). Este modelo experimental é baseado nos procedimentos realizados por Montgomery (1955), que considera o medo inato que os roedores têm pelo espaço aberto e elevado, preferindo ficar nos braços fechados, onde o maior tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo nos braços fechados representa um comportamento menos ansioso. O maior tempo no centro e a menor frequência de entrada no braço aberto não representam explicitamente comportamento ansioso, mas sugerem traços de ansiedade.

No teste, os animais foram colocados individualmente no espaço central do aparelho com a cabeça voltada para o braço fechado e seus comportamentos foram filmados por um período de 5 minutos. Os registros foram realizados através de imagens por câmera com sistema infravermelho e armazenados em computador. Três observadores cegos e devidamente treinados, visualizaram os filmes e registraram em protocolo o tempo de permanência nos braços abertos e fechados, no centro e a frequência de entrada no braço aberto. O registro de cada entrada teve validade a partir do momento em que o animal encontrou-se com as 4 patas em um dos braços do labirinto. O tempo de cada animal foi marcado através de um cronômetro digital.



Figura 4. Labirinto em cruz elevado utilizado para realização do teste de ansiedade

5.5 Expressão gênica: PCR em tempo real

A extração do RNA total de cada hipocampo e outras áreas cognitivas foi realizado pelo método do TRIzol[®], seguindo as instruções do fabricante. A seguir, efetuou-se o protocolo padrão de transcrição reversa, utilizando a enzima SuperScript III. Para os estudos de quantificação de expressão gênica realizamos experimentos utilizando o PCR Real-Time (Qiagen, AL, USA). A quantificação da

expressão gênica foi identificada pelo método de quantificação relativa, utilizando o gene constitutivo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) como referência. A reação de tempo real tanto para o gene *GAPDH* como para os outros genes alvo foi realizada a partir de 250 nM de cada primer, 50 ng de cDNA e 1X SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen, AL, USA). Os seguintes pares de *primers* para o *GAPDH* que foram utilizados na reação estão descritos na Tabela 3. Os *primers* específicos para genes alvo descritos foram desenhados por meio do programa Primer Express (Applied Biosystems), enviados para a empresa IDT (CA, USA) para serem sintetizados e purificados.

Tabela 3. Pares de *primers* utilizados na reação de PCR em tempo real.

Primer	Forward	Reverse
<i>bdnf</i>	5'TCAGATCTCTTCTGTGTGCGTGAGT3'	5'GGAGATCTCTCCTGTTCTTCAGCAA3'
<i>5ht-1a</i>	5'-CCCCCAAGAAGAGCCTGAA-3'	5'-GGCAGCCAGCAGAGGATGAA-3'
<i>mao-a</i>	5'-GCAAGACACGCTCAGGAATG-3'	5'-ACATACCACAGGAACCACAGG-3'
<i>gapdh</i>	5'-GCGAGATCCCGTCAAGATCA-3'	5'-CCACAGTCTTCTGAGTGGCAG-3'

A quantificação relativa da expressão do gene alvo foi executada utilizando o método comparativo de limiar de ciclos (CT) como descrito por Medhurst et al. (2000).

Os valores limites de ciclo (do inglês, “*cycle threshold*”, CT) das amostras foram determinados pela normalização a partir das curvas de fluorescência *versus* o número de ciclos do PCR durante a amplificação exponencial. As curvas padrão para todas as amplificações dos *primers* (ou oligonucleotídeos) foram geradas, traçando os valores médios dos valores de CT em função do logaritmo da quantidade de moléculas *template* (molde) alvo. Todas as quantificações foram normalizadas para o gene de referência (ou *house-keeping*): *desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato* (*GAPDH*). O valor da quantificação relativa de cada gene alvo foi analisado utilizando um método CT comparativo. A seguinte fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) foi usada para calcular a quantidade relativa do transcrito na amostra e normalizado

com o de referência endógena GAPDH: $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é a diferença entre a CT no gene de interesse e GAPDH, e $\Delta\Delta CT$ para a amostra teste que é igual a média do ΔCT da amostra menos a média do ΔCT da amostra de controle, no caso desse estudo, grupo salina (utilizada como calibração).

5.6 Teste de Reconhecimento de objetos em campo aberto

Na tarefa de reconhecimento de objetos foi observado e avaliado o comportamento exploratório dos animais (Ennaucer and Delacour, 1988), em que os mesmos foram submetidos à tarefa de campo aberto a partir dos 175 dias de vida, o qual consistiu de um aparato circular (1m de diâmetro), delimitado por paredes com 30cm de altura e confeccionado em etileno vinil acetato (E.V.A.) com 1 cm de espessura e na cor preta. Uma superfície macia de E.V.A. preta, foi colocada no fundo do campo aberto para facilitar o movimento do animal e proporcionar um maior contraste entre este e a superfície. As bases foram trocadas e limpas com etanol a 70% a cada utilização para diminuir os possíveis odores restantes. Utilizou-se uma câmera de infravermelho para registrar os experimentos com animais durante a fase escura do ciclo, posteriormente analisar o tempo de exploração de cada objeto (s). Todos os animais foram habituados ao ambiente do teste durante 3 dias a partir dos 175 dias de vida, tendo 20 minutos por dia para livre exploração do aparato na ausência de objetos. Para observar comportamentos estressantes, foram contabilizados os números de bolos fecais e a presença de urina. Os testes foram realizados às 18h, início do ciclo escuro, momento em que os animais estão em maior atividade.

Após os 3 primeiros dias, período de habituação, dois objetos diferentes de vidro foram colocados na arena os 2 dias seguintes, para a avaliação do tempo de exploração a esses objetos. No primeiro dia (sessão de treino/teste) os animais foram colocados na arena contendo dois objetos diferentes (A e B) para livre exploração por 5 minutos, para habitua-los aos mesmos (Figura 5A). Após o teste, aos 180 minutos, trocou-se o objeto B pelo C, para observar o tempo de exploração ao objeto novo, caracterizando assim a memória de curta duração (MCD), Figura 5B. Após 24 horas ao treino, o objeto C foi substituído por outro objeto novo o D, para avaliar agora, a memória de longa duração (MLD), Figura 5C.

As posições dos objetos (familiar ou novo) foram randomizadas e a arena foi limpa entre os testes. A exploração foi definida como cheirar ou tocar o objeto com o nariz e/ou as patas dianteiras. Sentar ou andar em torno do objeto não foi considerado comportamento exploratório. O tempo gasto explorando cada objeto foi observado nos vídeos gravados, por três observadores cegos. Os dados estão expressos em média do tempo de exploração ao objeto e percentual do total de tempo de exploração em segundos (Rossato *et al.*, 2007).

No último dia, previamente ao sacrifício, os animais foram estimulados à presença dos objetos por 1min na arena e logo em seguida foram eutanasiados por decapitação. Em seguida, o hipocampo foi dissecado, colocados em tubos plásticos de 1,5ml, imediatamente congelados em gelo seco e guardados a -80°C para análise de PCR.

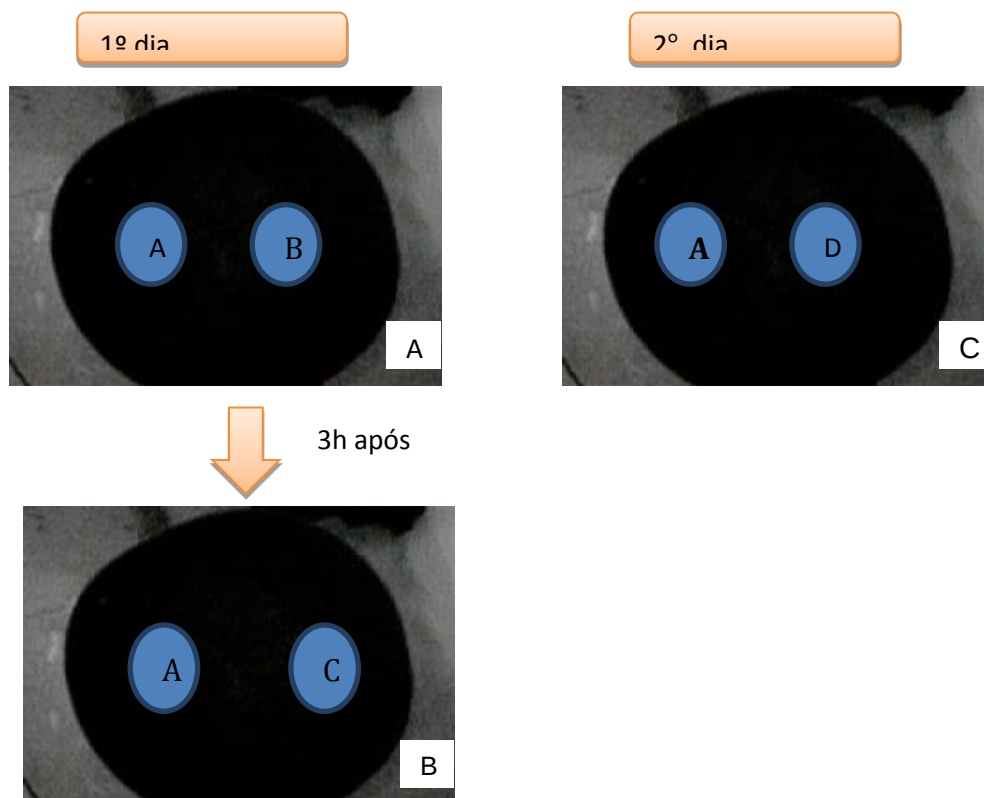


Figura 5. Campo aberto utilizado para a realização do teste de memória de reconhecimento de objetos com esquema ilustrativo da utilização dos mesmos: A) Fase de teste; B) Memória de curta duração; C) Memória de longa duração.

Análise estatística

Inicialmente, foi aplicado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). Os dados revelaram normalidade e homogeneidade de variâncias, para comparação de parâmetros dos ratos nas idades estudadas, foram utilizados *t-test Student*, para avaliação entre dois grupos. Para comparações múltiplas foi utilizada ANOVA two-way ou de medidas repetidas (RM) seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni. Os valores foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). O nível de significância foi mantido em 5% ($p \leq 0,05$) em todos os casos. As análises dos dados foram realizadas através do programa estatístico STATISTICA (StartSoft Inc., FRA)

6. RESULTADOS

6.1 Efeitos tardios da desnutrição precoce e da manipulação do sistema serotoninérgico sobre a evolução ponderal

Ao ser avaliado o peso corporal dos filhotes provenientes de mães submetidas à desnutrição no período de gestação e lactação, observou-se uma redução ponderal que se manteve do 1º até 150º de vida (1º dia: CTRL=6,43±0,16g, n=20; DESN=5,70±0,10g, n=23; $p < 0,05$ e 150º dias: CTRL=397,20±5,55g, n=20; DESN=352,10±6,00g, n=23). Após o desmame os animais não apresentaram recuperação de peso após receberem a dieta padrão, com quantidades de nutrientes equilibrados.

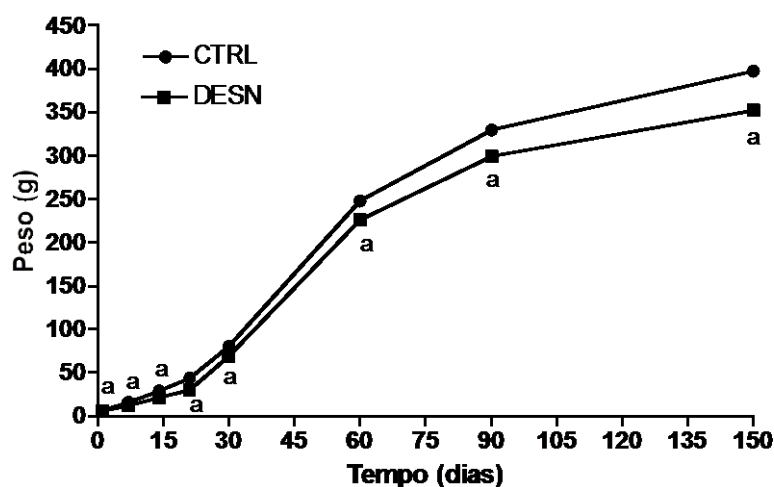


Figura 6. Evolução do peso corporal (g) do primeiro dia de vida até a idade adulta dos animais submetidos à desnutrição perinatal. Os grupos foram formados de acordo com a dieta recebida pela mãe contendo 17% de proteína (CTRL) ou 8% (DESN) durante gestação e lactação. Dados representam média $\pm$ DP, CTRL, $n=20$ e DESN, $n=23$. *Student's t-test*, sendo a= diferença entre DESN e CTRL, $p<0,005$.

Após a estimulação do sistema serotoninérgico com a injeção s.c. de Fluoxetina, o grupo controle reduziu o peso com 160 dias ($p<0,05$), ver Tabela 4 e Figura 7. O efeito da desnutrição sobre a evolução ponderal continuou sendo menor ($p<0,001$), mesmo após a aplicação da droga, porém foi observada uma maior redução no grupo DESFLU ($p<0,001$), ver Tabela 4 e Figura 7. Isso indica que esses animais foram mais responsivos à manipulação serotoninérgica.

Tabela 4. Médias dos pesos dos grupos experimentais após aplicação de Fluoxetina (10mg/Kg).

Grupos/ Dias	CTRL SAL	CTRL FLU	DESN SAL	DESN FLU
	Média±DP, n	Média±DP, n	Média±DP, n	Média±DP, n
160°	409.70±20.88 n=11	394.00±26.38 n=10	361.80±24.25 ^b n=11	345.60±20.48 ^c n=13
170°	419.20±18.97 n=11	392.00±26.84 ^a n=10	366.00±25.28 ^b n=11	341.90±22.71 ^{c,d} n=13
180°	422.70±22.98 n=11	393.80±30.03 n=10	366.60±23.96 ^b n=11	336.50±23.01 ^{c,d} n=13

a= comparação entre grupos CTRL SAL e CTRL FLU; b= comparação entre grupos CTRL SAL e DESN SAL; c= comparação de CTRL FLU e DESN FLU e d= comparação de DESN SAL e DESN FLU, p< 0,001. Two-way ANOVA, post-hoc Tukey.

Evolução ponderal

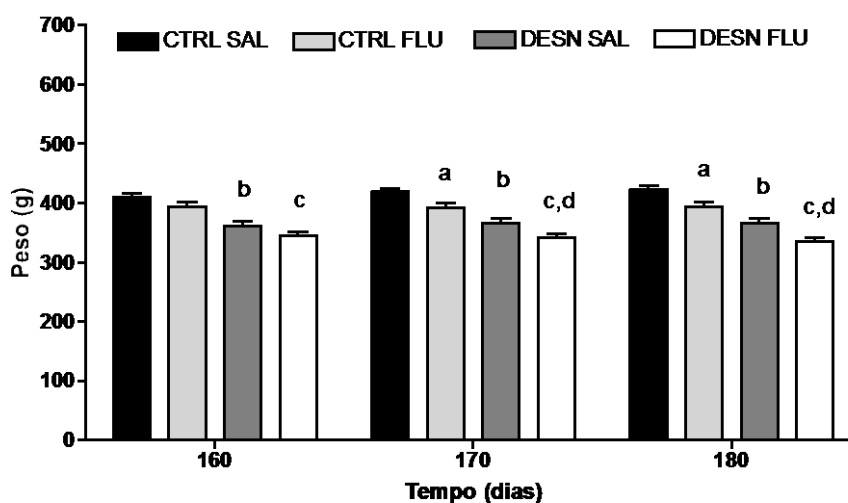


Figura 7. Efeitos da restrição proteica pré e perinatal sobre a evolução do peso corporal de ratos a partir de 160 dias de vida, após aplicação crônica de Fluoxetina. Os grupos controle e desnutrido foram alimentados respectivamente, com dieta 17% de proteína e 8% de proteína até o desmame, a partir de 158 dias, receberam fluoxetina 10mg/Kg ou solução Salina 0,9% s.c. Os dados estão expressos em média do peso em gramas ± DP. a= comparação entre grupos CTRL SAL e CTRL FLU; b= comparação entre grupos CTRL SAL e DESN SAL; c= comparação de CTRL FLU e DESN FLU e d= comparação de DESN SAL e DESN FLU. Two-way ANOVA, post-hoc Tukey. p< 0,001.

6.2 Efeitos tardios da desnutrição precoce e da manipulação do sistema serotoninérgico sobre a ingestão alimentar

Os resultados para ingestão alimentar relativa ao peso mostram que os animais submetidos à desnutrição protéica ingeriram mais alimento que os controles, nas idades 30 (CTRL: 30 dias = $7,46 \pm 1,78$, $n=24$; DESN: $8,41 \pm 2,15$, $n=22$, $p=0,04$), Figura 8A e aos 80 dias (CTRL: $2,37 \pm 0,63$; DESN: $5,20 \pm 1,46$, $p=0,00$), Figura 8B. Entretanto esse aumento na ingestão antes à aplicação de Fluoxetina, aos 175 dias, não foi observado entre CTRL SAL e DESN SAL (CTRL SAL: $3,79 \pm 1,09$, $n=11$; DESN SAL: $4,52 \pm 1,51$, $n=11$, $p>0,05$), porém houve redução da ingestão alimentar apenas no grupo DES FLU (DESN SAL: $4,52 \pm 1,51$, $n=11$; DESN FLU: $2,41 \pm 0,89$, $n=14$, $p=0,00$), Figura 9.

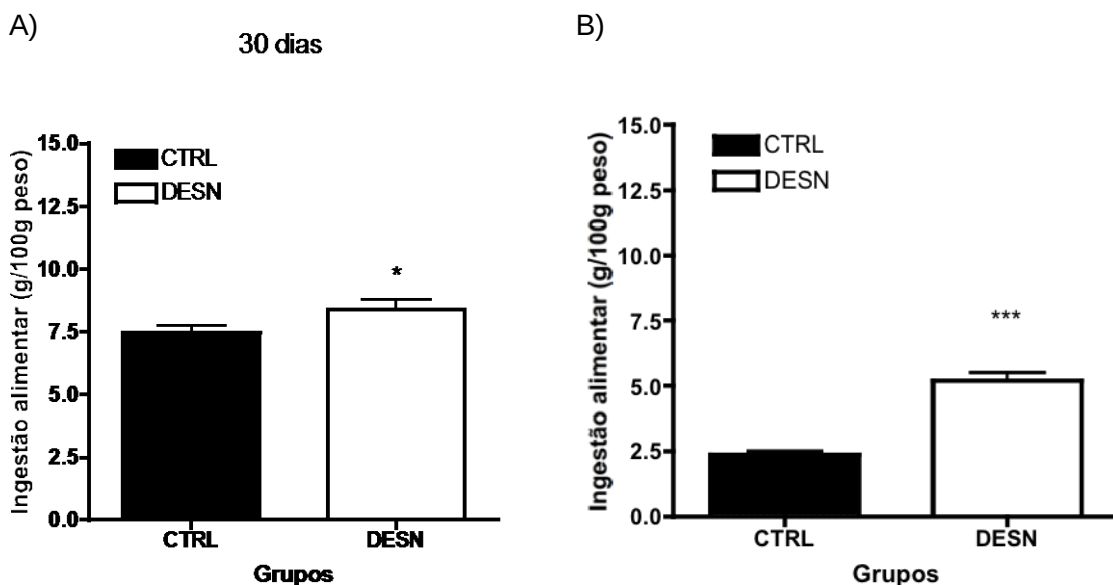


Figura 8. Ingestão alimentar relativa ao peso em gramas dos animais submetidos à desnutrição perinatal, aos 30 dias (A) e 80 dias (B) de vida. Os grupos receberam dieta contendo 17% de proteína (CTRL) ou 8% (DESN) durante gestação e lactação e após desmame receberam dieta padrão do biotério *ad libitum*. Dados representam média $\pm$ DP da ingestão de 3 dias consecutivos com $n=24$ para CTRL e $n=22$ para DESN. *Student's t-test* com * $p=0,04$, *** $p<0,001$.

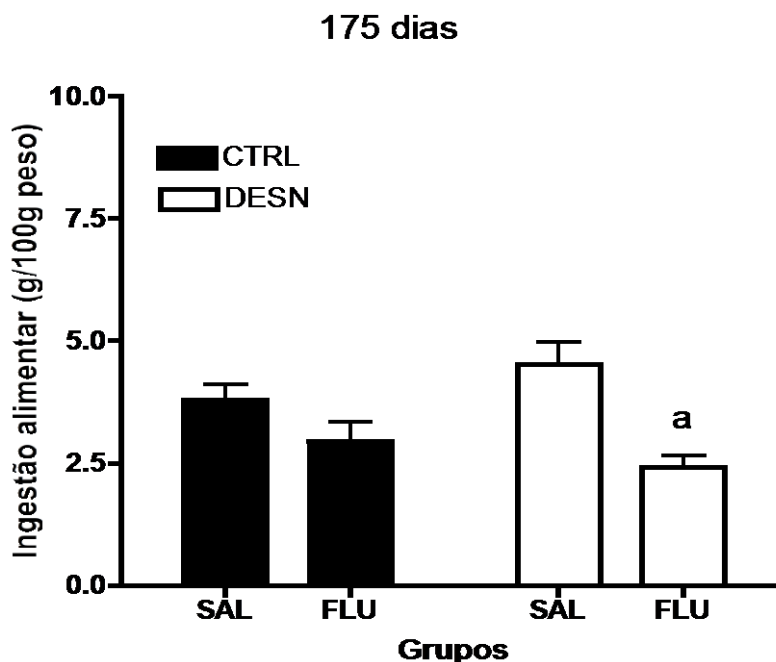


Figura 9. Ingestão alimentar relativa em gramas dos animais submetidos à desnutrição perinatal e administração de fluoxetina. Os grupos receberam dieta contendo 17% de proteína (CTRL) ou 8% (DESN) durante gestação e lactação e aplicações diárias de NaCl 0,9% (s.c.) (SAL) ou fluoxetina 10mg/Kg (s.c) (FLU) durante 22 dias, até os 180 dias de vida. Os dados indicam a média da ingestão alimentar $\pm$ DP mensurada nos últimos 3 dias de aplicação da droga. $n=11$ para os grupos CTRL SAL, CTRL FLU e DESN SAL, $n=14$ para DESN FLU. two-way ANOVA, post-hoc Tukey. $p=0,00$, a=comparação CTRL FLU e DESN FLU.

6.3 Efeitos tardios da desnutrição precoce e da manipulação do sistema serotoninérgico sobre a Sequência Comportamental de Saciedade

6.3.1 Saciedade

Os dados sobre sequência comportamental de saciedade mostraram que aos 30 dias de vida, o grupo DESN apresentou retardo na sequência de saciedade, o qual observa-se um atraso no momento de descanso comparado ao CTRL. O ponto de transição da alimentação e o descanso tem uma defasagem. No grupo desnutrido

(Figura 10B), a linha de transição é deslocada para a direita em relação ao controle (Figura 10A), indicando um retardo no aparecimento da saciedade. Contudo, aos 80 dias esse retardo desaparece (Figura 10B).

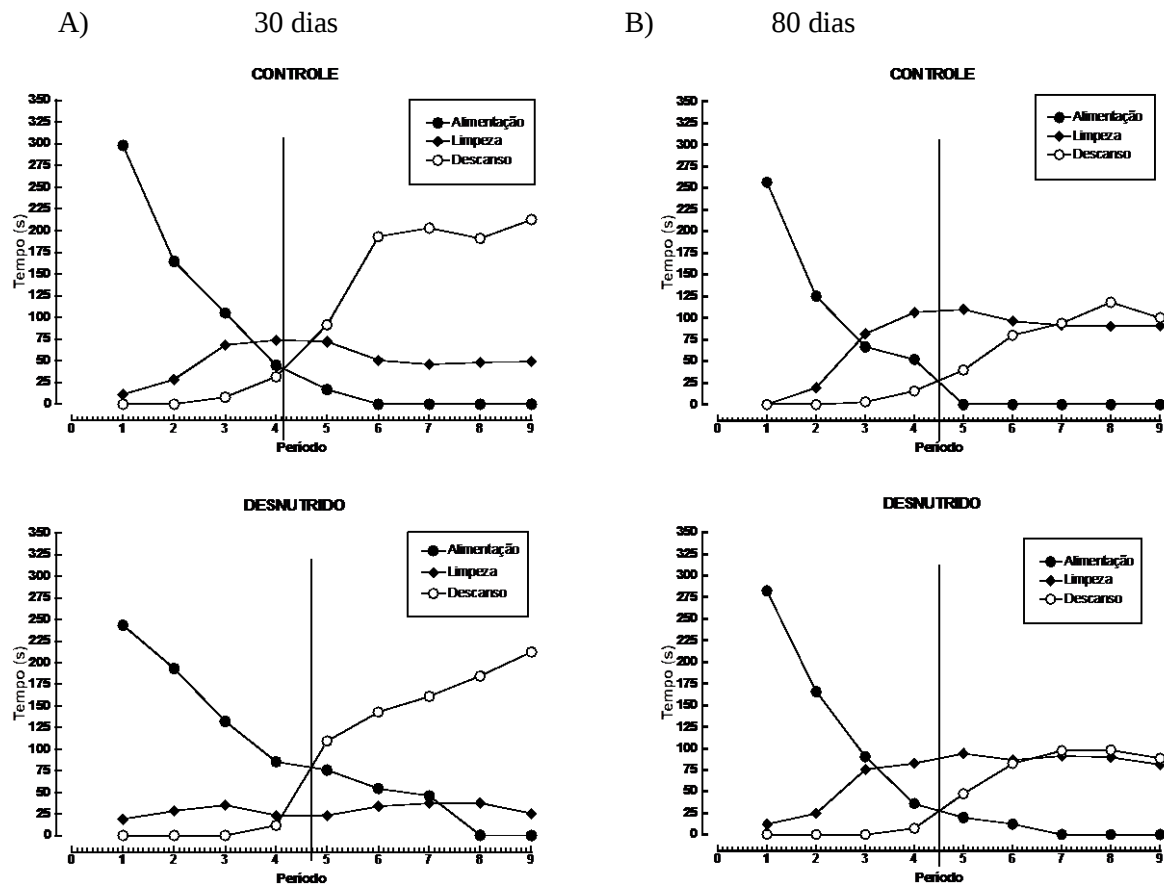


Figura 10. Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a Sequência Comportamental de Saciedade de ratos machos (A) 30 dias e (B) 80 dias de vida. Os grupos controle e desnutrido foram alimentados respectivamente, com dieta 17% de proteína e 8% de proteína até o desmame. Os períodos 1-9 correspondem aos intervalos de 5 min de tempo que compõem uma sessão de teste de 60 min. Os gráficos ilustram o ponto de transição de alimentação ao descanso através da linha tracejada que representa o momento de saciedade. $n = 23$ e 28 para cada grupo, respectivamente.

O retardo da saciedade apresentou-se novamente aos 175 dias no grupo DEN SAL, porém após aplicação de Fluoxetina, observou-se que o grupo DESN apresentou um adiantamento da saciedade. Esse perfil não foi apresentado nos demais grupos estudados, Figura 11.

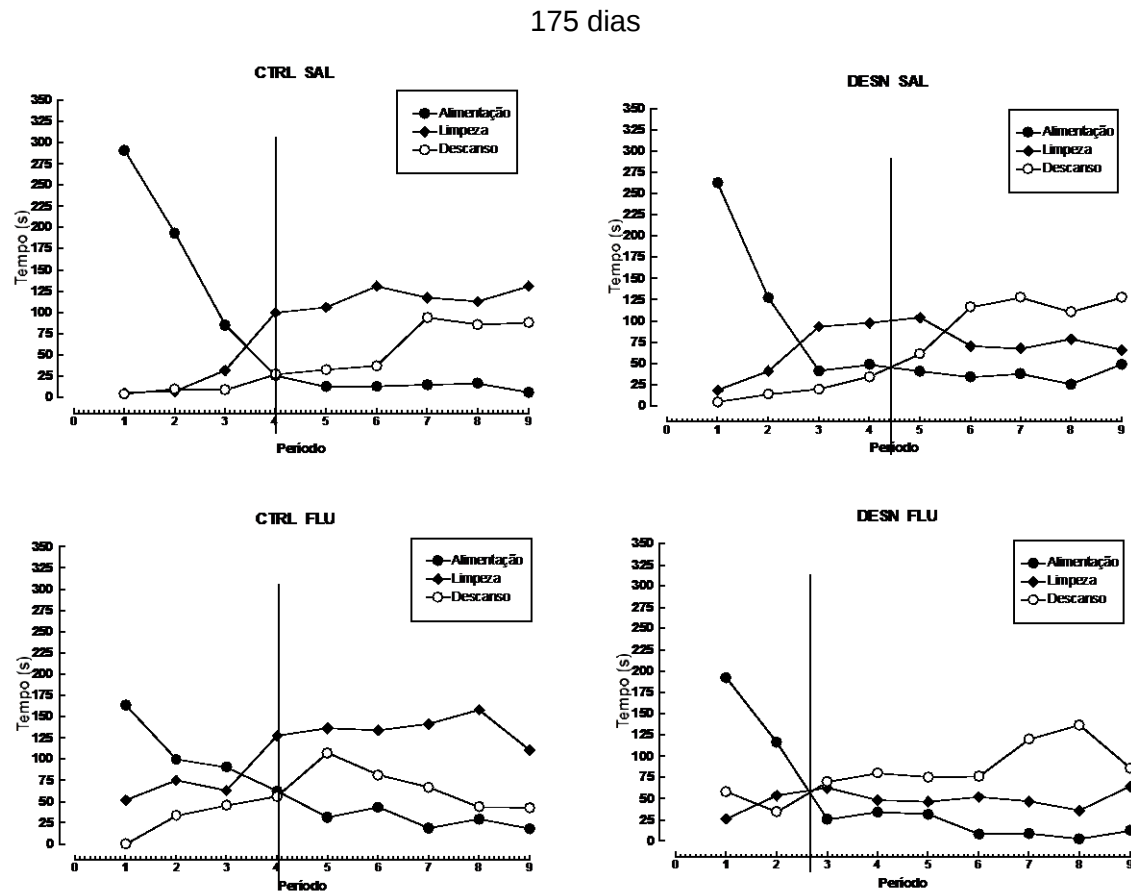


Figura 11. Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a Sequência Comportamental de Saciade de ratos machos 175 dias de vida. Os grupos controle (CTRL) e desnutrido (DESN) foram alimentados respectivamente, com dieta 17% de proteína e 8% de proteína até o desmame. Aos 158º dias, administrou-se 0,9% de Salina ou Fluoxetina (10mg/Kg), s.c e os grupos foram subdivididos: CTRL SAL, CTRL FLU, DESN SAL, DESN FLU. Os períodos 1-9 correspondem aos intervalos de 5 min de tempo que compõem uma sessão de teste de 60 min. Os gráficos ilustram o ponto de saciedade. $n=11$ para cada grupo.

6.3.2 Porcentagem da duração de alimentação

Em relação a porcentagem da duração do ato de alimentar-se durante uma hora de observação, tanto aos 30º dias como aos 80º dias, durante a SCS, o grupo DESN passou mais tempo alimentando-se comparado ao grupo CTRL (30º dia: CTRL: $17,48 \pm 5,71\%$, $n=22$; DESN: $22,02 \pm 8,20\%$, $n=23$; $p=0,03$ e aos 80º dia: CTRL: $14,16 \pm 1,37\%$, $n=22$; DESN: $18,87 \pm 5,54\%$, $n=26$; $p=0,002$), Figura 12.

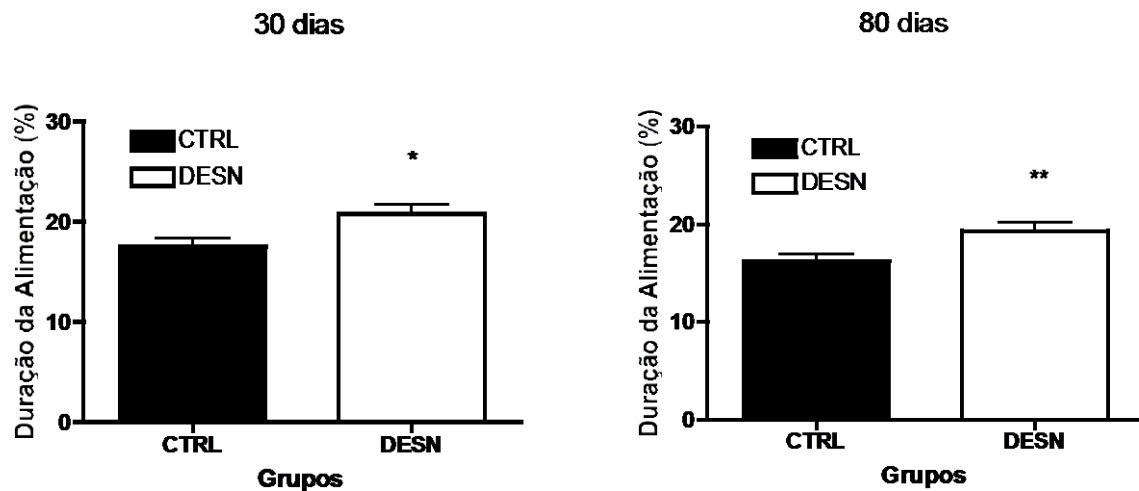


Figura 12. Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a duração do comportamento de alimentação em % durante a análise da sequência comportamental de saciedade de ratos machos com 30 dias (CTRL, n=22 e DESN, n=23) e 80 dias (CTRL, n=22 e DESN, n=27) de vida. Os grupos controle e desnutrido foram alimentados respectivamente, com dieta 17% de proteína e 8% de proteína até o desmame. *Student's t-test*, * p=0,03, **p=0,002.

Aos 175 dias de vida, o efeito tardio da desnutrição não provocou redução no tempo de duração da alimentação em nenhum dos grupos (CTRL SAL: $21,71 \pm 7,93\%$, n=12; DESN SAL: $20,20 \pm 7,52\%$, $p > 0,05$) durante o teste de SCS. O mesmo resultado apresentou-se após a estimulação do sistema serotoninérgico, com a administração de Fluoxetina (CTRL SAL: $17,29 \pm 8,86\%$; CTRL FLU: $15,41 \pm 4,17\%$, n=11; $p > 0,05$), Figura 13.

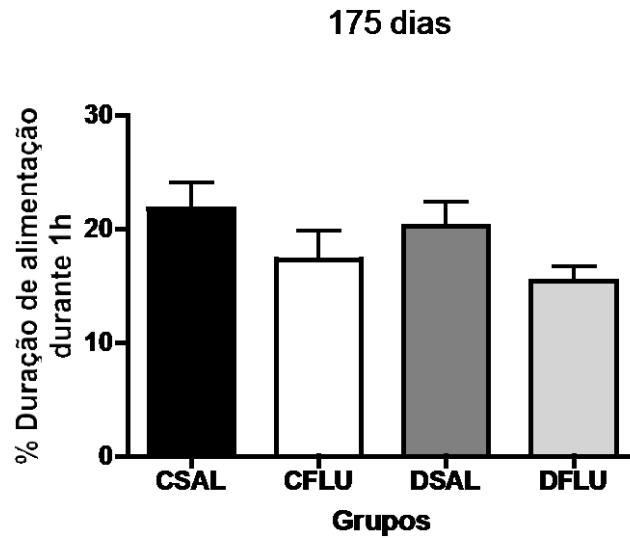


Figura 13. Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a duração do comportamento de alimentação em % durante a análise da sequência comportamental de saciedade de ratos machos com 175 dias de vida. Os grupos controle e desnutrido foram alimentados respectivamente, com dieta 17% de proteína e 8% de proteína até o desmame e subdivididos aos 158 dias em CTRL SAL (n=12), CTRL FLU (n=12), DESN SAL (n=12) e DESN FLU (n=11). Two-way ANOVA, *post-hoc* Tukey, $p > 0,05$.

6.4 Efeitos da desnutrição precoce e aplicação de Fluoxetina sobre a ansiedade

Os parâmetros analisados com o teste de ansiedade no labirinto em cruz elevado como: tempo de permanência no braço aberto em relação ao tempo total nos dois braços, a frequência de entradas no braço aberto ou o tempo de permanência na região central do labirinto, mostraram que nem os efeitos tardios de uma desnutrição precoce e nem a estimulação do sistema serotoninérgico induziram perfil de ansiedade nos animais de 175 dias ($p > 0,05$), ver Figuras 14A, 14B e 14C.

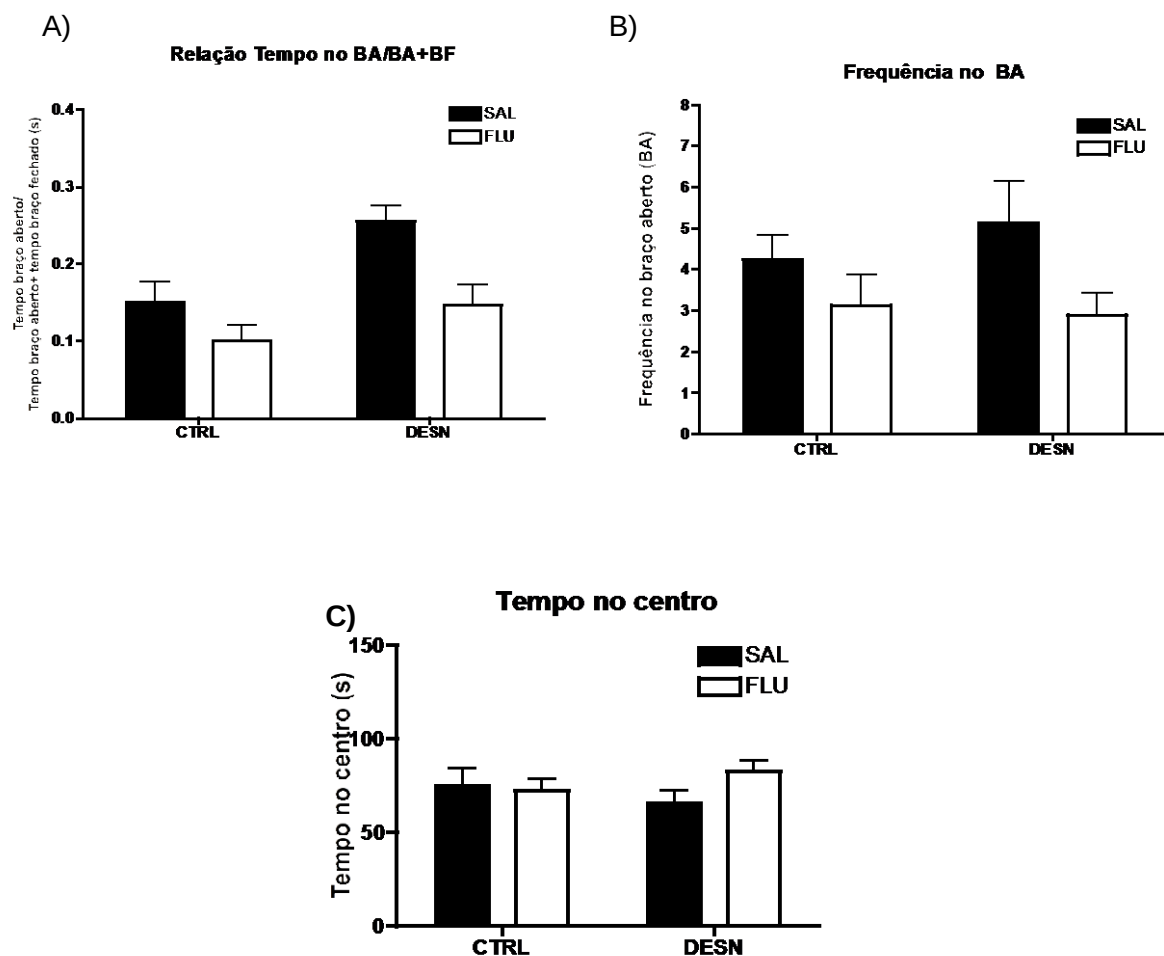


Figura 14. Efeito da desnutrição e da Fluoxetina sobre traços de ansiedade. Os grupos receberam dieta contendo 17% de proteína (CTRL) ou 8% (DESN) durante gestação e lactação e aplicações diárias de NaCl 0,9% (s.c.) (SAL) ou fluoxetina 10mg/Kg (s.c) (FLU) durante 22 dias até os 180 dias de vida. Parâmetros avaliados em labirinto de cruz elevado: (A) Relação do tempo no braço aberto sobre o tempo braço aberto + braço fechado, (B) Frequência no braço aberto e (C) Tempo no Centro. Os valores estão representados em média $\pm$ DP (s). two-way ANOVA, *post-hoc* Tukey. $n = 8$ para cada grupo, $p > 0.05$.

6.5 Efeitos tardios da desnutrição precoce e da manipulação do sistema serotoninérgico sobre a expressão gênica no hipocampo

5-HT1a

Os dados da expressão gênica obtidos após testes com o PCR em tempo real mostraram que os animais do grupo DESN após aplicação de Fluoxetina modificaram a expressão dos genes relacionados ao sistema serotoninérgico e do BDNF no hipocampo de ratos de 180 dias. Para a expressão de 5HT-1A, o grupo

DESN FLU apresentou 40% de aumento em comparação a expressão dos níveis do CNTR SAL (CNTR SAL: $1,00 \pm 0,01$, $n=4$; DESN FLU: $1,40 \pm 0,10$, $n=4$; $p=0,006$) e ao DESN SAL ($1,00 \pm 0,04$, $n=4$; $p=0,006$), Figura 15.

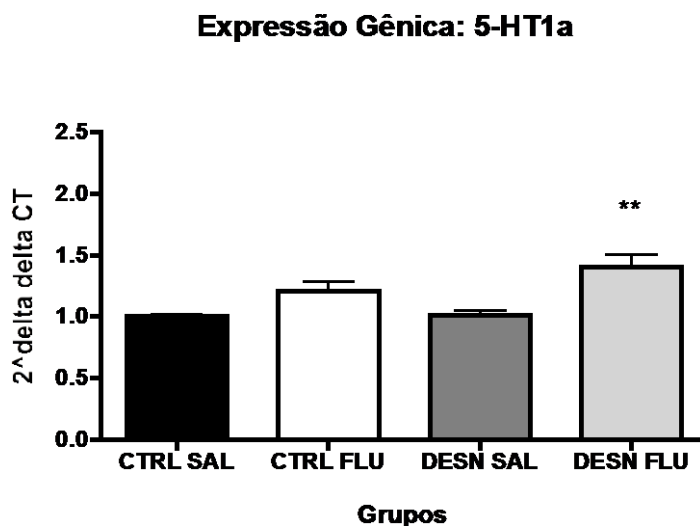


Figura 15. Expressão gênica do receptor de serotonina 5HT-1A no hipocampo dos animais submetidos à desnutrição perinatal e administração de fluoxetina, aos 180 dias. Os grupos receberam dieta contendo 17% de proteína (CTRL) ou 8% (DESN) durante gestação e lactação e aplicações diárias de NaCl 0,9% (s.c.) (SAL) ou fluoxetina 10mg/Kg (s.c) (FLU) durante 22 dias até os 180 dias de vida. Dados representam média $\pm$ desvio padrão. $n=4$ para cada grupo. *two-way ANOVA, post-hoc Tukey*, ** $p<0,01$.

MAO-A

A expressão da enzima de degradação da serotonina, MAO-A, também foi aumentada no grupo DESN FLU. Quando comparado ao grupo CTRL SAL o aumento chega a 31% (CTRL SAL: $1,00 \pm 0,06$, $n=4$; DESN FLU: $1,31 \pm 0,04$; $p=0,01$), a 29% quando comparado ao CTRL FLU ($1,03 \pm 0,06$, $n=4$; $p=0,02$) e ao seu controle DESN SAL, 38% ($0,93 \pm 0,05$, $n=4$; $p=0,00$), Figura 16.

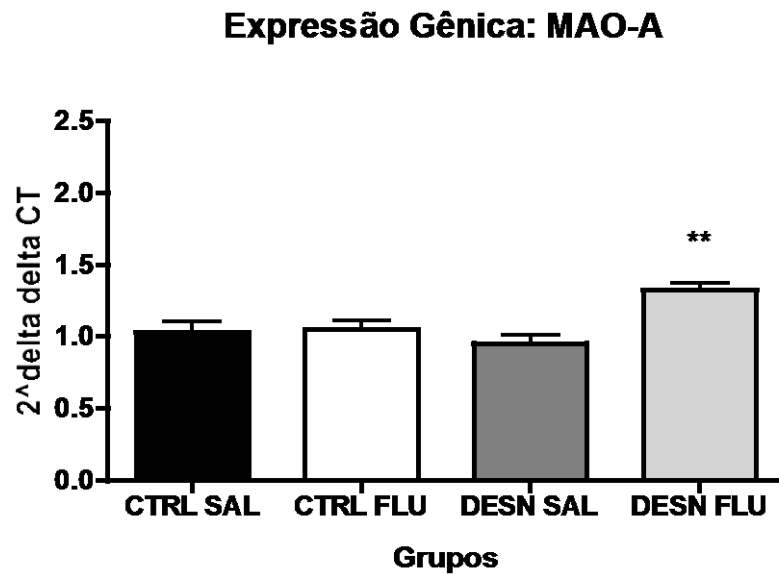


Figura 16. Expressão gênica da enzima de degradação da serotonina MAO-A no hipocampo de animais submetidos à desnutrição perinatal e administração de fluoxetina, aos 180 dias. Os grupos receberam dieta contendo 17% de proteína (CTRL) ou 8% (DESN) durante gestação e lactação e aplicações diárias de NaCl 0,9% (s.c.) (SAL) ou fluoxetina 10mg/Kg (s.c) (FLU) durante 22 dias até os 180 dias de vida. Dados representam média ± desvio padrão. n=4 para cada grupo. *two-way ANOVA, post-hoc Tukey*, ** p<0,01.

BDNF

O fator neurotrófico, BDNF apresentou aumento de expressão no grupo DESN FLU em quase 90% quando comparado ao controle (CTRL SAL: 1,01±0,10, n=4; p:0,00), 120% ao grupo CTRL FLU (0,71±0,10, n=10; p=0,00) e aumento de 90% a mais que o DESN FLU (1,01±0,16, n=4; p=0,00), ver Figura 17.

Expressão Gênica: BDNF

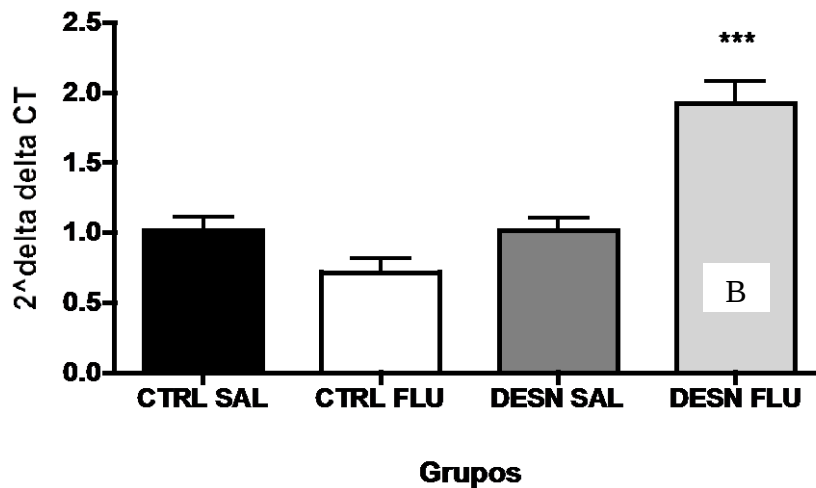


Figura 17. Expressão gênica da neurotrofina, BDNF, no hipocampo de animais submetidos à desnutrição perinatal e administração de fluoxetina, aos 180 dias. Os grupos receberam dieta contendo 17% de proteína (CTRL) ou 8% (DESN) durante gestação e lactação e aplicações diárias de NaCl 0,9% (s.c.) (SAL) ou fluoxetina 10mg/Kg (s.c) (FLU) durante 22 dias até os 180 dias de vida. Dados representam média $\pm$ desvio padrão. $n=4$ para cada grupo. two-way ANOVA, *post-hoc* Tukey, *** $p<0,001$.

6.6 Efeitos tardios da desnutrição precoce e da manipulação do sistema serotoninérgico sobre a memória de curta e longa duração

Ao ser avaliada a memória através do teste de reconhecimento de objetos nos animais de 180 dias, após aplicação crônica de fluoxetina por 22 dias, foi visto que no treino não houve uma preferência dos grupos por um objeto específico, não havendo diferença na exploração entre os objetos A e B (CTRL SAL, A: $9,85 \pm 5,41s$; B: $12,04 \pm 8,22s$, $n=14$; CTRL FLU, A: $7,29 \pm 7,33s$; B: $11,11 \pm 7,91s$, $n=15$; DESN SAL, A: $12,98 \pm 9,12s$; B: $15,43 \pm 9,72s$, $n=13$; DESN FLU, A: $10,45 \pm 6,84s$; B: $9,13 \pm 5,01s$, $n=17$; $p>0,05$), Figura 18.

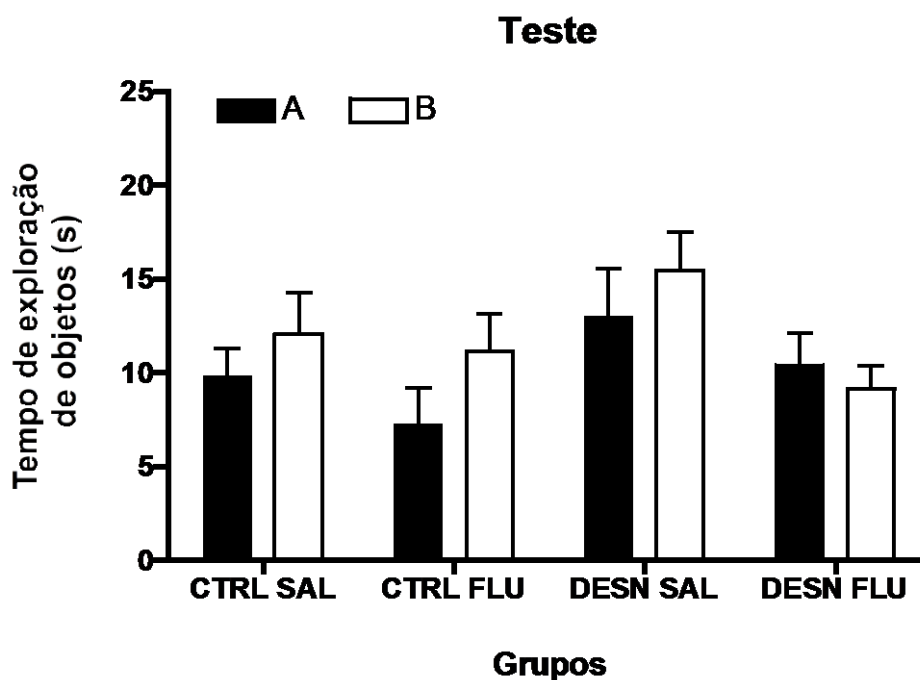


Figura 18. Teste de reconhecimento de objeto dos animais submetidos à desnutrição perinatal e administração de fluoxetina aos 180 dias. Os grupos receberam dieta contendo 17% de proteína (CTRL) ou 8% (DESN) durante gestação e lactação e aplicações diárias de NaCl 0,9% (s.c.) (SAL) ou fluoxetina 10mg/Kg (s.c) (FLU) durante 22 dias. Dados representam tempo de exploração dos objetos em segundos $\pm$ DP. CTRL SAL, n= 14; CTRL DESN, n=14; DESN SAL, n=15; DESN CTRL, n=16. *two-way ANOVA, post-hoc Tukey, $p>0,05$.*

Após 180 minutos do teste, os dados do tempo de exploração dos objetos revelaram que os grupos CTRL FLU (A: $13,13 \pm 9,96$; C: $13,33 \pm 9,44$, n=15; $p=0,01$), DESN SAL (A: $12,48 \pm 7,23$; C: $11,92 \pm 9,2$, n=17; $p=0,004$) e DESN FLU (A: $9,43 \pm 7,93$; C: $13,27 \pm 8,98$, n=16; $p=0,02$) apresentaram retenção de informações, revelando memória de curta duração do objeto novo, Figura 19 A. Entretanto, quando compara-se o tempo de exploração do novo objeto entre os grupos não há diferença ($p>0,05$), Figura 19 B.

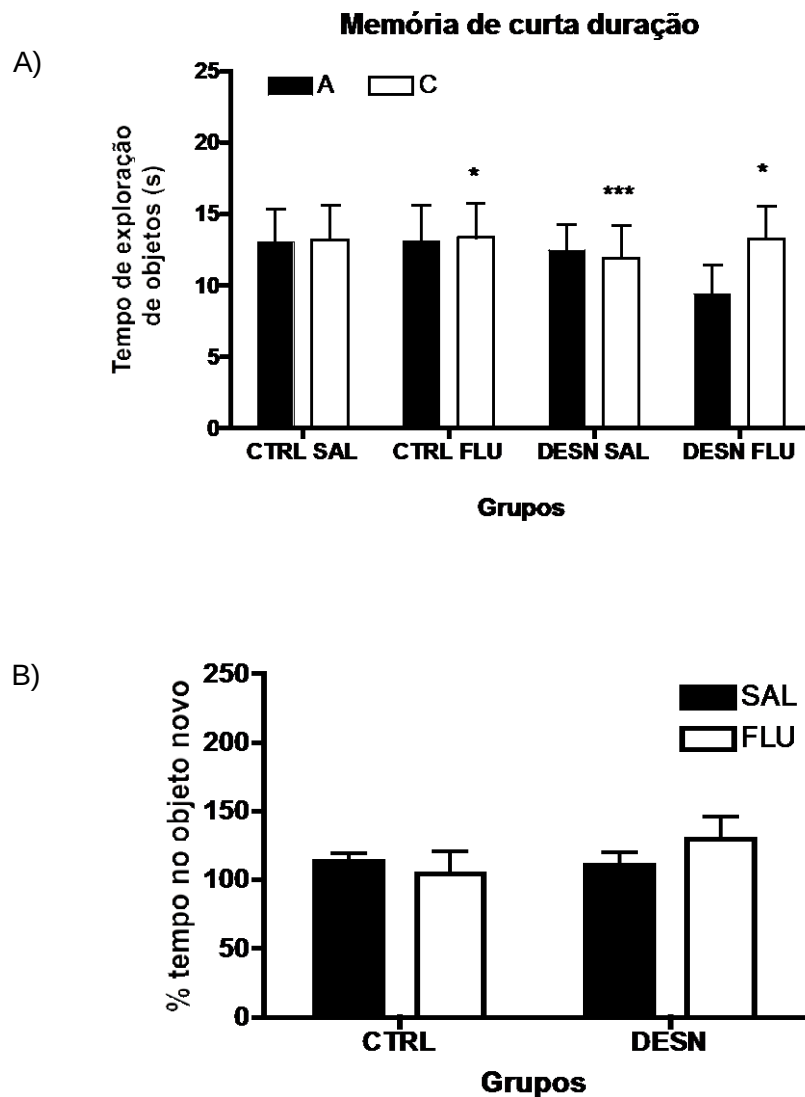


Figura 19. Teste de reconhecimento de objeto dos animais submetidos à desnutrição perinatal e à administração de fluoxetina aos 180 dias, aos 180 minutos após o teste. Os grupos receberam dieta contendo 17% de proteína (CTRL) ou 8% (DESN) durante gestação e lactação e aplicações diárias de NaCl 0,9% (s.c.) (SAL) ou fluoxetina 10mg/Kg (s.c) (FLU) durante 22 dias. A) Dados representam o tempo de exploração dos objetos em segundos, *Student's t-test* e B) % de tempo de exploração nos objetos novos, *two-way ANOVA, post-hoc Tukey*. Média±DP. CTRL SAL, n= 14; CTRL DESN, n=15; DESN SAL, n=16; DESN CTRL, n=17. * p<0,05; **p<0,01.

Ao avaliarmos a memória de longa duração, realizando o teste após 24 horas do primeiro momento, os animais dos grupos CTRL FLU e DESN FLU apresentaram retenção de informações a longo prazo. Isso pode ser observado por maior tempo de exploração ao objeto novo (CTRL FLU, A: 6,40±4,28; D: 12,95±11,66, n=15; p=0,02 e DESN FLU, A: 11,15±7,40; B: 12,90±7,67, n=13; p=0,00), Figura 20 A.

Entretanto, a porcentagem da duração da exploração do objeto novo para o grupo DESN FLU foi menor que o CTRL FLU (CTRL FLU: $195 \pm 89,43\%$, $n=15$ e DESN FLU: $111,90 \pm 26,95\%$, $n=13$, $p=0,05$), Figura 20 B.

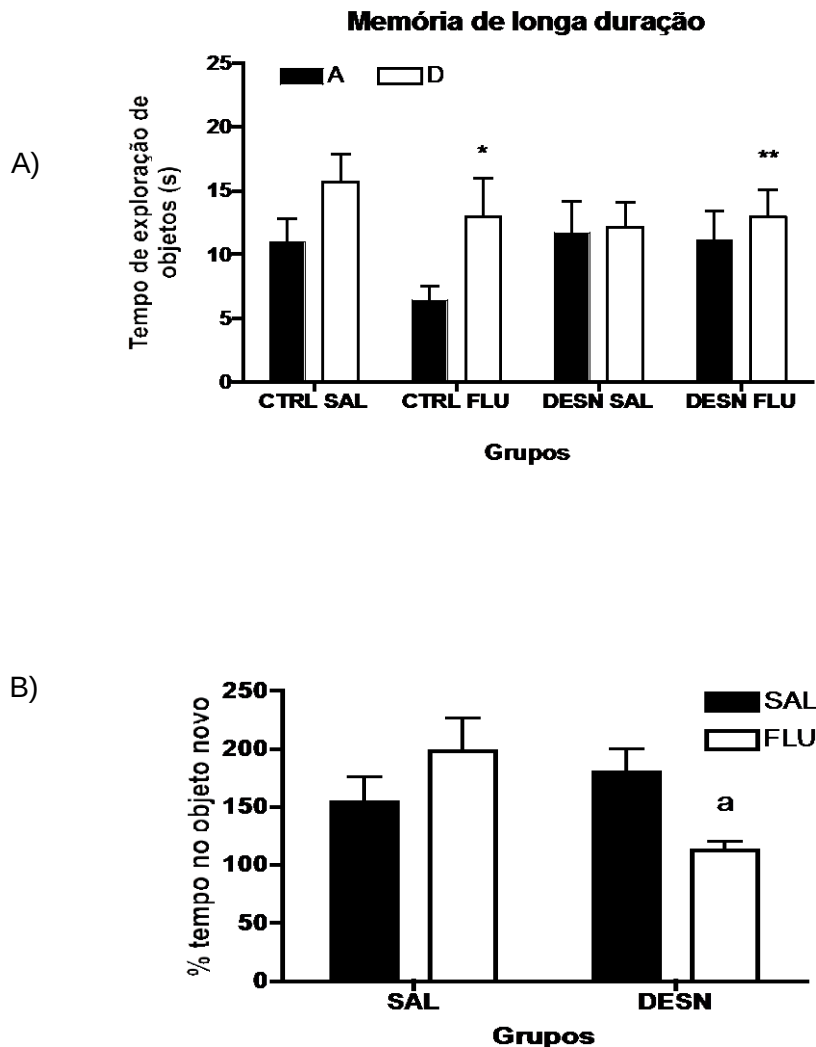


Figura 20. Teste de reconhecimento de objeto dos animais submetidos à desnutrição perinatal e à administração de fluoxetina aos 180 dias, aos 24 horas após o teste. Os grupos receberam dieta contendo 17% de proteína (CTRL) ou 8% (DESN) durante gestação e lactação e aplicações diárias de NaCl 0,9% (s.c.) (SAL) ou fluoxetina 10mg/Kg (s.c) (FLU) durante 22 dias. A) Dados representam o tempo de exploração dos objetos em segundos, *Student's t-test* e B) % de tempo de exploração nos objetos novos, *two-way ANOVA*, *post-hoc* Tukey. Média $\pm$ DP. CTRL SAL, $n=14$; CTRL DESN, $n=15$; DESN SAL, $n=16$; DESN CTRL, $n=13$. * $p<0,05$, ** $p<0,005$; a= comparação SAL FLU e DESN FLU, $p<0,05$.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos o efeito da desnutrição perinatal sobre o comportamento alimentar e eventos de memória antes e após a administração crônica de um ISRS, a fluoxetina. Trabalhos prévios mostram que a prole de mães que foram submetidas a uma desnutrição precoce altera áreas do sistema nervoso (Chen et al., 1992, Cintra e Aguilar *et al.*, 1997; Wang e Xu, 2007; Mehedint e Craciunescu *et al.*, 2010; Matos et al., 2011), bem como interfere na modulação de serotonina (Resnick e Morgane, 1984; Hernandez et al., 1989; Manjarrez et al., 2003; Mokler et al., 2003) e de fatores neurotróficos como o BDNF (Malamitsi-Puchner et al., 2007; Wang e Xu, 2007; Coupé et al. 2009) em áreas encefálicas (Resnick e Morgane, 1984; Hernandez et al., 1989; Manjarrez et al., 2003; Mokler et al., 2003). Essas alterações podem especificamente induzir à plasticidade sináptica em áreas como o hipotálamo (Lopes-de-Souza et al., 2008; Orozco-Solís et al., 2009) e o hipocampo (Chen et al., 1992; Mokler et al., 2003; Matos et al., 2011), regiões essas envolvidas no controle homeostático do comportamento alimentar e sobre a memória, respectivamente.

Dentre os parâmetros que caracteriza os efeitos de uma plasticidade fenotípica ao longo da vida diante da desnutrição precoce é a redução do peso tanto neonatal, quanto durante o desenvolvimento até a vida adulta (Hales e Barker, 1991). Esse perfil foi observado em nossos resultados em que a evolução ponderal dos animais submetidos à desnutrição foi menor e manteve-se até os 180 dias de vida. Nossos achados corroboram com outras pesquisas realizadas em diferentes espécies de animais que também evidenciaram o efeito da desnutrição proteica perinatal a curto prazo, sobre o baixo peso ao nascer e a ao longo da vida (Anguita et al. 1993; Barros et al., 2006; Orozco-Solís et al., 2009, Rehfeldt et al. 2012). Em animais submetidos a restrição calórica total de 50% durante a gestação, nem todos os trabalhos verificam essa diferença significativa de peso (George et al. 2011). Em contrapartida, Orozco-Solís et al. (2009) verificaram que ratos Sprague Dawley, desnutridos no período perinatal por uma dieta hipoproteica, apresentavam baixo peso até 180º dia de vida, porém aos 240 dias o desnutrido recuperou o peso corporal e igualou-se ao controle. Semelhantemente, Fukami et al. (2012) analisando ratas de restrição calórica intrauterina de 50%, observaram que o grupo desnutrido também apresentou peso ao nascer inferior ao controle, e que aos 10

meses de vida, os animais desnutridos não só recuperaram o peso, como também ultrapassam o controle com mesma idade. Essa recuperação de peso corporal de animais desnutridos precocemente é devido a um fenômeno de recuperação de peso rápido e excessivo, chamado de "catch-up" de crescimento (Wadhwa et al., 2009; Gluckman e Hanson, 2004; Orozco-Solís et al., 2010). Nesse aspecto, observa-se o risco de haver sobrepeso (Gluckman, Hanson, 2004; Orozco-Solís, 2010). Essas análises foram observadas após o período de 180 dias de vida, período avaliado no presente estudo.

A redução de peso ao longo do tempo pode ser entendido, por uma das vias, que a restrição proteica na dieta promova mudanças na síntese e liberação de moduladores essenciais para desencadear a proliferação celular e promover o crescimento favorável ao ambiente. Dentre os esses moduladores estão os hormônios proteicos, que podemos evidenciar o hormônio de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1). Estudos com ratos neonatos proveniente de mães que foram submetidas à uma dieta hipoproteica (5% de caseína) evidenciaram que há redução de IGF-1 no soro, indicando que a redução somática e crescimento de órgãos podem estar relacionadas a essas mudanças (Muaku et al. 1996). Outros moduladores que apresentam mudanças em seus níveis no organismo devido a alterações nutricionais: hormônios tireoidianos e sexuais, os glicorticoides e a proteína liagante ao IGF (IGFBP) 1 e 7, fatores de crescimento de fibroblastos-21 (FGF-21). Todos esses fatores têm influência sobre o crescimento linear e podem modificar o tamanho corporal (Gat-Yablonski e Phillip, 2015).

Um outro aspecto a ser discutido e que pode interferir em substratos para produção de moduladores celulares, repercutir sobre o ganho de peso e desenvolvimento geral do organismo é a composição do leite materno. O leite é única via de acesso alimentar da prole no período inicial da vida, porém pouco é compreendido o impacto da desnutrição perinatal sobre a composição do leite. Um modelo de restrição calórica e proteica durante a gestação e lactação, observou-se o perfil dos nutrientes com espectrometria de massa, em que houve a diminuição na concentração de vários aminoácidos envolvidos com a secreção de insulina ou gliconeogênese, sugerindo possíveis danos aos efeitos insulíntricos (Agnoux et al., 2015). Isso pode resultar numa diminuição do crescimento, tendo em vista que a insulina é um hormônio com características anabólicas no organismo. A diminuição

de aminoácidos sulfurados podem também alterar o estado redox da prole e dificultar o desenvolvimento celular. Entretanto, houve aumento de ácidos graxos totais e modificações em seus padrões (Agnoux et al., 2015).

O perfil do peso corporal reduzido com a desnutrição precoce manteve-se esse fenótipo após à administração de fluoxetina, mobilizando o sistema serotoninérgico. O grupo desnutrido fluoxetina mostrou-se mais sensível à redução de peso. Outros aspectos do balanço energético foi observado nesse estudo, indicando que o perfil corporal diminuído dos animais adultos, que tiveram a desnutrição precoce, não está diretamente relacionado com o perfil hiperfágico encontrado. Os animais desnutridos com 30 dias apresentaram aumento da ingestão alimentar efeito que permaneceu aos 80 dias. Todavia, quando houve estimulação pela serotonina, devido à administração crônica da fluoxetina, os animais, ao 175 dias de vida a ingestão foi reduzida, demonstrando que houve o efeito anoréxico.

Já é bem descrito que a serotonina promove redução da ingestão alimentar, devido a sua ligação através dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}, contidos em neurônios de vias anorexígenas e orexígenas o hipotálamo (Halford e Blundell, 1996; Heisler et al, 2002, 2006). Baseados nesses aspectos, pesquisas, utilizando outro ISRS, como a dl-fenfluramina, mostram que mesmo havendo um aumento de serotonina no encéfalo de animais adultos jovens desnutridos, há uma dessensibilização ao neurotransmissor, por haver uma menor eficiência sobre a ingestão alimentar (Lopes-de-Souza et al., 2008). Outros resultados com outro ISRS, citalopram, nesse modelo de desnutrição, porém com uso de 12 dias em ratos de 120 dias, não observaram nenhuma mudança nos desnutridos, apenas no grupo normonutrido (Barreto Medeiros et al., 2002).

Entretanto, em nosso estudo com o ISRS, os dados mostram que a exposição crônica ao fármaco induziu adiantamento da saciedade com redução da ingestão alimentar em ratos com 180 dias de vida. Essas evidências sugerem que a serotonina provocou efeito anoréxico e que a responsividade à fluoxetina foi maior em animais adultos, que passaram por uma desnutrição precoce na vida. Além disso, demonstra que dependendo do tempo de exposição à esses fármacos, as respostas podem ser distintas no controle homeostático da alimentação. Outrossim, torna-se necessário compreender também a regulação hedônica, pois a circuitaria de estruturas envolvidas nesse controle, pode inibir ativação de vias orexígenas

quando ocorre a estimulação crônica, podendo provocar até distúrbios no comportamento alimentar.

Algumas pesquisas evidenciam que os animais desnutridos apresentaram aumento do consumo alimentar no período de recuperação nutricional associado a um aumento de expressão do receptor 5-HT_{1A} no núcleo ventromedial e ânterolateral do hipotálamo e com redução da expressão no núcleo arqueado, relacionando hiperfagia com programação fetal. Nesse período pode ocorrer diminuição do gasto energético e a medida que vai chegando a idade adulta, a necessidade de energia para crescimento vai reduzindo e normalizando a ingestão de alimentos (Manuel-Apolinar et al., 2014). Os animais que sofrem desnutrição no período gestacional e na lactação apresentam um estado de hiperfagia latente que só se desenvolve se ocorre o estímulo da alimentação palatável. Esta hiperfagia também pode acontecer pela dessensibilização ao receptor serotoninérgico ou ter a sua expressão diminuída, tendo como consequência o aumento do consumo alimentar, pois os níveis de serotonina destes animais são elevados (Lopes e Souza et al, 2008).

O efeito da serotonina sobre áreas hipotalâmicas, que controlam o comportamento alimentar, está associado também à ativação dos receptores 5HT_{1B} e seu efeito anorexígeno. Alterações no período crítico pode repercutir no processo de saciedade reduzindo a sensibilidade para esse receptor, favorecendo assim o aumento da duração e do tamanho da refeição (Lopes e Souza et al., 2008; Rodgers, 2013). Porém, todos esses efeitos sobre o controle alimentar podem estar relacionados ao tempo de exposição ao fármaco e ao grau de deficiência nutricional (Lopes-de-Souza et al., 2008). Portanto, é necessário realizar investigações nesse modelo para avaliar os níveis de neuropeptídeos reguladores do comportamento alimentar, bem como dos níveis do sistema serotoninérgico no hipotálamo.

O comportamento alimentar é o resultado de funções complexas e o resultado de processos neuroendócrinos que disparam o término do ato de comer, que é conhecido como saciação (Asarian e Bächler, 2014). A homeostase energética é sinalizada pela duração da refeição via respostas da saciação, que resulta de retroalimentação negativa dos sinais da periferia sobre o controle de vias hipotalâmicas (Stanley et al., 2005; Asarian e Bächler, 2014). A desnutrição por promover mudanças em áreas hipotalâmicas modifica esse comportamento.

No presente estudo, observou-se um retardo no aparecimento de saciação tanto em períodos iniciais da vida como na idade adulta de animais desnutridos. Esses animais apresentaram aumento na duração da refeição, indicando uma tendência a favorecer um balanço energético positivo, alterando assim a homeostase energética. Esses dados corroboram com um estudo anterior com o mesmo modelo de desnutrição, em que observaram que a hiperfagia resulta de uma menor estimulação de sinais para parar o ato de comer e aumento dos sinais para manter-se alimentando (Orozco-Solís et al., 2009). Por conseguinte o perfil de retardo de saciedade modifica após a aplicação crônica de fluoxetina nesses animais, como visto nos nossos resultados. Os animais desnutridos apresentou antecipação da saciedade, apresentando menor tamanho da refeição, sem modificar a duração na alimentação. Esses dados sugerem que os animais sobre desnutrição precoce são mais responsivos à fármacos que estimulam o sistema serotoninérgico e podem, dependendo da dosagem e do tempo de exposição a este, estimular a redução da ingestão. Vale ressaltar que não há relatos na literatura científica com este modelo sobre esses parâmetros, porém é necessário realizar mais experimentos para avaliar a circuitaria hipotalâmica, responsável pelo controle homeostático do comportamento alimentar.

Como discutido anteriormente, a circuitaria hipotalâmica contém receptores para a serotonina e a sua modulação pode tanto ativar vias anorexígenas como anorexígenas. O desenvolvimento de saciedade depende da ação dessas vias sobre a modulação também de peptídeos como POMC e NPY, por exemplo. Os neurônios que expressam tais peptídeos são regulados também por sinais provenientes do trato gastrointestinal, via distensão de estômago e demandas de energia sinalizadas por hormônios periféricos (Stanley et al., 2005; Berthoud et al., 2006, Wren e Bloom, 2007 ; Asarian e Bächler, 2014). A expressão do POMC, que é um neuropeptídeo anorexígeno, aprestou-se reduzida no hipotálamo de ratos adultos após desnutrição perinatal (Orozco-Solís et al., 2009 e aumentou a do NPY (Orozco-Solís et al., 2009; Rocha et al. 2014), neuropeptídeo orexígeno, após exposição à uma dieta hipercalórica (Orozco-Solís et al., 2009). Além disso, quando há estimulação aguda pela dl-fenfluramina os receptores 5-HT_{1B} encontram-se menos responsivos e favorece uma maior ingestão (Lopes-de-Souza et al., 2008). Hipotetizamos, que o tempo de exposição como foi diferente desse estudo, que o uso crônico à

antidepressivos estimulem outras áreas que fazem parte do controle do comportamento alimentar, como áreas hedônicas na presença de alimentos palatáveis. E essas circuitarias podem modular áreas hipotalâmicas envolvidas com o controle homeostático, fazendo assim que ocorra um aumento de peso e de consumo alimentar. Entretanto estas áreas não foram objetos deste estudo.

Pesquisas demonstram que uma restrição de dieta pode estimular a síntese de serotonina, que leva a uma regulação positiva de receptores 5-HT_{1A} e de receptores envolvidos com a hipofagia. Isso pode resultar em comportamentos ansiosos e supressão do apetite, quadros estes semelhantes ao que são observados em patologias como a anorexia nervosa (Haleen, 2012). Embora esse perfil de ingestão foi encontrado em nossos resultados, no grupo desnutrido que recebeu fluoxetina, o perfil de ansiedade não foi apresentado e não foi observado nenhum traço de tal comportamento, devendo-se a ação ansiolítica da serotonina. Lanio et al. (1993) demonstrou que após tratamento com ansiolíticos, diazepam e/ou aprezolam, na vida adulta, ratos desnutridos precocemente foram mais sensíveis a esse tratamento. Portanto, a serotonina pode favorecer a plasticidade comportamental nos animais adultos, desnutridos precocemente.

A influência direta da ingestão alimentar sobre funções encefálicas revela mecanismos celulares importantes que podem auxiliar em métodos preventivos e terapêuticos sobre outras disfunções que envolvem a cognição. O tempo de exposição a dieta ou restrição calórica no adulto tem sido descrita por alterar funções celulares no sistema nervoso e pode interferir na vulnerabilidade a lesões e surgimento de patologias. Entretanto, essa restrição na idade avançadas da vida pode estimular a produção de novos neurônios (neurogênese), realçar a neuroplasticidade que pode modular não só os aspectos do comportamento alimentar, mas também os aspectos cognitivos e pode favorecer a habilidade do encéfalo de resistir aos danos celulares (Fortán-Lozano et al., 2008). Essa resistência seria proveniente da plasticidade neural, resultante da habilidade das células a responderem ao estresse oxidativo e metabólico com a participação do sistema de neurotransmissores, bem como de fatores neurotróficos como o BDNF frente a uma restrição dietética (Mattson et al., 2003).

Em contrapartida, a restrição de dieta na fase perinatal reduz a proliferação celular no hipocampo de ratos adultos, porém não impede a diferenciação celular a

novos neurônios, componentes que podem favorecer o processos de plasticidade sináptica, como a memória (Matos et al., 2011). Essa plasticidade sináptica proveniente de uma restrição alimentar precoce pode interferir nos níveis de expressão de moduladores que participam da circuitaria hipocampal e a serotonina com seus receptores, principalmente à 5-HT1A estão presentes em neurônios colinérgicos e gabaérgicos nessa área. O hipocampo também, possui eferências serotoninérgicas provenientes do núcleo da rafe que modulam a ansiedade, medo, memória e aprendizagem (Djavadian et al., 2004). Sabe-se que a depleção da serotonina no encéfalo adulto resulta na supressão da neurogênese no giro denteado, enquanto a sua elevação, aumenta a taxa de neurogênese (Djavadian et al., 2004). Foi demonstrado em camundongos mutantes para o receptor 5-HT1A apresentam prejuízos em atividades de aprendizado e memória, dependentes do hipocampo, executadas no labirinto aquático de Morris e no labirinto Y (Sarnyai et al., 2000).

O prejuízo na plasticidade sináptica no hipocampo dos animais adultos, desnutridos precocemente, foi observado tanto nos aspectos celulares como comportamentais no presente estudo. Contudo, a sensibilidade da circuitaria hipocampal ficou evidente, nos aspectos moleculares, quando o sistema serotoninérgico foi estimulado pela fluoxetina. Vale ressaltar que, a desnutrição precoce *per si* não provocou alteração na expressão dos receptores 5-HT1A e da enzima MAO-A, nem do BDNF no hipocampo de ratos em idades tardias. Entretanto, observamos que no teste de reconhecimento de objetos, o grupo desnutrido reduziu o tempo de exploração do novo objeto, após a sessão teste, indicando que houve redução de memória a curto prazo. Esses dados evidenciam que esse tipo de memória de trabalho é modificado pela desnutrição. São raros dados na literatura científica sobre análises no teste de reconhecimento e desnutrição precoce, porém os estudos de Carlini et al. (2008), observam que com um restrição de 50% na dieta de fêmeas adultas, nesses camundongos tiveram prejuízos na memória de procedimento.

Por conseguinte, esses indivíduos encontram-se mais sensíveis às respostas serotoninérgicas, pois houve alteração não só da expressão do seu receptor quando da enzima de degradação, indicando que houve aumento de serotonina no hipocampo e que pode ser mediado também pelo BDNF, uma vez que também seus

níveis apresentaram-se aumentados. O aumento observado favoreceu a memória de longa duração nos indivíduos adultos, desnutridos no início da vida, porém não foram mais eficientes que os normonutridos. Uma vez que, o percentual de tempo explorando o novo objeto foi reduzido em comparação ao grupo controle. Esses dados traduzem que um organismo frente a uma agressão nutricional precoce tem prejuízos na execução do comportamento que se perpetuam ao longo da vida, mesmo havendo adaptações no sistema nervoso e promovendo respostas funcionais à essa estimulação ambiental. O organismo desnutrido mais uma vez, mostra-se nesse aspecto cognitivo, responsivos à modificações na circuitaria, que envolvem o sistema serotoninérgico e o BDNF; e com isso podem favorecer a sua adaptação ao meio.

Embora não observamos mudanças na expressão gênica de 5HT1A e de MAO-A de animais desnutridos sem a estimulação pelo ISRS, na literatura dados de proteínas mostram que os efeitos da restrição proteica não só acomete mudanças no sistema serotoninérgico no início da vida, mas em estágios mais avançados dos desenvolvimento com ou sem reabilitação proteica (Resnick e Morgane, 1984). Resultados mostram que hipocampo de ratos de 220 dias, que foram submetidos a restrição proteica de 6%, apresenta aumento de liberação de serotonina no estado basal e após estimulação dos slices com cloreto de potássio (Chen et al., 1992). A regulação de liberação da serotonina envolve não só os autoreceptores presentes em neuônios hipocámpais (Chen et al., 1992), mas também modulação por vias eferentes gabaérgica e glutamatérgica (Lista et al., 1988). Em desnutridos, estudos eletrofisiológicos mostram que há uma intensidade reduzida do ponto inicial de estimulação das vias perfurantes no giro denteado (Bronzino et al., 1996) e os neurônios requerem mais tempo de para responder a estimulação (Bronzino et al., 1996). Nos nossos dados, aumentos na expressão de componentes do sistema serotoninérgico, mostraram evidentes apenas após estimulação, vale ressaltar que observamos a expressão gênica. Diante dessas evidências, as respostas pré e pós transcricionais podem ser diferentes no sistema nervoso de um indivíduo que sofreu desnutrição precoce, revelando a necessidade de avaliar em trabalhos posteriores, a expressão proteica, bem como avaliar a distribuição dessas proteínas em áreas hipocámpais.

Os resultados de Wang e Xu (2007), com dieta hipoproteica a 6% no período perinatal demonstram que há uma diminuição da concentração dos níveis de BDNF em adultos jovens, sugerindo que a restrição proteica precoce pode ser um estímulo adverso para a atividade em testes de memória em ratos adultos jovens. O aumento do BDNF também é observado em hipocampo de camundongos sob dieta restrita apenas na vida adulta, resultando em um efeito de neuroproteção frente a excitotoxicidade proveniente da estimulação demasiada de receptores de cainato no hipocampo (Duan et al., 2001). Porém, não há trabalhos na literatura que relatem como estão os níveis de BDNF, nem níveis de componentes do sistema serotoninérgico em idades mais avançadas frente a uma restrição nutricional precoce.

Todavia para que ocorra a plasticidade sináptica no hipocampo a sinalização via BDNF deve ser favorecida. Quando ocorre interferências na circuitaria hipocampal, inibição de receptores glutamatérgicos ocorre supressão de níveis celulares de BDNF, efeito oposto quando utilizam antagonista para os receptores gabaérgicos (Zafra et al., 1991). Bem como, a plasticidade sináptica dependente de atividade neural para a indução da LTP que está relacionada com os níveis de BDNF no hipocampo (Castren et al., 1993; Patterson et al., 1996). O BDNF tanto age no terminal pré-sináptico modulando a liberação de glutamato como em neurônios pós-sinápticos, favorecendo a inserção de receptores glutamatérgicos envolvidos no mecanismo celular de memória (Slipczuk et al., 2009; Fortin et al., 2012). Na sinalização intracelular o BDNF promove a ativação de vias que envolvem ERK, CREB e PLC γ (Minichiello et al., 2002; Ying et al., 2002). Esses níveis repercutem sobre o remodelamento de sinápticos e formação de espinhas dendríticas e esses mecanismos de sinalização são múltiplos, que também incluem a ativação de AMPc, de nucleotídeos guanina Rac/RhoA (Hale et al., 2011; Ji et al., 2005; Lai et al., 2012). Além disso, no encéfalo maduro favorece a sobrevivência e crescimento celular (Martinowich e Lu, 2008). Essas evidências confirmam as funções essenciais para que ocorra o processo celular de memória e a deficiência na sinalização resulta em prejuízos cognitivos (Mu et al., 1999; Mizuno et al., 2000). Retardo de crescimento intrauterino proveniente da desnutrição gestacional podem reduzir os níveis de BDNF circulante em animais jovens (Malamitsi-Puchner et al., 2007; Wang e Xu, 2007; Coupé et al., 2009), porém com os nossos resultados em

idades mais avançadas não há modificações. As mudanças plásticas na vida adulta podem resultar na estabilidade da circuitaria hipocampal que envolvam a sinalização pelo BDNF em animais que sofreram desnutrição precoce. Por conseguinte, os dados demonstram que essa maquinaria celular pode ser responsiva quando há outros estímulos ambientais, como o farmacológico, que pode induzir o aumento da plasticidade sináptica no sistema nervoso de um indivíduo que já foi acometido por uma injúria. Isso pode favorecer no hipocampo de ratos adultos a sobrevivência celular.

Estudos bioquímicos, eletrofisiológicos e comportamentais têm proposto que agentes farmacológicos aumentar a sinalização de BDNF com seu receptor TrkB, dentre eles está os antidepressivos, além das ampaquinas e agonistas de receptores estrogênicos, resultando assim, na eficiência dos comportamentos cognitivos (Ninan, 2014). Pesquisas sugerem a existência de uma retroalimentação de controles autócrino e parácrino regulando o fenótipo neuronal serotoninérgico sob a regulação positiva do BDNF, indicando a sua participação no desenvolvimento nessas células (Galter and Unsicker, 2000a, b). A indução pelo BDNF do fenótipo celular serotoninérgico parece estar vinculada a uma regulação reduzida mediada pelo 5-HT_{1A}, que irá resultar em um aumento da produção de AMPc e consequentemente aumentará níveis intracelulares de triptofano e liberação da serotonina na fenda sináptica (Galter and Unsicker, 2000a, b). Experimentos com microdiálise em ratos adultos revelaram que níveis de serotonina extracelular são reduzidos após injeção intra-hipocampal de BDNF. Esse efeito pode ser resultado de aumento da captação da serotonina pela SERT (Benmansour et al., 2008). Outros observaram que há uma superexpressão de SERT acompanhado de níveis reduzidos de serotina basal (Jennings et al., 2006). Resultados também mostram que camundongos modificados geneticamente para o BDNF apresentam diminuição da capacidade de recaptura de serotonina e seus níveis basais aumentados no hipocampo de ratos (Guiard et al., 2008). Além disso, o tratamento crônico com antidepressivos ativam rapidamente os receptores do BDNF (Rantamäki et al., 2007). Entretanto pouco sabe-se sobre os mecanismos celulares de controle do BDNF sobre o sistema serotoninérgico.

Essas evidências reforçam nossa hipótese que a responsividade das neurônios hipocâmpais dos desnutridos foram ativadas pela serotonina e que essas células podem ter a modulação pelo BDNF, uma vez que os níveis de expressão aumentaram para todos esses componentes neurais. Essas respostas refletiram sobre a memória de longa duração. Porém é necessário investigar a cascata de sinalização envolvida nesse processo de plasticidade sináptica, bem como avaliar outros comportamentos. Dessa forma, poderá auxiliar na compreensão de mecanismos integrados em um cérebro acometido por uma má nutrição no início da vida. Como também, futuramente pode-se obter dados importantes para traçar alternativas preventivas e terapêuticas para que auxiliem o tratamento de patologias na idade adulta, como distúrbios de humor que são associados com distúrbios alimentares, e que também podem ter origem no início da vida.

8 CONCLUSÃO

A desnutrição proteica precoce provoca modificações a longo prazo, reduzindo o perfil de redução de peso até a idade adulta, provoca hiperfagia e retardo de saciação no comportamento alimentar. Além disso, altera a memória de procedimento. Essas modificações nesses indivíduos adultos, que foram desnutridos no início da vida, são revertidas pela estimulação crônica ao sistema serotoninérgico, apresentando-se com uma maior responsividade tanto comportamentais e moleculares.

Portanto, essas evidências sugerem que o estímulo do inibidor seletivo de recaptura ativou o sistema serotoninérgico, que repercutiu sobre a plasticidade sináptica hipotalâmica e hipocampal, elevando a expressão do BDNF nos animais adultos desnutridos precocemente. Assim, essas alterações podem interferir no controle homeostático do comportamento alimentar, como também pode favorecer processos de memória nesse organismo.

.

.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.; BARONE, S.J.R. et al. Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: neurobehavioral work group summary. **Environ Health Perspect**, 108 Suppl, 3, 535-44, Jun, 2000. Jun; Review.
- AGNOUX, A.M.; ANTIGNAC, J.P.; SIMARD, G.; POUPEAU, G.; DARMAUN, D.; PARNET, P.; ALEXANDRE-GOUABAU, M.C. Time window-dependent effect of perinatal maternal protein restriction on insulin sensitivity and energy substrate oxidation in adult male offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 15, 307(2), R184-97, Jul, 2014.
- AKITAKE, Y.; KATSURAGI, S.; HOSOKAWA, M.; et al. Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring. **nutrition research**, 35, 76 – 87, 2015.
- ALMEIDA, S.S.; TONKISS, J.; GALLER, J.R. Prenatal protein malnutrition affects avoidance but not escape behavior in the elevated T-maze test. **Physiol Behav**, 60(1), 191-5, Jul, 1996.
- ALONSO, M.; VIANNA, M.R. et al. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. **Cell Mol Neurobiol**. 22(5-6):663-74, Dec, 2002.
- ANGUITA, R.M.; SIGULEM, D.M.; SAWAYA, A.L. Intrauterine food restriction is associated with obesity in young rats. **J Nutr**, 123, 1421–1428, 1993.
- APONTE, Y.; ATASOY, D.; STERNSON, S.M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. **Nat Neurosci**. 14(3), 351-5, Mar, 2011.
- ASARIAN, L.; BÄCHLER, T. Neuroendocrine control of satiation. **Horm Mol Biol Clin Investig**, 19(3), 163-92, Sep, 2014.
- BARBAS, D.; DESGROSEILLERS, L.; et al. Multiple serotonergic mechanisms contributing to sensitization in aplysia: evidence of diverse serotonin receptor subtypes. **Learn Mem**, 10(5), 373-86, Sep-Oct, 2003.
- BARKER, D. J. P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of internal medicine**, 1365-2796, 2007.

BARRETO MEDEIROS, J.M.; CABRAL FILHO, J.E.; DE SOUZA, S.L.; et al. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. **Nutr Neurosci.**, 5(3), 211-4, Jun, 2002.

BARROS, K.M.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; LOPES-DE-SOUZA, S.; et al. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutr Neurosci.**, 9(1-2), 99-104, 2006.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends. **Cad Saude Publica.**, 19 Suppl 1, S181-91, 2003.

BAYOL S, JONES D, et al. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. **Br J Nutr.**, 91(3), 331-9, Mar, 2004.

BEKINSCHTEIN, P. BDNF and memory processing. **Neuropharmacology** (76), 677-683, 2014.

BELLAR, D.; GLICKMAN, E.L.; et al. Serum insulin like growth factor-1 is associated with working memory, executive function and selective attention in a sample of healthy, fit older adults. **Neuroscience.**, 31, 178,133-7, Mar, 2011.

BELLINGER, L. Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. **Int J Obes Londres.**, 30(5), 729-38, May, 2006.

BENMANSOUR, S.; DELTHEIL T, PIOTROWSKI J et al. Influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on serotonin neurotransmission in the hippocampus of adult rodents. **European Journal of Pharmacology.**, 587, 90–98, 2008

BERTHOUD H.R.; SUTTON G.M.; TOWNSEND R.L.; PATTERSON L.M.; ZHENG H. Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. **Physiol Behav.**, 89,517–24, 2006

BRASEL, J.A.; WINICK, M. Maternal nutrition and prenatal growth. Experimental studies of effects of maternal undernutrition on fetal and placental growth. **Arch Dis Child.**, 47 (254), 479-85, Aug,1972.

BREZUM, J.M.; DASZUTA, A. Serotonergic reinnervation reverses lesion-induced decreases in PSA-NCAM labeling and proliferation of hippocampal cells in adult rats. **Hippocampus.**, 10, 37–46, 2000.

BRONZINO, J. D.; AUSTIN-LAFRANCE, R. & MORGANE, P. J. Effects of prenatal protein malnutrition on perforant path kindling in the rat. **Brain Res.**, 515, 45-50, 1990.

BRONZINO, J. D.; AUSTIN-LAFRANCE, R. J.; SIOK, C. J. & MORGANE, P. J. Effect of protein malnutrition on hippocampal kindling: electrographic and behavioral measures. **Brain Res.**, 384, 348-354, 1986.

CAO, J.; LIU, J.; et al. The selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635 inhibits neuronal activity of the ventromedial prefrontal cortex in a rodent model of Parkinson's disease. **Neurosci Bull.**, 23(6), 315-22, Nov, 2007.

CALABRESE, F. Acute stress responsiveness of the neurotrophin BDNF in the rat hippocampus is modulated by chronic treatment with the antidepressant duloxetine. **Neuropsychopharmacology**. 34(9), 2196, Aug, 2009.

CARLINI, V.P.; MARTINI, A.C.; SCHIÖTH, H.B.; RUIZ R, D.; FIOL DE CUNEO, M.; DE BARIOGLIO, S.R. DECREASED MEMORY FOR NOVEL OBJECT RECOGNITION IN CHRONICALLY FOOD-RESTRICTED MICE IS REVERSED BY ACUTE GHRELIN ADMINISTRATION. **BEHAVIOURAL NEUROSCIENCE.**, VOLUME 153, ISSUE 4, 2, PAGES 929–934 , JUNE 2008.

CARLSON, E. S. et al. Perinatal iron deficiency results in altered developmental expression of genes mediating energy metabolism and neuronal morphogenesis in hippocampus. **Hippocampus**, v. 17, n. 8, p. 679-91, 2007.

CASTREN, E.; PITKANEN, M.; SIRVIO, J.; PARSADANIAN, A.; LINDHOLM, D.; THOENEN, H.; RIEKKINEN, P.J. The induction of LTP increases BDNF and NGF mRNA but decreases NT-3 mRNA in the dentate gyrus. **Neuroreport.**, 4, 895–898, 1993.

CHEN, J.C.; TONKISS, J.; GALLER, J.R.; VOLICER, L. Prenatal protein malnutrition in rats enhances serotonin release from hippocampus. **J Nutr.**, 122(11), 2138-43, nov, 1992.

CHEN, H.; LI, H.; CHUANG, D.M. Role of second messengers in agonist up-regulation of 5-HT_{2A} (5-HT₂) receptor binding sites in cerebellar granule neurons: involvement of calcium influx and a calmodulin-dependent pathway. **J Pharmacol Exp Ther.** 275(2):674-80, nov 1995

;

CHOI S.H.; LI Y., PARADA L.F.; SISODIA, S.S. Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF. **Mol Neurodegener.**, 21, 4:52, Dec, 2009.

CINTRA, L.; AGUILAR, A.; et al. Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups. **Hippocampus**. 7(2),192-203,1997.

CINTRA, L.; DÍAZ-CINTRA, S.; et al. Effects of protein undernutrition on the dentate gyrus in rats of three age groups. **Brain Res**. 5,532(1-2), 271-7, Nov, 1990.

CORDEIRA, J.W.; et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates hedonic feeding by acting on the mesolimbic dopamine system. **J Neurosci**.17,30(7), 2533-41, fev, 2010.

COUPÉ, B. et al. Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. **J Neuroendocrinol**, v. 21, n. 1, p. 40-8, Jan, 2009.

COUTINHO, J. G.; GENTIL, P. C.; et al. Malnutrition and obesity in Brazil: dealing with the problem through a unified nutritional agenda. **Cad Saude Publica**, v. 24, Supl 2, p. S332-40, 2008.

CURZON, G. Serotonin and appetite. **Ann N Y Acad Sci.**, 600, 521-30, discussion, 530-1, 1990.

DAUNCEY, M.J.; BICKNELL, R.J.; Nutrition and neurodevelopment: mechanisms of developmental dysfunction and disease in later life. **Nutr Res Rev**. 12(2), 231-53, Dec, 1999.

DEIRÓ, T.C.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; et al. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. **Physiol Behav**. 28, 87(2), 338-44, Feb, 2006.

DELTHEIL, T.; GUIARD, B.P.; CERDAN, J.; et al. Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice. **Neuropharmacology**., 55, 1006–1014, 2008.

DE MOURA, E.G.; LISBOA, P.C.; et al. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. **J Nutr Biochem**. 18(2), 134-9, Feb, 2007.

DE SOUZA, S.L.; NOGUEIRA, M.I.; et al. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. **Physiol Behav.** 15, 82(2-3), 375-9, Sep, 2004.

DESAI, M. et al. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 288(1), R91-6. Epub, 5 de Aug 2004.

DIETRICH, M.O.; HORVATH, T.L. Feeding signals and brain circuitry. **Eur J Neurosci.**, 30(9), 1688-96, Nov, 2009. Review.

DJAVADIAN, R.L. Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. *Acta Neurobiol Exp (Wars).*, 64(2), 189-200, 2004. R

DOBBING J, SANDS J. Cell size and cell number in tissue growth and development. An old hypothesis reconsidered. **Arch Fr Pediatr.** 42(3):199-203, Mar,1985.

DRINGENBERG, H. C.; Chronic Fluoxetine Treatment Suppresses Plasticity (Long-Term Potentiation) in the Mature Rodent Primary Auditory Cortex In Vivo. **Neural Plasticity**, Article ID 571285, 9 pages, 2014.

DUAN, W.; LEE, J.; GUO, Z. AND MATTSON, M. P. Dietary restriction stimulates BDNF production in the brain and thereby protects neurons against excitotoxic injury. **J. Mol. Neurosci.**, 16, 1–12, 2001.

EDMANN, E. et al. Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. **Neuropharmacology.**, 76, 610-627, 2014.

FAZELI, P. K. AND KLIBANSKI, A. Determinants of Growth Hormone Resistance in Malnutrition. **J Endocrinol.**, 220(3), R57–R65, 2015.

FERNO, J.; VARELA, L.; et al. Olanzapine-induced hyperphagia and weight gain associate with orexigenic hypothalamic neuropeptide signaling without concomitant AMPK phosphorylation. **PLoS One.** 6(6), e20571, 2011.

FERRAZ AC, ANSELMO-FRANCI JA, et al. Amino acid and monoamine alterations in the cerebral cortex and hippocampus of mice submitted to ricinine-induced seizures. **Pharmacol Biochem Behav.** 72(4), 779-86, Jul, 2002.

FONTÁN-LOZANO, A.; LÓPEZ-LLUCH, G.; DELGADO-GARCÍA, J.M.; NAVAS, P.; CARRIÓN, A.M. Molecular bases of caloric restriction regulation of neuronal synaptic plasticity. **Mol Neurobiol.**, 38(2),167-77, Oct, 2008.

FORTIN, D.A.; SRIVASTAVA, T.; DWARAKANATH, D.; PIERRE, P.; NYGAARD, S.; DERKACH, V.A.; SODERLING, T.R. Brain-derived neurotrophic factor activation of CaM-kinase kinase via transient receptor potential canonical channels induces the translation and synaptic incorporation of GluA1-containing calcium-permeable AMPA receptors. **J Neurosci.**, 32, 8127–8137, 2012.

FUKAMI, T.M.D.; SUN, X.; LI, T.; DESAI, M.; ROSS, M.G. Mechanism of Programmed Obesity in Intrauterine Fetal Growth Restricted Offspring: Paradoxically Enhanced Appetite Stimulation in Fed and Fasting States. **Reprod Sci.**, 19(4), 423-430, 2012.

FUJIMIYA, M.; ITOH, E.; et al. Neuropeptide Y induces fasted pattern of duodenal motility via Y(2) receptors in conscious fed rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 278(1):G32-8, 2000 Jan

FULLER, G.N.; WIGGINS, R.C.; Differential growth recovery within the brains of postnatally undernourished rats. **Brain Res.**, 317(2), 280-2, Aug, 1984.

GALTER D.; UNSICKER K. Sequential activation of the 5HT1 (A) serotonin receptor and TrkB induces the serotonergic neuronal phenotype. **Mol Cell Neurosci.**, 15(5), 446-55, May, 2000.

GALTER E KLAUS U. Brain-Derived Neurotrophic Factor and trkB Are Essential for cAMP-Mediated Induction of the Serotonergic Neuronal Phenotype **Journal of Neuroscience Research.**, 61, 295–301, 2000.

GAT-YABLONSKI, G and PHILLIP , M. Nutritionally-Induced Catch-Up Growth. **Nutrients.**, 7, 517-551, 2015.

GEORGE, L.A.; ZHANG, L.; TUESSUJIANG, N.; et al. Early maternal undernutrition programs increased feed intake, altered glucose metabolism and insulin secretion, and liver function in aged female offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 302(7), R795-804, 2012.

GEROZISSIS, K.; ROUCH, C.; et al. A potential role of central insulin in learning and memory related to feeding. **Cell Mol Neurobiol.** 21(4): 389-401, Aug. 2001

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Science.**, 305, 1733-1736, 2004.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A. The developmental origins of the metabolic syndrome. **Trends Endocrinol Metab.**, 15: 183-187, 2004.

GNIULI, D.; et al. Effects of high-fat diet exposure during fetal life on type 2 diabetes development in the progeny. **J Lipid Res**, v. 49, n. 9, p. 1936-45, Sep 2008.

GRAY, J.; YEO, G.S.; et al. Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. **Diabetes**, 55(12): 3366-71, Dec, 2006.

GROVE, K.L.; SMITH, M.S. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. **Physiol Behav.**, 79(1):47-63, Jun, 2003. Review.

GUEDES, R.C.; MONTEIRO, J.S.; et al. Malnutrition and brain function: experimental studies using the phenomenon of cortical spreading depression. **Rev Bras Biol.** 56, 2:293-301, Dec, 1996

GUIARD, B.P.; DAVID, D.J.; DELTHEIL, T.; CHENU, F.; LE MAITRE, E.; RENOIR, T.; LEROUX-NICOLLET, I.; SOKOLOFF, P.; LANFUMEY, L.; HAMON, M.; ANDREWS, A.M.; HEN, R.; GARDIER, A.M. Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice exhibit a hippocampal hyperserotonergic phenotype. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, 11, 79–92, 2008.

GUZMA'N-QUEVEDO, O.; et al. Impaired Hypothalamic mTOR Activation in the Adult Rat Offspring Born to Mothers Fed a Low-Protein Diet. **Nutrient Sensing and Metabolic Programming**, Volume 8, Issue 9, September, 2013.

HALE, C.F.; DIETZ, K.C.; VARELA, J.A.; WOOD, C.B.; ZIRLIN, B.C.; LEVERICH, L.S.; GREENE, R.W.; COWAN, C.W. Essential role for vav Guanine nucleotide exchange factors in brain-derived neurotrophic factor-induced dendritic spine growth and synapse plasticity. **J Neurosci.**, 31, 12426–12436, 2011.

HALES, C.N.; BARKER, D.J.; et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **BMJ.**, 303: 1019-1022, 1991.

HALES, C.N.; BARKER, D.J. The thrifty phenotype hypothesis. **Br Med Bull.**, 60: 5-20, 2001.

HALEEM, D.J. Serotonin neurotransmission in anorexia nervosa. **Behav Pharmacol.**, 23(5-6), 478-95, sep, 2012.

HALFORD, J.C.; BLUNDELL, J.E.; The 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence. **Physiol Behav.**, 60(3):933-9, Sep,1996.

HALFORD, J.C.; WANNINAYAKE, S.C.; BLUNDELL, J.E.; Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. **Pharmacol Biochem Behav.**, 61(2):159-68, Oct, 1998.

HASHIMOTO, K.; KOIZUMI, H.; et al. Role of brain-derived neurotrophic factor in eating disorders: Recent findings and its pathophysiological implications. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.**, 29:499–504, 2005.

HEISLER, L.K.; COWLEY, M.A.; TECOTT, L.H.; et al. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. **Science.**, 26, 297(5581), 609-11, Jul, 2002.

HEISLER, L.K.; JOBST, E.E.; SUTTON, G.M.; et al. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake **Neuron.**, 20,51(2), 239-49, Jul, 2006.

HERNANDEZ A, et al: Effect of Prenatal Protein Malnutrition on Long-Term Potentiation and BDNF Protein Expression in the Rat Entorhinal Cortex after Neocortical and Hippocampal Tetanization. **Neural Plasticity.**, 9 pages, 2008.

HOMBERG, J.R.; et al. The serotonin-BDNF duo: developmental implications for the vulnerability to psychopathology. **Neurosci Biobehav.**, 43:35-47, Rev Jun, 2014.

IKENASIO-THORPE, B.A.; BREIER, B.H.; et al. Prenatal influences on susceptibility to diet-induced obesity are mediated by altered neuroendocrine gene expression. **J Endocrinol.** 193(1): 31-7. Apr, 2007.

IQBAL, J.; ELMQUIST, J.K.; et al. Postnatal neurogenesis of the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei in the Brazilian opossum brain. **Brain Res Dev Brain Res.**, 18;85(2),151-60, Apr,1995.

ISHIDA, J.; TAKADA, M.; et al. 3,4-Dimethoxybenzylamine as a sensitive pre-column fluorescence derivatization reagent for the determination of serotonin in human platelet-poor plasma. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl.** 25;692(1):31-6, Apr,1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; DE SOUZA, M.M.; MELLO E SOUZA, T. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. **Neurobiol Learn Mem.**, 69(3):219-24, May, 1998.

JAHNKE, S.; BEDI, K.S. Undernutrition during early life increases the level of apoptosis in the dentate gyrus but not in the CA2+CA3 region of the hippocampal formation. **Brain Res.** 27;1143, 60-9, Apr, 2007.

JANG, H. et al. Nutrition, Epigenetics, and Diseases. **Clin Nutr Res.**, 3,1-8, 2014.

JENNINGS, K.A.; LODER, M.K.; SHEWARD, W.J.; et al. Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. **J. Neurosci.**, 26, 8955–8964, 2006.

JENSEN NH, CREMERS TI, SOTTY F. Therapeutic potential of 5-HT_{2C} receptor ligands. **Scientific World Journal.**, 14,10, 1870-85, sep, 2010.

JI, Y.; PANG, P.T.; FENG, L.; LU, B. Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. **Nat Neurosci.**, 8,164–172, 2005.

JOVANOVIC JN, CZERNIK AJ, et al. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. **Nat Neurosci.** 3(4): 323-9, Apr 2000.

KAGOTANI, Y.; TSURUO, Y.; et al. Synaptic regulation of paraventricular arginine vasopressin-containing neurons by neuropeptide Y-containing monoaminergic neurons in rats. Electron-microscopic triple labeling. **Cell Tissue Res.**, 257(2), 269-78, Aug, 1989.

KAHL, P.E.; GÖTZ, F.; et al. The influence of sex-specific brain differentiation and of postpuberal sex hormone levels on the development of sex-specific differences of body weights as well as triglyceride, high-density-lipoprotein-cholesterol and total cholesterol serum levels in rats. **Exp Clin Endocrinol.** 86(1), 7-16, Aug, 1985.

KAWAGUCHI, Y.; HAMA, K. Physiological heterogeneity of nonpyramidal cells in rat hippocampal CA1 region. **Exp Brain Res.** 72(3), 494-502, 1988.

KENNETT, G. A C. T.; DOURISH & G. CURZON. 5-HT₁ agonists induce anorexia at a postsynaptic site. **Eur. J. Pharmacol.** 141, 429-435, 1987.

LAI, J.C.; LEUNG, T.K.; LIM, L. Brain regional distribution of glutamic acid decarboxylase, choline acetyltransferase, and acetylcholinesterase in the rat: effects

of chronic manganese chloride administration after two years. **J Neurochem.** 36(4),1443-8, Apr, 1981.

LAI, K.O.; WONG, A.S.; CHEUNG, M.C.; X.U. P.; LIANG, Z.; LOK, K.C.; XIE, H.; PALKO, M.E.; YUNG, W.H.; TESSAROLLO, L.; CHEUNG, Z.H.; IP, N.Y. TrkB phosphorylation by Cdk5 is required for activity-dependent structural plasticity and spatial memory. **Nat Neurosci.**, 15,1506–1515, 2012.

LAM, D.D.; PRZYDZIAL, M.J.; RIDLEY, S.H.; et al. Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. **Endocrinology.** 149(3),1323-8, Mar, 2008.

LEAHY, J.P.; STERN, W.C.; et al. A neuropharmacological analysis of central nervous system catecholamine systems in development protein malnutrition. **Dev Psychobiol.** 11(4), 361-70, Jul, 1978.

LEVITSKY DA, BARNES RH. Nutritional and environmental interactions in the behavioral development of the rat: long-term effects. **Science.** 7; 176(4030), 68-71, Apr,1972.

LISTA, A.; ARBILLA, S. & LANGER, S. Z. Modulation of the electrically evoked release of 5-[³H]hydroxytryptamine from rat cerebral cortex: effects of alpidem, CL 218872, and diazepam. **J. Neurochem.**, 51, 1414-1421, 1988.

LI, Y.C.; WANG, F.M. et al. Antidepressant-like effects of curcumin on serotonergic receptor-coupled AC-cAMP pathway in chronic unpredictable mild stress of rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 30, 33(3), 435-49, Apr, 2009.

LIU, J.; GARZA, J.C. et al. Melanocortin-4 receptor in the medial amygdala regulates emotional stress-induced anxiety-like behaviour, anorexia and corticosterone secretion. **Int J Neuropsychopharmacol.** 16(1), 105-20. 2013 Feb

LIU, X.; ZHANG, J.; SUN, D.; et al. Effects of fluoxetine on brain-derived neurotrophic factor serum concentration and cognition in patients with vascular dementia. **Clinical Interventions in Aging.**, 9, 411-19, 2014.

LOPES DE SOUZA, S.et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **Eur J Neurosci.**, 27(6),1400-8, Mar, 2008.

LOPES, L.S.; PEREIRA, S.S.; et al. Antinociceptive effect of topiramate in models of acute pain and diabetic neuropathy in rodents. **Life Sci.** 16, 84(3-4),105-10, Jan, 2009.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, v. 156, p. 38-50, discussion 50-5, 1991.

MALAMITSI-PUCHNER, A.; NIKOLAOU, K.E.; ECONOMOU, E.; et al. Intrauterine growth restriction and circulating neurotrophin levels at term. **Early Hum Dev.**, 83(7),465-9, Jul, 2007.

MALBERG, J.E.; EISCH, A.J.; et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **J Neurosci.**, 20(24): 9104-10, Dec, 2000.

MANHAES-DE-CASTRO, R.; et al. Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. **Braz J Med Biol Res.**, v. 34, n. 1, p. 121-4, Jan 2001.

MANJARREZ, G.; MANUEL-A, L.; MERCADO-C, R.; HERNANDEZ-R, J. Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. **Int J Dev Neurosci.**, 21(5), 283-9, Aug, 2003.

MANJARREZ-GUTIÉRREZ, G.; et al. Increased expression of tryptophan-5-hydroxylase 1, but not 2, in brainstem as a result of intrauterine malnutrition. **Int. J. Devl Neuroscience.**, 30, 445–450, 2012.

MANUEL-APOLINAR, L.; ROCHA, L.; DAMASIO, L.; TESORO-CRUZ, E.; ZARATE, A. Prenatal undernutrition and neurotransmitters in adults. **Molecular. medicine reports**, 9, 407-412, 2014.

MARTIN AGNOUX, A.; ANTIGNAC, J.P.; BOQUIEN, C.Y.; et al. Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: potential role on pup growth and metabolic status. **J Nutr Biochem.**, 26(7),784-95, Jul 2015.

MARTINOWICH, K.; LU, B. Interaction between BDNF and Serotonin: Role in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology.**, reviews, 33, 73–83, 2008.

MATOS, R. J.; et al. Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. **Neuroscience.**, 196,16-24, 2011.

MATTSON, M.P.; DUAN, W.; GUO, Z. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. **J Neurochem.**, 84(3), 417-31, Feb, 2003.

MCAVOY, K.; RUSSO, C.; KIM, S.; RANKIN, G.; SAHAY, A. Fluoxetine induces input-specific hippocampal dendritic spine remodeling along the septotemporal axis in adulthood and middle age. **Hippocampus**, 2015.

MEDEIROS, J.M.; SILVA, C.M.; SOUGEY, E.B.; et al. Action of selective serotonin reuptake inhibitor on aggressive behavior in adult rat submitted to the neonatal malnutrition. **Arq Neuropsiquiatr.** 59(3-A), 499-503, Sep, 2001.

MEHEDINT, M.G.; CRACIUNESCU, C.N.; ZEISEL, S.H.; Maternal dietary choline deficiency alters angiogenesis in fetal mouse hippocampus. **Proc Natl Acad Sci.** 20,107(29), Jul, 2010.

MINEUR, Y. S.; ABIZAID, A.; et al Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons. **Science.**,10, 332, 1330-2, Jun, 2011.

MINICHIELLO, L.; CALELLA, A.M.; MEDINA, D.L.; BONHOEFFER, T.; KLEIN, R.; KORTE, M.; Mechanism of TrkBmediated hippocampal long-term potentiation. **Neuron.**, 36:121–137, 2002.

MIZUNO M, YAMADA K, OLARIU A, NAWA H, NABESHIMA T. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in spatial memory formation and maintenance in a radial arm maze test in rats. **J Neurosci.**,15,20(18),7116-21, Sep, 2000.

MOLODTSOVA, G.F. Serotonergic mechanisms of memory trace retrieval. **Behav Brain Res.**,16,195(1), 7-16, 2008.

MONTAG, C.; REUTER, M.; NEWPORT, B.; ELGER, C.; WEBER, B. The BDNF Val66Met polymorphism affects amygdala activity in response to emotional stimuli: evidence from a genetic imaging study. **Neuroimage.**, 42,1554–1559, 2008.

MONTE, C. Malnutrition: a secular challenge to child nutrition. **J Pediatric.** 76 Suppl 3:S285-97, Nov, 2000.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 26, n. 4, p. 471-83, Jun 2002.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev.** 17(1), 91-128, 1993.

MUAKU, S.M.; BEAULOYE, V.; THISSEN, J.P.; et al. Long-term effects of gestational protein malnutrition on postnatal growth, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF-binding proteins in rat progeny. **Pediatr Res.**, 39(4 Pt 1), 649-55, April 1996.

MURER, M.G.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.**, 63(1) 71-124, Review, Jan, 2001.

MURPHY, T. Et al. Effects of Diet on Brain Plasticity in Animal and Human Studies Mind the Gap. **Neural Plasticity.**, Volume 2014.

NIBUYA M.; NESTLER E.J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. **J Neurosci.**, 16(7), 2365-72, Apr, 1996.

NINAN, I. Synaptic regulation of affective behaviors; role of BDNF. **Neuropharmacology.** 76 Pt C:684-95, Jan, 2014.

OGREN, S.O.; ERIKSSON, T. M.; ELVANDER-TOTTIE, E.; et al. The role of 5-HT(1A) receptors in learning and memory. **Behav Brain Res.**, 16, 195(1), 54-77, Dec, 2008.

OROZCO-SÓLIS, R.; LOPES DE SOUZA, S.; MATOS, R.J.B.; et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is dependent of the developmental programming of feeding. **Physiology & Behavior.**, 96, 481-492, 2009.

OROZCO-SOLÍS R, MATOS RJB, GUZMÁN-QUEVEDO O, et al. Nutritional Programming in the Rat Is Linked to Long- Lasting Changes in Nutrient Sensing and Energy Homeostasis in the Hypothalamus. **Plos One.**, 5(10), 2010.

ORUAMABO, R.S. Children malnutrition and the millennium development goals: much haste but less speed? **Arch dis child.**, 100 suppl: S19-22, 2015.

OURY, F.; YADAV, V.K.; et al. CREB mediates brain serotonin regulation of bone mass through its expression in ventromedial hypothalamic neurons. **Genes Dev.** 15, 24(20), 2330-42, Oct, 2010. Oct.

PANJA, D. et al. BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown Clive R. Bramhama , **Neuropharmacology**, 76, 664-676, 2014.

PATTERSON S.L.; ABEL, T.; DEUEL T.A.; MARTIN K.C.; ROSE J.C.; KANDEL E.R.; Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. **Neuron**. 16,1137–1145, 1996.

PELLOW, S.; et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**,14(3),149-67, 1985

PLAGEMANN, A.; et al. Interaction of genetic and environmental programming of the leptin system and of obesity disposition. **Physiol Genomics**, 9,3(2),113-20, Agosto, 2000.

POZZO MILLER, L.D.; AOKI, A.; Postnatal development of the hypothalamic ventromedial nucleus: neurons and synapses. **Cell Mol Neurobiol**. 12(2),121-9, Apr,1992.

RAMIRES, E.K.; DE MENEZES, R.C.; et al.Nutritional status of children and adolescents from a town in the semiarid Northeastern Brazil. **Rev Paul Pediatr**, 32(3), 200-7, Sep, 2014.

RANTAMÄKI, T.; HENDOLIN, P.; KANKAANPAA, A.; MIJATOVIC, J.; PIEPPONEN, P.; DOMENICI, E.; CHAO, M.V.; MANNISTO, P.T.; CASTREN, E. Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. **Neuropsychopharmacology**, 32, 2152–2162, 2007.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov, 1993.

REHFELDT, C.; LEFAUCHEUR, L.; JANA BLOCK, J.; et al. Limited and excess protein intake of pregnant gilts differently affects body composition and cellularity of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue of newborn and weanling piglets. **Eur J Nutr**, 51(2), 151-165, 2012.

REMACLE, C.; et al. Intrauterine programming of the endocrine pancreas. **Diabetes Obes Metab**, v. 9 , Suppl 2, p. 196-209, Nov, 2007.

RESNICK, O. & MORGANE, P. J. Ontogeny of the levels of serotonin in various parts of the brain in severely protein mal nourished rats. **Brain Res.**, 303, 163-170, 1984.

ROCHA-DE-MELO, AP.; GUEDES, R.C. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Braz J Med Biol Res.**, 30(5), 663-9, May,1997.

RODGERS, R.J.; WRIGHT, F.L. On the behavioural specificity of hypophagia induced in male rats by mCPP, naltrexone, and their combination. **Psychopharmacology (Berl.)**, 231(4),787-800, Feb, 2014.

RODRÍGUEZ, E.M.; BLÁZQUEZ, J.L.; GUERRA, M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. **N Peptides.**, 31(4), 757-76, Apr, 2010.

RUBIO, F. J. Long-term fluoxetine treatment induces input-specific LTP and LTD impairment and structural plasticity in the CA1 hippocampal subfield. v. 7, artigo 66, may 2013.

SARNYAI, Z.; SIBILLE, E.L.; PAVLIDES, C.; FENSTER, R.J.; MCEWEN, B.S.; TOTH, M. Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 19,97(26),14731-6, Dec, 2000.

SCHWARTZ, M.W.; WOODS, S.C.; et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**. 6, 404(6778), 661-71, Apr, 2000.

SCLAFANI, A.; XENAKIS, S. Influence of diet form on the hyperphagia-promoting effect of polysaccharide in rats. **Life Sci.**, 26, 34(13), 1253-9. Mar 1984.

SHI, S.; CHEN, Z.; et al. Effects of lead on neurobehavior and neurochemistry in rats. 29(2), 80-2, Mar, 1995.

SIMPSON, K.A.; MARTIN, N.M.; BLOOM, S.R. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, 53(2), 120-8, Mar, 2009.

SLIPCZUK, L.; BEKINSCHTEIN, P.; KATCHE, C.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. **PLoS One.**, 4:e6007, 2009.

SMART, J.L. Under nutrition during early life and its effects on animal development and behaviour. **Neuropharmacology.** 20(12B), 1251-2, Dec, 1981.

SPIELDENNER, J. Health economic perspectives of pediatric malnutrition: determinants of innovative progress. **Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program.**, v. 66, p. 97-109, 2010.

STANLEY, S.; WYNNE, K.; MCGOWAN, B.; BLOOM, S. Hormonal regulation of food intake. **Physiol Rev.**, 85,1131–58, 2005.

STEAD, J.D.; et al; Transcriptional profiling of the developing rat brain reveals that the most dramatic regional differentiation in gene expression occurs postpartum. **J Neurosci.**, 26(1), 345-53, Epub 2006.

SWART, I.; JAHNG, J.W.; et al. Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 283(5), R1020-6, Nov, 2002.

TONKISS J, GALLER J, et al. Prenatal protein malnutrition and postnatal brain function. **Ann N Y Acad Sci.**, 15, 678, 215-27, Mar, 1993.

TOSCANO, A.E.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition.** 24(3), 270-8, Mar, 2008.

VALADARES, C. T.; DE SOUSA ALMEIDA, S. Early protein malnutrition changes learning and memory in spaced but not in condensed trials in the Morris water-maze. **Nutr Neurosci.**, v. 8, n. 1, p. 39-47, Feb 2005.

VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, 18(2), 158-68, Feb, 2008.

VALLE, N. J.; SANTOS, I. S.; GIGANTE, D. P. [Nutritional interventions and child growth among under-two-year-olds: a systematic review]. **Cad Saude Publica**, v. 20, n. 6, p. 1458-67, Nov-Dec 2004.

VELKOSKA, E.; et al . Mechanisms behind early life nutrition and adult disease outcome. **World J Diabetes.**, 2(8), 127-132, 2011.

VICKERS, M.H. Early Life Nutrition, Epigenetics and Programming of Later Life Disease. **Nutrients.**, volume 2(6), 2165-78, 2014.

VIEAU, D.; SEBAAI, N.; et al. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. **Psychoneuroendocrinology.**, 1:S16-20, 32 Suppl, Aug, 2007.

WADHWA, P.D.; BUSS, C.; ENTRINGER, S.; SWANSON, J.M. Developmental Origins of Health and Disease: Brief History of the Approach and Current Focus on Epigenetic Mechanisms. **Semin Reprod.**, 27(5), 358–368, 2009.

WANG, W.; YU, Y.; XU, T.L. Modulation of acid-sensing ion channels by Cu(2+) in cultured hypothalamic neurons of the rat. **Neuroscience.**, 16,145(2), 631-41, 2007.

WANG, L.; XU, R.J. The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behaviour and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats. **Asia Pac J Clin Nutr.**, 16 Suppl 1:467-72, 2007.

WARTMAN, B.C.; GABEL, J.; HOLAHAN, M.R. Inactivation of the anterior cingulate reveals enhanced reliance on cortical networks for remote spatial memory retrieval after sequential memory processing. 3, 9(10), Oct, 2014.

WREN, A.M.; BLOOM, S.R. Gut hormones and appetite control. **Gastroenterology.**, 132, 2116–30, 2007

YING, S.W.; FUTTER, M.; ROSENBLUM, K.; WEBBER, M.J.; HUNT, S.P.; BLISS, T.V.; BRAMHAM, C.R. Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. **J Neurosci.**, 22,1532–1540, 2002.

ZAFRA, F.; CASTREN, E.; THOENEN, H.; LINDHOLM, D. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 88,10037–10041, 1991.

ZAGAAR, M.; DAO, A.; et al. Regular exercise prevents sleep deprivation associated impairment of long-term memory and synaptic plasticity in the CA1 area of the hippocampus. **Sleep**. 1,36(5), 751-61. May, 2013.

ZAGREBELSKY, M.; KORTE, M. Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses.
Neuropharmacology., 76 Pt C:628-38, Jan, 2014.

ZHAN C, ZHOU J, et al. Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. **J Neurosci**., 20,33(8), 3624-32, Feb, 2013.

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, 02 de agosto de 2013.

Ofício nº 603/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Sandra Lopes de Oliveira**
Departamento de Anatomia – CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.023433/2013-88

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, **“Programação fetal e desnutrição perinatal: efeitos da estimulação do sistema serotoninérgico sob aspectos moleculares da memória e comportamento alimentar de ratos adultos.”**

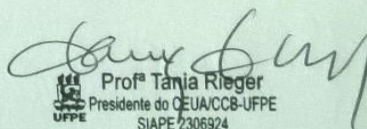
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals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

Origem dos animais: biotério de criação do Departamento de Nutrição; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: 90dias; Peso: 200-350g; Sexo: machos e fêmeas; Nº total de animais: 80.

Atenciosamente,


Prof.ª Tania Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2306924

CCB: Integrar para desenvolver