



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

**Manipulação farmacológica neonatal do sistema serotoninérgico:
um estudo comportamental e do estado oxidativo em ratos**

RECIFE
2012

ALINE ISABEL DA SILVA

**Manipulação farmacológica neonatal do sistema serotoninérgico:
um estudo comportamental e do estado oxidativo em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Nutrição. Área de concentração: bases experimentais da nutrição.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Lopes de Souza

Co-orientador: Prof^º.Dr. Raul Manhães-de-Castro

**RECIFE
2012**

Silva, Aline Isabel da

Manipulação farmacológica neonatal do sistema serotoninérgico: um estudo comportamental e do estado oxidativo em ratos / Aline Isabel da Silva. – Recife: O Autor, 2012.

82 folhas: il., fig. graf.; 30 cm.

Orientador: Sandra Lopes de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2012.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Compostos orgânicos. 2. Serotonina. 3. Fluoxetine. 4. Comportamento alimentar. 5. Lactação. I. Souza, Sandra Lopez de. II. Título.

612.0157 CDD (22.ed.) UFPE
CS2012-56

Recife, 28 de Fevereiro de 2012.

Declaramos aprovada a aluna ***ALINE ISABEL DA SILVA***, com dissertação intitulada:

**Manipulação farmacológica neonatal do sistema serotoninérgico: um estudo
comportamental e do estado oxidativo em ratos.**

Prof. Dra. Carol Virginia Góis Leandro

Prof. Dr. Ademar Afonso de Amorim Júnior

Prof Dr. João Henrique da Costa Silva

Recife, 28 de Fevereiro de 2012

" Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo.
E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um "não".

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho ? Guardo todas, um dia vou construir um castelo..."

DEDICATÓRIA

Dedico todo meu trabalho primeiramente a um ser supremo a qual chamo de Deus. É esta força maior que acredito ter me guiado a percorrer este caminho. Uma vez permitido por Deus, dedico não só este trabalho, mas o que sou ao tripé de minha vida. Minha mãe, **Cecília**, minhas tias gêmeas **Damiana** e **Cosma**, que não apenas tem nome de Santo (Santa Cecília e São Cosme e Daminhão), mas também seus corações.

Mulheres muito simples e humildes, mas fortes, guerreiras e batalhadoras... que se tornaram pai e mãe pra vida que se formava. Não fui, nem sou uma pessoa fácil, mas essas três souberam me amar e me educar de uma

forma muito importante para poder chegar até aqui.

Mãe ...não tenho palavras para agradecer o que fez para que eu viesse ao mundo... Coia e Madrinha, obrigada por terem dedicado de suas vidas para me formar gente.

Amo vocês e me dedico a retribuir o que vocês fizeram e fazem por mim. Agradeço sempre e por toda vida!!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Amar não pela beleza, pois um dia ela acaba.
Amar não por admiração, pois um dia você decepciona-se...
Amo apenas, pois o tempo nunca pode acabar com um amor sem explicação!!!

Madre Teresa de Calcutá

Esse é um momento importante e sem dúvida marcante para mim, o qual vocês fizeram parte.

À minha orientadora, Sandra Lopes...

Não poderia deixar de registrar em nosso trabalho o prazer enorme de estar com você durante esses 7 anos Sandrinha. Fui muito feliz com os tantos bons momentos. Apreendi muito com sua competência. Mas foram os dias difíceis que me fizeram ver que apesar de "o amor e o ódio andarem de mãos dadas" prevalece aquele que eu queira alimentar. Seu coração é enorme, você é uma pessoa maravilhosa e não tenho porque não querer cultivar as boas lembranças. Tenho uma enorme gratidão por tudo que fez por mim mesmo eu sendo tão rude. Obrigada por tudo!

Ao meu Co-Orientado, Prof Raul Manhães...

Felizmente o medo e o pré conceito que tinha, não impossibilitou de conhecer essa pessoa tão especial que é você Raul. Seu cuidado, conselhos, broncas, reflexões... me fazem sentir que o bom da vida é viver... e viver feliz. Sua presença, mesmo que na maior parte indireta, me fez produzir este trabalho com muito amor e dedicação. Obrigada também por tudo!

À amiga e companheira, Cláudia Jacques...

Sou muito feliz de ter conhecido você Clau... A dedicação e atenção com que você lida com as situações e com as pessoas, faz de você uma pessoa especial e muito querida. Mesmo brava, você consegue ser sutil e educada. Você é uma pessoa que gostaria de ter por perto por toda vida. Obrigada por toda ajuda! Obrigada por ter compartilhado de mais um trabalho comigo. Sem você o caminho seria mais árduo. Obrigada também por tudo!

AGRADECIMENTOS

A verdadeira felicidade vem da humildade e do reconhecimento que sozinhos somos muito pouco ou quase nada, e a vida somente se completa com o real sentimento de amor ao próximo!!

Paulo Master

Quero muito agradecer a todos do **grupo de pesquisa NNI** que fizeram parte deste trabalho. Todos que puderam contribuir de alguma forma (com trabalho braçal, intelectual ou mesmo de companherismo) têm papel importante neste trabalho e em minha vida.

Em especial...

Agradeço a **Sarah**, minha estagiária, que com dedicação me ajudou com nossos animais e experimentos. Obrigada mesmo!!!

A **Matildinha**...você é o que é sempre!!!...não conheço pessoa igual a você. Obrigada pelo carinho, atenção, preocupação...por tantas vezes que me escultou, que dormir em sua casa e você me acolheu tão bem. Muito obrigada por ter me proporcionado momentos tão bons e por ter permitido conhecer uma vizinha que me faz ter tantas lembranças e sentimentos bons. Obrigada mesmo!!!!

A minha família de coração...**Anginha, Paulinho, Adélia** e família...vocês representam muito para mim...obrigada por me receber tão bem em suas vidas e por me proporcionar tantos momentos marcantes e felizes. Obrigada mesmo!!!

A **Amanda**... por vim nessa caminhada comigo a tantos anos. Pelos momentos felizes inesquecíveis e também os tristes que me fizeram crescer. Você faz parte de minha história. Obrigada por tudo!!!

A **Lígia**, uma pessoa que se dedica aos seus amigos de forma inexplicável...por muito tempo pude ter o prazer dessa amizade a qual me fez crescer em âmbito pessoal e profissional...sou eternamente grata por tudo e por todo carinho um dia recebido. Muito obrigada mesmo!!!

A **Dr França** pelos ensinamentos, gentileza e sempre disponibilidade quando precisei. Muito obrigada mesmo!!!

A Secretária da Pós Graduação em Nutrição em especial **Cecília** por toda atenção, gentileza e competência em tudo que precisei.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

O objetivo desta dissertação foi avaliar os efeitos da exposição crônica ao inibidor seletivo de recaptação da serotonina (fluoxetina) durante o período neonatal sobre o controle dos comportamentos alimentar e de ansiedade e o balanço oxidativo no hipotálamo e hipocampo de ratos. Os filhotes machos e fêmeas da linhagem *Wistar* foram utilizados e receberam injeção subcutânea diária de fluoxetina (F_{NEO}, 10 mg/kg, p.c, Grupo Tratado,

n=46) e solução veículo da diluição do fármaco (C_{NEO} , 0,9% NaCl, p.c, Grupo Controle, n=46) do 1º ao 21º dia pós-natal. Aos 41 dias de vida metade do grupo C_{NEO} e F_{NEO} foi recebeu dose aguda de fluoxetina formando os grupos C_{NEO+FA} e F_{NEO+FA} respectivamente e o restante permaneceu com dose aguda de salina constituindo os grupos C_{NEO} e F_{NEO} . Como resposta imediata ao tratamento os animais F_{NEO} apresentaram redução dos pesos corporais diários no 7º, 14º e 21º dia. Nenhuma diferença foi encontrada no ritmo circadiano alimentar (24 horas) nem nos testes de ingestão alimentar (1 hora) com dieta padrão. Após receberem dose aguda de fluoxetina os animais do grupo C_{NEO+FA} apresentaram redução no consumo alimentar quando comparados ao seu controle e o grupo F_{NEO+FA} não apresentou nenhuma diferença significativa. No entanto quando estimulados com dieta palatável observamos diferença significativa entre C_{NEO} e F_{NEO} no 37º, 38º e 39º dia. Aos 48 dias de vida os animais tiveram o consumo alimentar basal avaliado em 2, 4 e 12 horas e os grupos foram identificados como Basal- C_{NEO} e Basal- F_{NEO} . No dia seguinte, estes foram submetidos a jejum de 12 horas e o consumo alimentar novamente registrado após 2, 4 e 12 horas de oferta dos alimentos. Os animais foram identificados como Jejum- C_{NEO} e Jejum- F_{NEO} . O grupo Jejum- F_{NEO} quando comparado ao grupo Basal- F_{NEO} apresentou aumento significativo apenas 2h e 4h após oferta de alimento. No entanto, a exposição ao jejum promoveu um aumento mais substancial no grupo F_{NEO} quando comparado ao grupo C_{NEO} nas duas primeiras horas de avaliação. Em filhotes fêmeas, a exposição crônica a fluoxetina em relação à ingestão alimentar não promoveu nenhuma diferença entre os grupos C_{NEO} e F_{NEO} . Já o tratamento crônico com fluoxetina no período neonatal aumentou o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, o que sugere um padrão de comportamento de diminuição da ansiedade no grupo F_{NEO} . Quando foi analisado o biomarcador de estresse oxidativo observamos que o grupo F_{NEO} apresentou uma redução dos níveis de malondialdeído no hipocampo quando comparado ao grupo C_{NEO} e nenhuma diferença significativa foi encontrada no hipotálamo entre os grupos sugerindo um menor estresse oxidativo no hipocampo desses animais. Quando avaliamos a atividade da enzima antioxidante catalase observamos que o grupo F_{NEO} apresentou um aumento na atividade da enzima no hipotálamo e hipocampo quando comparado ao grupo C_{NEO} . Nossos resultados reforçam a importância da integridade do sistema serotoninérgico durante o período do desenvolvimento para a evolução normal das funções comportamentais.

Palavras chaves: Composto orgânico, serotonina, fluoxetina, lactação, comportamento alimentar

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the effects of chronic exposure to selective reuptake inhibitor of serotonin in the neonatal period on the control of eating behaviors and anxiety and oxidative balance in the hypothalamus and hippocampus. The young males and females Wistar rats were used and received daily subcutaneous injection of fluoxetine (F_{NEO}, 10 mg /

kg b.w.; Treated group, n = 46) and vehicle solution of the drug (C_{NEO}, 0.9% NaCl, b.w.; Control group, n = 46) from the 1st to 21st days of life. As an immediate response to treatment, F_{NEO} group showed a reduction in body weight since 7th day of life, 14^o e 21^o day of life. No difference was found in food intake with the standard diet or in consumption during the 24 hours of the circadian rhythm. After receiving acute dose of fluoxetine C_{NEO} + FA group showed a reduction in food intake when compared to control and F_{NEO} + FA group showed no significant difference. However, when stimulated with palatable diet was observed significant difference between the 37th C_{NEO} and F_{NEO}, 38th and 39 days of life. When subjected to fasting for 12 hours the group Fasting-F_{NEO} when compared to Basal-F_{NEO} increased significantly only 2 h and 4h after food intake. In addition, exposure to starvation promoted a significant increase in the group F_{NEO} then C_{NEO} when compared to the first two hours of assessment. In young females, the effect of chronic inhibition of the serotonin transporter regards to food intake did not cause any difference between groups C_{NEO} and F_{NEO}. Although chronic treatment with fluoxetine during the neonatal period increased the number of entries and time spent in the open arms of the elevated plus maze, suggesting a pattern of decreased anxiety in the group F_{NEO}. When we analyzed the biomarker of oxidative stress observed that the group F_{NEO} showed a reduction of malondialdehyde levels in the hippocampus when compared to C_{NEO} and no significant difference was found between groups in the hypothalamus suggesting a lower oxidative stress in the hippocampus these animals. When we evaluated the antioxidant enzyme, catalase, F_{NEO} showed an increase in activity in the hypothalamus and hippocampus compared to group C_{NEO}. Our results reinforce the importance of the integrity of the serotonergic system during the period of development during the normal development

Keywords: Organic compound, serotonin, fluoxetine, lactation, feeding behavior

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA- ARTIGO DE REVISÃO	15
(AÇÃO SEROTONINÉRGICA E O ESTUDO DAS ORIGENS DESENVOLVIMENTISTA DA SAÚDE E DA DOENÇA).	

2.1- Caracterização geral da serotonina	17
2.2- Ação da serotonina sobre o desenvolvimento do sistema nervoso	21
2.3- Ação serotoninérgica sobre os comportamentos alimentar	23
2.4- Serotonina no estudo da origem desenvolvimentista da saúde e da doença	25
3. HIPÓTESE	32
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivo específico	33
5. MATERIAIS E MÉTODOS	
5.1- Animais	34
5.2- Tratamento	35
5.3- Via de Manipulação	36
5.4- Grupos Experimentais	36
5.5- Procedimentos	36
5.5.1 Acompanhamento do peso corporal	36
5.5.2 Avaliação da ingestão alimentar	37
5.5.3 Estudo da Sequência Comportamental de Saciedade	39
5.5.4 Teste de ansiedade no labirinto em cruz elevado	40
5.5.5 Coleta do material biológico	40
5.5.6 Processamento do material biológico para análise bioquímica	41
5.5.7 Dosagem de proteína	41
5.5.8 Medida dos níveis de estresse oxidativo pela metodologia da Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	41
5.5.9 Atividade enzimática: Catalase	41

5.6- Análise estatística	42
6. RESULTADOS	43
6.1- Artigo original 1 (INIBIÇÃO DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA DURANTE A LACTAÇÃO EM RATOS: AJUSTES NA EXPRESSÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR NA VIDA ADULTA).	43
6.2- Artigo original 2 (EXPOSIÇÃO NEONATAL CRÔNICA À INIBIDOR SELETIVO DA RECEPTAÇÃO DE SEROTONINA E O ESTADO OXIDATIVO DO HIPOTÁLAMO E HIPOCAMPO DE RATAS NA VIDA ADULTA).	64
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
PERSPECTIVAS	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	82

1. APRESENTAÇÃO

Vários estudos procuram explicar as causas do aumento na prevalência das doenças relacionadas aos distúrbios metabólicos, como obesidade, diabetes mellitus tipo II e hipertensão arterial. Em uma das vertentes, acredita-se que o organismo em desenvolvimento é capaz de interagir com o ambiente gerando uma resposta adaptativa a curto e/ou longo prazo. A resposta em curto prazo é capaz de promover consequências negativas, mas garante

a sobrevivência do indivíduo até a idade reprodutiva. Enquanto que na resposta em longo prazo, a diferença entre o que foi previsto no início da vida e o ambiente ao longo do seu desenvolvimento pode influenciar no aparecimento das doenças metabólicas. Essa relação entre eventos ambientais na vida precoce e conseqüências na vida adulta fundamenta algumas hipóteses, entre elas a consolidada origem desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD, do inglês: Developmental Origins of Health and Disease). O evento agressor mais investigado é a desnutrição perinatal, no entanto alterações na concentração de serotonina durante o desenvolvimento parece estar envolvida na modulação de vários comportamentos na vida adulta.

O desenvolvimento do sistema nervoso durante os períodos pré- e pós-natal parece ser particularmente vulnerável a teratogenicidade neurobiológica devido à exposição de drogas exógenas. A utilização dos inibidores de recaptação de serotonina, por exemplo, pode acarretar em comportamentos adaptativos que, por sua vez, podem trazer prejuízo a saúde do indivíduo. A serotonina surge muito precocemente durante o desenvolvimento e exerce papel crucial para divisão celular e diferenciação de tecidos-alvos das projeções serotoninérgicas. Hoje sabe-se que esta bioamina também tem papel regulador em vários estados comportamentais, dentre eles o alimentar e de ansiedade. O sistema nervoso se torna particularmente sensível ao estresse oxidativo, devido aos baixos níveis de antioxidantes, altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e da grande necessidade de oxigênio nas reações neuro-químicas. Numerosos estudos vem demonstrando um envolvimento direto entre o estresse oxidativo e os comportamentos alimentares e de ansiedade.

Diante do exposto, propomos neste trabalho que o bloqueio da proteína de recaptação da serotonina promove alterações neuroquímicas no sistema serotoninérgico, tais como alterações nas concentrações de serotonina e na expressão de RNAm de sua proteína de recaptação, que induzem alterações comportamentais e no balanço oxidativo mesmo após descontinuidade do tratamento. Levantamos a hipótese que a inibição da recaptação da serotonina durante a lactação programa os padrões de desenvolvimento do sistema serotoninérgico alterando sua ação sobre os comportamentos alimentar e de ansiedade, bem como induzindo aumento dos níveis de estresse oxidativo no hipotálamo e hipocampo. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição crônica a fluoxetina durante a lactação sobre o controle dos comportamentos alimentar e de ansiedade e o estado oxidativo no hipotálamo e hipocampo de ratos.

Esta dissertação gerou três artigos científicos que serão submetidos a publicação. O primeiro intitulado “SEROTONINA E SEU POSSÍVEL PAPEL NOS ESTUDOS NA

ORIGEM DESENVOLVIMENTISTA DA SAÚDE E DA DOENÇA”, será submetido à revista *Behavioural Processes*. Esta revista é classificada como qualis B1 no comitê de Medicina II da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Este artigo de revisão tem como objetivo mostrar que a serotonina desempenha um papel chave às pesquisas das origens desenvolvimentistas da saúde e da doença, em particular aquelas relacionadas aos comportamentos alimentar e de ansiedade.

O segundo artigo intitulado “INIBIÇÃO DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA DURANTE A LACTAÇÃO EM RATOS: AJUSTES NA EXPRESSÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR NA VIDA ADULTA” será submetido à revista *Behavioural Pharmacology*. Esta revista é classificada como qualis A2 no comitê de Medicina II da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Este primeiro artigo original teve como objetivo investigar os efeitos da exposição crônica ao inibidor seletivo de recaptação da serotonina durante a lactação sobre o controle do comportamento alimentar em ratos.

O terceiro artigo intitulado “EXPOSIÇÃO NEONATAL CRÔNICA À INIBIDOR SELETIVO DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA E O ESTADO OXIDATIVO DO HIPOTÁLAMO E HIPOCAMPO DE RATAS NA VIDA ADULTA” será submetido à revista *Neurochemical Research*. Esta revista é classificada como qualis B1 no comitê de Medicina II da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Este segundo artigo original teve como principal objetivo avaliar os efeitos da exposição crônica com fluoxetina durante a lactação sobre os comportamentos alimentar e de ansiedade, além do estado oxidativo do hipotálamo e hipocampo de ratas, e com isto estabelecer uma associação entre as alterações comportamentais e os estados oxidativos das regiões encefálicas envolvidas no controle comportamental.

2. REVISÃO DA LITERATURA

ARTIGO DE REVISÃO

AÇÃO SEROTONINÉRGICA E O ESTUDO DA ORIGEM DESENVOLVIMENTISTA DA SAÚDE E DA DOENÇA

Resumo

A serotonina é um neurotransmissor com papel determinante na padronização final das funções cerebrais e consequentemente dos comportamentos onde ela está envolvida. A distribuição e morfologia dos neurônios serotoninérgicos permitem que esta bioamina se distribua em várias regiões e atue sobre muitas funções, tais como humor, memória, sono, comportamento sexual, cognitivo, agressivo e também sobre o desenvolvimento do sistema nervoso e os comportamentos alimentar e de ansiedade. Estudando o papel da serotonina sobre o desenvolvimento podemos entender como as células neurais adquirem identidades específicas e como os padrões das conexões neuronais são formados e mantidos a fim de estabelecer comportamentos. A serotonina modula o desenvolvimento do sistema nervoso por atuar no final da divisão celular e na diferenciação de células alvo das projeções serotoninérgicas em células neurais e não neurais. É proposto que o sistema serotoninérgico e suas propriedades plásticas sejam cruciais para a capacidade do cérebro se integrar com os órgãos periféricos do corpo bem como o ambiente externo. A influência de determinados fatores ambientais no início da vida, tais como estado nutricional e estresse, com alterações na expressão da carga genética do indivíduo, são relacionados em vários estudos para determinar um padrão de saúde-doença característico. Existem áreas de pesquisa dedicada a esclarecer as devidas relações entre eventos ocorridos em fases precoces do desenvolvimento e determinados padrões de doença e saúde ao longo da vida. Através desta revisão podemos mostrar indícios de que a serotonina esteja em um caminho relacionado às pesquisas das origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). Este assunto ganha especial interesse neste trabalho por abranger doenças como a obesidade e depressão, a qual se torna alvo de alerta a saúde pública em todo o mundo devido ao seu incidente aumento.

Palavras chaves: Serotonina, desenvolvimento, sistema nervoso, ansiedade, comportamento alimentar, DOHaD

Abstract

Serotonin is a neurotransmitter that plays role in the final stabilization of brain function and is involved in all behavior patterns. The distribution and morphology of serotonergic neurons allow this bioamine be present in various regions and acts on many functions such as mood, memory, sleep, sexual behavior, cognitive, aggressive, and also on the developing nervous system, feeding and anxiety behavior. Studying the role of serotonin

on the development we can understand how neural cells acquire specific identities and how the patterns of neuronal connections are formed and maintained in order to establish behaviors. Serotonin modulates the development of the nervous system by acting at the end of cell division and differentiation in neural and non-neural cells. It is proposed that the serotonergic system and its plastic properties are crucial for the brain's ability to integrate with the peripheral organs of the body and the external environment. Numerous studies suggest that influences of certain environmental factors early in life, such as nutritional status and stress, may induce changes in the genetic code of the person that are related to the standard of health and illness. There are areas of research devoted to clarify the proper relationships between events occurring at earlier stages of development and certain patterns of disease and health throughout life. In this review we try demonstrate evidences that serotonin is related to the theory of the developmental origins of health and disease, particularly related to eating behavior and anxiety. This studies has an important role since is associated to diseases such as obesity, metabolic syndrome and anxiety which becomes a public health issue worldwide.

Key Word : Serotonin, development, nervous system, anxiety, food behavior, DOHaD

2.1 Caracterização geral da serotonina

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é classificada bioquimicamente como uma bioamina. Existem numerosas substâncias congêneres a 5-HT de origem natural ou sintética que podem exibir graus variáveis de atividade farmacológica central e periférica. Esta biomolécula é conhecida desde o ano de 1930 quando Ersparmer começou a estudar a distribuição de um tipo celular chamada células enterocromafins, que se coravam com um reagente para indóis. As maiores concentrações foram observadas na mucosa gastrointestinal

e em seguida nas plaquetas e no Sistema Nervoso Central (SNC) (Erspamer 1986). A esta substância, eles chamaram de *enteraminas*. Payer e colaboradores foram os primeiros a isolar e caracterizar quimicamente essa substância que atuava de forma vasoconstrictora e era liberada pelas plaquetas no sangue no processo de coagulação. Eles a denominaram então de serotonina ou simplesmente 5-HT (Rapport, Green et al. 1948). Contudo em 1976, Payer demonstrou ser a mesma substância encontrada por Erspamer em 1930.

Nos seres humanos, assim como na maioria das outras espécies de mamíferos, a serotonina é produzida por duas enzimas distintas, triptofano hidroxilase (TPH) 1 e 2 na primeira reação de sua síntese (Cote, Fligny et al. 2007). TPH1, está localizado na glândula pineal e células enterocromafins do intestino, sendo responsável por sintetizar a maior parte da serotonina encontrada no organismo. TPH2, que é restrita aos neurônios dos núcleos da rafe e do sistema nervoso entérico, é responsável pela síntese do (Hoyer, Hannon et al. 2002) restante da serotonina (Erspamer 1954). A síntese da 5-HT se dá a partir do aminoácido essencial triptofano (Figura 1). Na primeira etapa, o aminoácido essencial é hidroxilado pela enzima TPH tendo como produto o 5-hidroxitriptofano (5-HTT) (Clark, Weissbach et al. 1954). Na sequência, o 5-hidroxitriptofano é descarboxilado pela triptofano descarboxilase, formando a 5-HT (Clark, Weissbach et al. 1954).

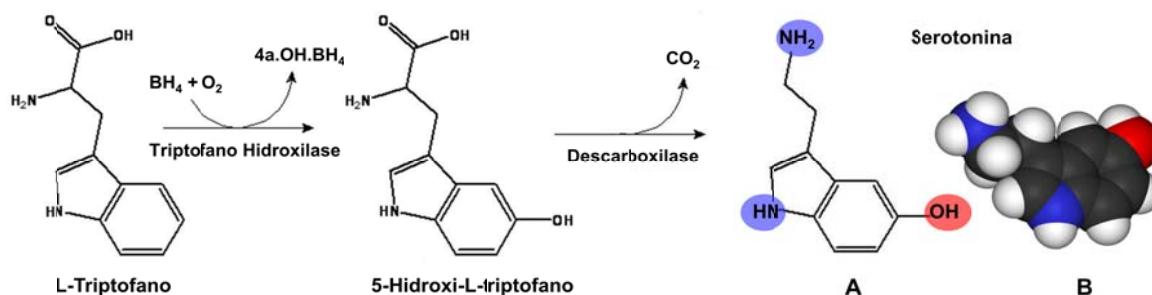


Figura 1: Biossíntese da 5-HT. (A) Estrutura química da 5-HT e (B) estrutura molecular.

Cerca de 95% da 5-HT produzida estão distribuídas ao longo do trato gastrointestinal (TGI) (Bradley 1984). Desse percentual (95%), aproximadamente 90% encontram-se nas células enterocromafins e 10% nos neurônios entéricos. Aproximadamente 3% da 5-HT é produzida pelas plaquetas e apenas 2% é produzida no SNC, e como esta não atravessa a barreira hematoencefálica sua presença no SNC depende de sua síntese local (Bradley 1984). No SNC a 5-HT é produzida em conjuntos de corpos de neurônios que constituem os núcleos da rafe localizados no tronco encefálico (Halliday, Baker et al. 1995).

Os diversos efeitos da 5-HT são mediados via receptores serotoninérgicos. A classificação dos receptores serotoninérgicos ocorre de acordo com suas propriedades farmacológicas (utilizando agonistas e antagonistas) e por sua característica molecular (clonagem do DNA) (Hoyer, Clarke et al. 1994). São designados por 5-HT₁ a 5-HT₇ divididos assim de forma heterogênea em 13 subtipos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F}; 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}; 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}; 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}) (Hoyer, Clarke et al. 1994; Hoyer, Hannon et al. 2002). Os tipos e subtipos de receptores da 5-HT estão acoplados a diferentes mecanismos de sinalização transmembrana como descrito na figura 2. O receptor 5-HT₃ é o único receptor serotoninérgico capaz de atuar como canal iônico operado por ligantes, as demais famílias são receptores acoplados a proteína G (com tipologia da membrana constituída de um segmento N-terminal extracelular ligado a um C-terminal intracelular). Diversos fatores determinam a intensidade e duração da sinalização dos receptores serotoninérgicos. A quantidade de 5-HT liberada na fenda sináptica é o principal deles. A ligação da 5-HT aos autoceptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} pré-sinápticos, reduzindo a taxa de disparo de neurônios serotoninérgicos e a atividade do transportador protéico serotoninérgico pré-sináptico, são mecanismos envolvidos diretamente no controle de sua disponibilidade (Cerrito and Raiteri 1979).

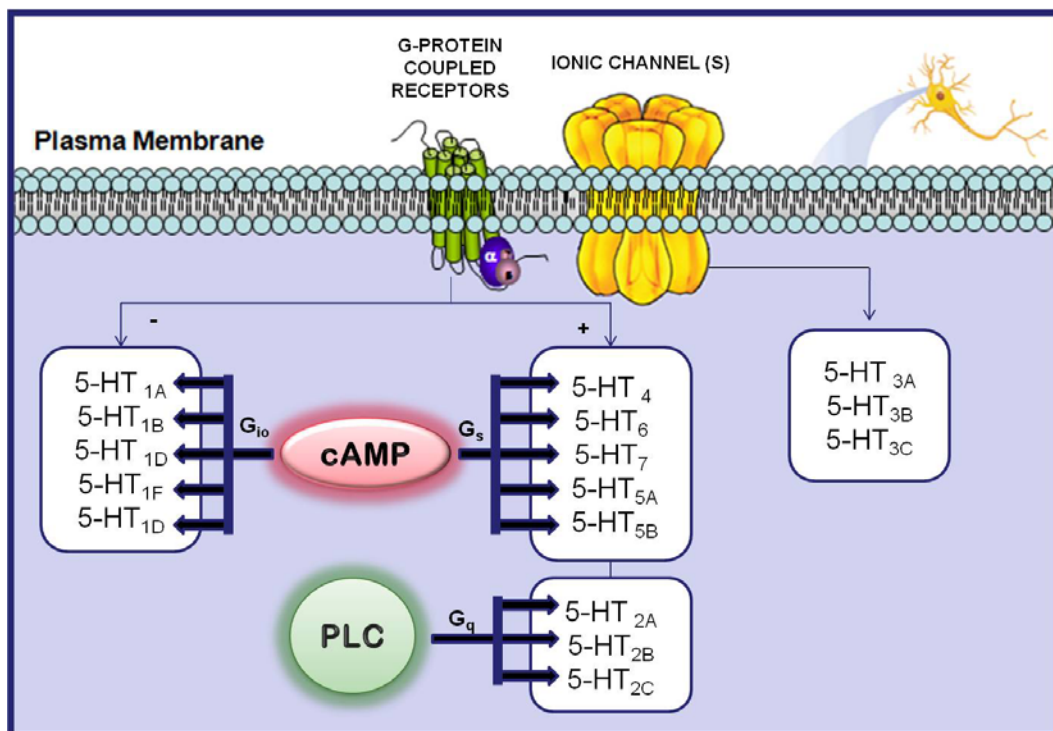


Figura 2: Esquema da sinalização transmembrana dos tipos e subtipos de receptores serotoninérgicos. Abreviaturas: 3'-5' adenosina monofosfato cíclico (cAMP); fosfolipase C (PLC), negativo (-); positivo (+).

Muitas são as funções mediadas pela 5-HT através de sua atuação nesses receptores. O funcionamento da 5-HT como neurotransmissor no cérebro de mamíferos foi descoberto em meados da década de 50 (Brodie and Shore 1957). As características que definem a 5-HT como neurotransmissor se encontram resumidas na Figura 3. Só mais tarde esta bioamina foi evidenciada como um modulador trófico sobre o desenvolvimento, exercendo importante papel na embriogênese (Buznikov 1989; Buznikov, Lambert et al. 2001). Apesar do pequeno percentual, a 5-HT do SNC está associada a uma ampla variedade de comportamentos, incluindo alimentação e regulação do peso corporal (Halford and Blundell 1996), agressividade, suicídio (Arango, Huang et al. 2003), transtorno obsessivo compulsivo, alcoolismo, ansiedade e transtornos afetivos (Lesch, Bengel et al. 1996). Além disso, 5-HT tem sido associada ao funcionamento do sistema motor (Harris-Warrick and Cohen 1985), ciclos de sono e vigília (Strecker, Thakkar et al. 1999), os ritmos circadianos (Kim, Kim et al. 2005), a estabilidade respiratória (Carley and Radulovacki 1999; Cote, Fligny et al. 2007), o desenvolvimento embrionário (Cote, Fligny et al. 2007), e ao processo de recompensa (Kranz, Kasper et al.). A ação da 5-HT na manutenção da homeostase é regulada por mecanismos de feedback. Quando a concentração extracelular de 5-HT se eleva, a ativação de autoceptores (5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}) inibem tanto a síntese quanto a liberação da 5-HT das vesículas na fenda sináptica e quando diminui a 5HT extracelular facilitam a síntese e a liberação (Starke, Gothert et al. 1989; Adell, Celada et al. 2002).

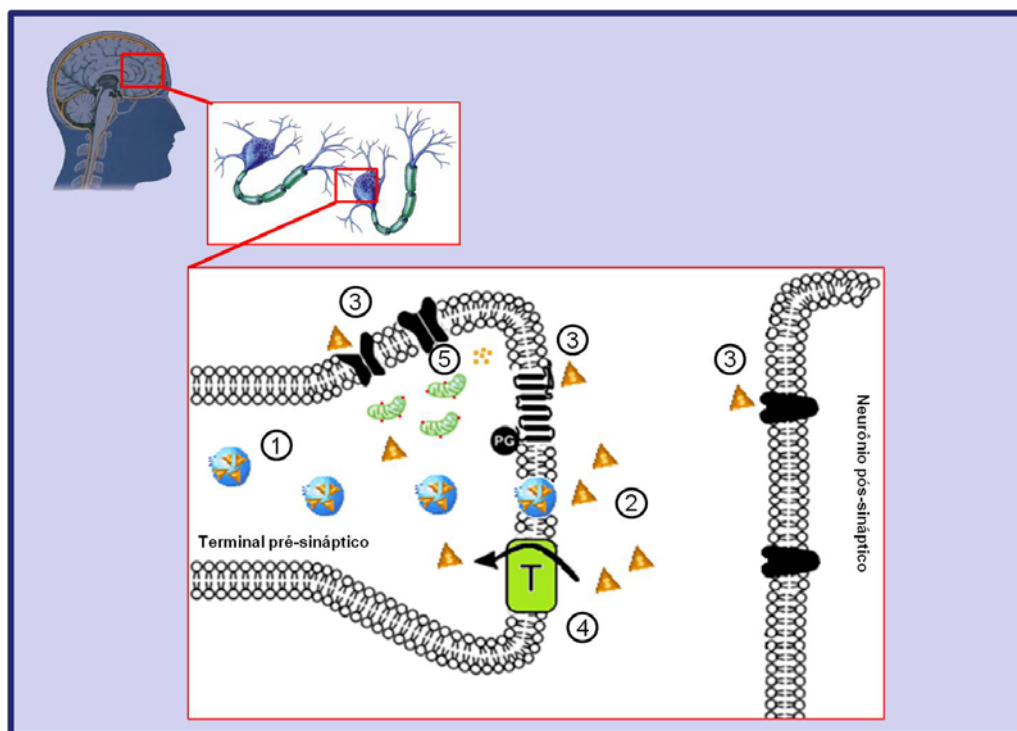


Figura 3: Figura esquemática da neurotransmissão serotoninérgica. 1. Armazenamento da 5-HT em vesículas nos terminais pré-sinápticos; 2. Junção das vesículas a membrana plasmática e liberação da 5-HT na fenda sináptica; 3. Ação da 5-HT sobre receptores em neurônio pós e/ou pré-sinápticos; 4. Remoção da 5-HT na fenda sináptica por mecanismos de recaptura por proteínas transportadoras; 5. Metabolização da 5-HT recapturada por ação da MAO.

A degradação da 5-HT se dá por meio da ação da monoamina oxidase (MAO) uma flavoenzima localizada na membrana das mitocôndrias (Sandler, Reveley et al. 1981). Existem dois tipos de MAO, a MAO-A e B. A primeira é responsável pela metabolização da 5-HT encefálica. A MAO-B age primordialmente sobre a 5-HT periférica (plaquetas, células enterocromafins). A 5-hidroxitriptamina (5-HT) sofre ação da MAO formando o aldeído 5-hidroxiindolacetaldeído que por sua vez pode ser convertido em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) pela enzima *aldeído desidrogenase* ou por uma via alternativa que consiste na redução pela ação da enzima *aldeído redutase* do acetaldeído à álcool, o 5-hidroxitriptofol. No entanto esta via é normalmente insignificante. O 5-HIAA do cérebro e dos locais periféricos de armazenamento e metabolismo da 5-HT é excretado na urina juntamente com pequenas quantidades de sulfato de 5-hidroxitriptofol ou conjugados de glicuronídeos. (Sandler, Reveley et al. 1981). Além dos processos metabólicos a ação da 5-HT pode ser

finalizada por sua recaptura na fenda sináptica através de proteínas transportadoras (SERTS) localizadas na membrana de neurônios pré-sinápticos.

2.2 Ação da serotonina sobre o desenvolvimento do sistema nervoso

A arquitetura do SNC, apesar de complexa, segue um conjunto relativamente simples de princípios funcionais, organizacionais e desenvolvimentistas. Os estudos desenvolvidos por Hans Spemann permitiram levar ao conhecimento do estabelecimento do padrão maduro das conexões neuronais (Sander and Faessler 2001). Hoje é possível saber que essa forma madura do SNC passa por um processo gradativo que pode ser considerado ocorrendo em seis estágios principais. Primeiramente, a indução de células precursoras a partir de células do ectoderma por sinais do mesoderma. Posteriormente pela diferenciação de células precursoras do tubo neural, dando origem a células da glia e a neurônios imaturos. A diferenciação das células neurais depende de proteínas reguladoras que são moduladas por fatores intrínsecos da célula ou por sinais das células circunvizinhas. Outro passo seria a migração, onde neurônios imaturos migram a partir das zonas germinativas para as suas posições finais. Essa migração tem o papel no estabelecimento da identidade de alguns neurônios e pode definir as propriedades funcionais e as futuras conexões do neurônio. Os neurônios após sua migração ou mesmo antes começam a estender um axônio na extremidade na qual existe um aparelho sensorio motor chamado de cone de crescimento (Ramon 1952). Os axônios formam conexões sinápticas com células-alvo selecionadas. A capacidade de um axônio atingir seu alvo apropriado é essencial a sobrevivência do neurônio. Esses axônios são projetados para a vizinhança de seus alvos finais através de um processo definido como *quimioafinidade*. A idéia básica desta hipótese é que neurônios individuais adquirem precocemente marcadores moleculares distintos e moléculas de reconhecimento durante o desenvolvimento. O estabelecimento de conexões apropriadas entre dois neurônios dependeria, assim, do emparelhamento correto de moléculas na superfície dos neurônios pré- e pós-sinápticos. Há evidências de que as células-alvo fornecem fatores neurotróficos que nutrem o neurônio pré-sináptico durante a formação de conexões sinápticas funcionais (Lagercrantz 2006). E por final, modificações nos contatos sinápticos iniciais estabelecem o padrão maduro das conexões neurais os quais foram iniciados precocemente durante o desenvolvimento. A atividade neuronal subsequente desempenha um papel crucial ao determinar se uma sinapse será estável ou se deixará de funcionar (Ramon 1952).

O papel dos neurônios serotoninérgicos como um organizador inicial do cérebro, sugerindo ser um determinante em sua padronização final, foi possível a partir de estudos em

drosófilas, por exemplo, onde a inervação serotoninérgica pôde ser vista como uma consequência da segmentação do tronco encefálico, sob o controle dos primeiros genes Hox (*Antennapedia class homeobox*) expressados (Hunter and Kenyon 1995). A 5-HT influencia o final da divisão celular, bem como a diferenciação de tecidos-alvo das projeções serotoninérgicas. A mediação da 5-HT sobre esses eventos celulares ocorre tanto em tecidos neurais (tanto em vertebrados como em invertebrados) quanto em outros tecidos, a exemplo da musculatura lisa da artéria aorta e do trato gastrintestinal (Whitaker-Azmitia, Murphy et al. 1990). A ação da 5-HT como um fator trófico ocorre pela regulação da maturação das células alvo diretamente e por meio da liberação pelas células gliais da proteína solúvel ligante ao cálcio, S100B, o que confere a esta proteína ser um modulador glial da plasticidade sináptica neuronal (Whitaker-Azmitia, Murphy et al. 1990). S100B, dentro dos neurônios, tem funções de estabilizar os microtúbulos e permitir o padrão elaborado ramificado visto dentro dos neurônios no cérebro maduros (Nishiyama, Knopfel et al. 2002). Ainda indicando a 5-HT como crucial ao desenvolvimento cerebral, estudos mostraram que o retardo no aparecimento de fibras serotoninérgicas utilizando uma droga que reduz a produção de 5-HT (p-clorofenilalanina), produziu atrasos significativos na maturação neuronal, o qual foi evidenciado pelo atraso na mitose final (Lauder and Krebs 1978), no alongamento dendrítico (Yan, Wilson et al. 1997) e na formação da barreira hemato encefálica (Blue, Erzurumlu et al. 1991). Estudos ainda mostraram que no cérebro adulto a remoção da 5-HT, utilizando p-cloroanfetamina, resulta em perda de sinapses (Cheng, Costall et al. 1994; Wilson, Faber et al. 1998). Todos estes eventos são indicativos de um retorno a estágios cerebrais imaturos e indiferenciados, ou seja, em atraso no desenvolvimento.

As múltiplas funções da 5-HT durante toda a vida do cérebro (desenvolvimento e envelhecimento) são bastante intrigantes. Os neurônios serotoninérgicos, presentes no cérebro desde o início da evolução neural, têm estabelecido diversos e complexos fenótipos celulares e interações neurais dentro da arquitetura dinâmica do cérebro. É proposto que o sistema serotoninérgico e suas propriedades plásticas sejam cruciais para a capacidade do cérebro se integrar com os órgãos periféricos do corpo bem como, com o ambiente externo. Uma deficiência na atividade serotoninérgica no cérebro tem mostrado aumentar a vulnerabilidade à depressão (Asberg, Eriksson et al. 1986). Isso pode ser demonstrado a partir de estudos que promovem uma disponibilidade diminuída do precursor da 5-HT, o L-triptofano, impedindo sua síntese, ou ainda sua liberação ou metabolismo, e/ou anormalidades dos receptores serotoninérgicos (Maes, Meltzer et al. 1995).

Acredita-se que as informações genéticas de um animal não sejam suficientes para especificar as interconexões neuronais que são estabelecidas, ocorrendo assim eventos epigenéticos, tanto embrionários quanto ambientais, que ativam genes específicos de maneira combinatória em diferentes momentos durante o desenvolvimento (Azmitia 2007). O ambiente externo fornece fatores nutritivos, experiências sociais, sensoriais, e aprendizagem e estes afetam o SN alterando a atividade neural. Assim a cronologia ótima dos fatores inatos e ambientais é crítica para a diferenciação adequada de cada célula nervosa e para o desenvolvimento de todo o SN e de sua capacidade de produzir comportamentos. Uma vez alterado o funcionamento dos neurônios serotoninérgicos durante estes períodos irá refletir sobre a capacidade do cérebro e do organismo para se adaptar e ter sucesso na natureza.

2.3 Ação serotoninérgica sobre os comportamentos alimentar

A ampla distribuição das projeções de neurônios serotoninérgicos no sistema nervoso central está relacionada a sua participação no controle da expressão de vários comportamentos, entre eles destacamos o alimentar.

O comportamento alimentar é uma resposta adaptativa decorrente da demanda do ambiente interno por nutrientes, sendo modulado por oportunidades e limitações impostas pelo meio externo. A manutenção do balanço energético requer diversos ajustes fisiológicos e comportamentais visando a obtenção de energia, sua metabolização e seu armazenamento. Diversos sinais do estado nutricional e do nível de energia do organismo são integrados no SNC para produção de respostas adequadas para manutenção da homeostase energética (Guyenet and Schwartz 2012). Entre esses sinais encontramos peptídeos liberados pelo trato gastrointestinal, hormônios, neuromoduladores e neurotransmissores. Para expressão do comportamento de busca ou recusa do alimento são expressos mecanismos de regulação homeostáticos juntamente ao motivacional (Blundell, Goodson et al. 2001). Os componentes deste sistema não-homeostático são os mecanismos encefálicos e intestinais, e são estimulados pela abundância de sinais alimentares e a fácil disponibilidade de alimentos palatáveis, com alta densidade energética (Berthoud 2006). A palatabilidade e o prazer são indubitavelmente poderosos determinantes da ingestão alimentar (Berthoud 2006). Estes dois fatores têm sido apontados como determinantes da obesidade na população de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Este componente hedônico ou motivacional da regulação do comportamento alimentar é modulado por neurônios cujos corpos celulares estão localizados, entre outras estruturas encefálicas, no Núcleo Accumbens e Área Tegmentar

Ventral. Estas estruturas, associadas à amígdala e ao hipocampo formam o Sistema de Recompensa ou Centro do Prazer (Magni, Dozio et al. 2009).

O centro regulador homeostático do comportamento alimentar está localizado no SNC, em uma região do diencefalo chamada hipotálamo (Simansky 1996). No controle homeostático, a 5-HT modula a integração de informações dos vários núcleos hipotalâmicos de forma direta promovendo a saciação (Simansky 1996). O núcleo arqueado do hipotálamo é o principal receptor das várias informações do estado energético vindos da periferia e do SNC (Wynne, Stanley et al. 2005). Neste núcleo, existem duas populações de neurônios que expressam peptídeos antagônicos no controle do balanço energético. São os neurônios que co-expressam os peptídeos anorexigênicos, pró-ópio-melanocortina (POMC) e o transcrito relacionado à cocaína e anfetamina (CART); e os que co-expressam os peptídeos orexigênicos, neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP) (Wynne, Stanley et al. 2005). Esses dois grupos neuronais recebem inervação serotoninérgica dos núcleos Dorsal e Mediano da Rafe. A ativação desse conjunto celular promove hiperpolarização de neurônios NPY/AgRP e despolarização de neurônios POMC/CART através de receptores específicos 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} resultando em saciedade (Heisler, Cowley et al. 2002). Os principais fatores modulados pela 5-HT no controle da saciedade são o tamanho e a duração da refeição (Leibowitz and Alexander 1998). Com redução na concentração de 5-HT os efeitos seriam opostos, promovendo aumento do consumo alimentar. Deste modo, a contribuição da 5-HT hipotalâmica à mudança no consumo de alimentos está associada aos mecanismos neuroquímicos envolvidos na regulação do mesmo.

O sistema da melanocortina, constituído por cinco tipos de receptores (MCR1 – MCR5) é ponto chave para ação da 5-HT no controle homeostático do balanço energético (Heisler, Jobst et al. 2006). Quando uma molécula estimula neurônios POMC, este é processado em hormônio α -melanócito-estimulante (α -MSH) que atua sobre MCR (particularmente MCR4) em várias regiões encefálicas para reduzir a ingestão alimentar (Garfield and Heisler 2009). Elevado consumo alimentar e obesidade persistente foram observadas em camundongos deficientes em MC4R (Huszar, Lynch et al. 1997). Os neurônios do núcleo arqueado que expressam POMC e AgRP enviam projeções para os outros núcleos hipotalâmicos (PVN, DMH, VMH e área hipotalâmica lateral) os quais se comunicam entre si e processam as informações recebidas a respeito da homeostase energética (Wynne, Stanley et al. 2005). Estas duas populações de neurônios no ARC também são sensíveis a inúmeros neuromoduladores (leptina, insulina, colescistocinina, ghrelina, entre outros) liberados no plasma em resposta à disponibilidade de energia liberada por células do trato gastrointestinal

(Berthoud and Morrison 2008). Por exemplo, a expressão e a liberação de NPY pelos núcleos hipotalâmicos podem ser inibidas pela insulina e leptina circulantes. Em estados de jejum, as concentrações de leptina e insulina são reduzidas, aumentando assim a liberação do NPY (Schwartz, Woods et al. 2000).

2.4 Serotonina no estudo da origem desenvolvimentista da saúde e da doença

Estudos epidemiológicos em diferentes partes do mundo relacionam a influência de determinados fatores ambientais do início da vida a alterações na expressão da carga genética do indivíduo, determinando um padrão de saúde-doença característico. Estes estudos iniciaram na década de 70, quando Ravelli et al. estudaram uma população de 300.000 homens, filhos de mulheres expostas a um período de escassez alimentar (“Dutch Hunger Winter”) durante o cerco da Holanda pela Alemanha na Segunda Guerra Mundial. Esses indivíduos apresentaram, na vida adulta, padrões diferenciados de composição corporal dependendo da idade em que tinham sido expostos à desnutrição materna durante a vida intra-uterina (Ravelli, Stein et al. 1976).

O conceito de origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD) cresceu a partir da idéia original desenvolvida por Barker (Barker 1998) denominada origem fetal da doença do adulto (FOAD, do inglês Fetal Origins of Adult Disease) (Barker 2007). O DOHaD surge como uma área de pesquisa dedicada a esclarecer as relações entre eventos ocorridos em fases precoces do desenvolvimento e determinados padrões de doença e saúde ao longo da vida. A construção de novos conhecimentos sucedidos dessa área foi oferecida para definir mudanças tanto de ordem financeira organizacional como também em termos de políticas públicas na área da saúde e do bem-estar social (Barker 2007; Sinclair, Lea et al. 2007). Contudo, resultados de vários estudos evidenciaram que o risco para o desenvolvimento de doenças crônicas na fase adulta da vida sucedia não apenas de eventos precoces da vida fetal, porém também de todo o período de desenvolvimento e ao longo da infância e adolescência. Esta terminologia DOHaD enfatiza também que esta área da ciência tem implicações não apenas para a doença e sua prevenção, mas também para a promoção da saúde, a qual é de grande importância na saúde pública e nos programas de educação em muitas partes do mundo. O que justifica a inclusão do termo "saúde" nesta teoria. Contudo, o DOHaD deu origem a uma série de estudos voltados a investigar a relação entre variações ambientais na vida precoce, desfechos metabólicos e polimorfismos em genes relacionados.

A epigenética também se tornou um modelo fundamental para pesquisa em DOHaD. A epigenética é um campo da biologia que estuda as interações causais entre genes e seus

produtos os quais são responsáveis pela produção do fenótipo (Weaver, Cervoni et al. 2004). Seu conceito traz subentendido um processo de causalidade importante em nível celular, regulando o crescimento e a diferenciação tecidual, e envolve alterações químicas do DNA (como a metilação) ou de proteínas associadas (como as histonas, que se associam à molécula de DNA nos nucleossomos para formar a cromatina). O padrão de informação epigenética é transmitido através de mitose, sendo específico para determinado tecido e tipo celular e essencial para a manutenção do perfil de expressão gênica do organismo (Gluckman, Hanson et al. 2009). Como o ambiente durante o desenvolvimento pode interferir nos efeitos epigenéticos, estes são extremamente relevantes no campo de estudos de DOHaD.

Alguns estudos mostram que a 5-HT pode intervir nesse ambiente, o que nos ajudam a pensar que esta pode ser um fator influente na padronização fenotípica e assim um alvo de estudo no campo de pesquisa do DOHaD. Um modelo, por exemplo, no que concerne ao eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), avalia diferenças naturais do cuidado materno em ratos, mostrando que o meio no qual os filhotes crescem se correlaciona com sua resposta ao estresse, sendo que filhotes de mães altamente cuidadosas serão menos responsivos em relação a filhotes de mães pouco cuidadosas (Liu, Diorio et al. 1997). Neste estudo, foi sugerido que a estimulação tátil de mães altamente cuidadosas atue através de vias serotoninérgicas ascendentes do núcleo da rafe (Smythe, Rowe et al. 1994), que induzem a expressão de receptores de glicocorticóides (RG) no hipocampo (Mitchell, Rowe et al. 1990). Os glicocorticóides são capazes de regular a ação da 5-HT sobre os receptor 5HT₇ (Yau, Noble et al. 1997), o qual está positivamente ligado ao AMP cíclico (Meaney, Diorio et al. 2000). Ocorre, então, a estimulação de fatores de transcrição associados ao AMPc, como o fator de crescimento do nervo induzido pelo fator A (NGFI-A) (Encio and Detera-Wadleigh 1991). Embora a afinidade do NGFI-A ao seu sítio de reconhecimento na sequência de DNA responsável pela produção de RG seja baixa, a estimulação tátil promove uma grande elevação nos níveis deste fator de transcrição, aumentando, portanto, a chance de ligação (Encio and Detera-Wadleigh 1991). A ligação do NGFI-A resulta em recrutamento de histonas-acetiltransferases, que aumentam a acetilação das histonas, facilitando o acesso de desmetilases e a desmetilação do sítio promotor do RG (Carvin, Parr et al. 2003). O sítio promotor desmetilado exibirá alta afinidade ao NGFI-A, resultando em uma maior atividade do promotor de RG induzido por NGFI-A no hipocampo, uma maior produção de RG nessa estrutura e, portanto, um mecanismo de retroalimentação negativa mais eficiente, ou seja, uma menor responsividade ao estresse.

Outros estudos têm relacionado variações nos níveis da 5-HT em períodos determinantes ao desenvolvimento às alterações morfológicas. Por exemplo, Cote e colaboradores (2007) (Cote, Fligny et al. 2007) observaram que ratas gestantes que tiveram inibida a ação da triptofano hidroxilase I, os seus embriões apresentavam reduzido número de células 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) marcada ao redor da zona ventricular. A aplicação de BrdU, 2 horas antes da retirada do embrião, forneceu uma estimativa da atividade mitótica celular. Os sítios de incorporação de BrdU foram detectados por imunohistoquímica. A redução de células marcadas indica uma menor taxa na mitose neuroepitelial e fornece evidências de que anormalidades na sinalização da serotonina durante o desenvolvimento pode perturbar o desenvolvimento craniofacial. O uso de inibidores de recaptação de serotonina também apóia esta visão. Um estudo de Silva *et al* (2010) utilizando o inibidor seletivo de recaptação de 5-HT, a fluoxetina, durante a lactação em ratos, encontrou alterações morfológicas nos neurônios serotoninérgicos (Silva, Goncalves et al. 2010). Foi observado um menor número de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe, menor corpo celular (área perímetro e diâmetro) no núcleo dorsal e mediano da rafe e diminuídos terminais serotoninérgicos no giro denteado. Além disso, foi encontrada uma redução gradativa do peso corporal durante toda a lactação. Estes dados sugerem que há comprometimento no desenvolvimento do sistema serotoninérgico com dano na morfologia dos neurônios pela exposição precoce a fluoxetina, além dos mecanismos envolvidos com a ingestão alimentar ou dispêndio energético, uma vez que os animais reduziram seu peso corporal.

A incidência de fatores ambientais, em períodos críticos ao desenvolvimento, também está sendo relacionado às alterações no sistema serotoninérgico no que concerne ao controle do comportamento alimentar. Em estudos utilizado modelos de estresse por manipulação tátil, no período de lactação, foi observado em animais na vida adulta, um aumento da preferência por alimentos palatáveis (Silveira, Portella et al. 2004). Outro trabalho utilizando um modelo de estresse por separação materna pode mostrar alterações nos mecanismos de controle da saciedade e ritmo circadiano (Oliveira, da Silva et al. 2010). Os mecanismos celulares envolvidos nesses estudos ainda não estão elucidados, mas estes podem sugerir que a serotonina pode participar na elaboração e/ou manutenção de estruturas cerebrais, especialmente durante a vida fetal precoce, que coordenam as funções do comportamento alimentar na vida adulta.

6. Considerações finais

A partir dessas evidências, podemos inferir que a 5-HT tem papel determinante não apenas no controle do comportamento alimentar adulto, exercendo também importante ação sobre o direcionamento da maturação de mecanismos de controle do comportamento alimentar durante períodos iniciais da vida. Deste modo, podemos sugerir que esta molécula é mais um fator relacionado as pesquisas das origens desenvolvimentistas da saúde e da doença no que concerne as patologias envolvidas ao comportamento alimentar. A escassez de trabalhos direcionados a este tema torna este assunto alvo de novas pesquisas para aprofundar o conhecimento de sua ação sobre os padrões comportamentais. O aumento substancial dos níveis de 5-HT em períodos críticos do desenvolvimento em ratos pode ser um dos caminhos a investigar os efeitos que esta bioamina exerce sobre a capacidade homeostática do controle do comportamento alimentar desses animais na vida adulta. Dentro de todas as funções as quais a 5-HT está envolvida, os comportamentos alimentar teve destaque neste trabalho por se tratar de uma área relacionada a grandes problemas de saúde pública do mundo, a obesidade.

Referências

- Adell, A., P. Celada, et al. (2002). "Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei." Brain Res Brain Res Rev **39**(2-3): 154-180.
- Arango, V., Y. Y. Huang, et al. (2003). "Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior." J Psychiatr Res **37**(5): 375-386.
- Asberg, M., B. Eriksson, et al. (1986). "Therapeutic effects of serotonin uptake inhibitors in depression." J Clin Psychiatry **47 Suppl**: 23-35.
- Azmitia, E. C. (2007). "Cajal and brain plasticity: insights relevant to emerging concepts of mind." Brain Res Rev **55**(2): 395-405.
- Barker, D. J. (1998). "In utero programming of chronic disease." Clin Sci (Lond) **95**(2): 115-128.
- Barker, D. J. (2007). "The origins of the developmental origins theory." J Intern Med **261**(5): 412-417.
- Berthoud, H. R. (2006). "Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance." Obesity (Silver Spring) **14 Suppl 5**: 197S-200S.
- Berthoud, H. R. and C. Morrison (2008). "The brain, appetite, and obesity." Annu Rev Psychol **59**: 55-92.
- Blue, M. E., R. S. Erzurumlu, et al. (1991). "A comparison of pattern formation by thalamocortical and serotonergic afferents in the rat barrel field cortex." Cereb Cortex **1**(5): 380-389.
- Blundell, J. E., S. Goodson, et al. (2001). "Regulation of appetite: role of leptin in signalling systems for drive and satiety." Int J Obes Relat Metab Disord **25 Suppl 1**: S29-34.
- Bradley, P. B. (1984). "The characterization of 5-HT receptors. Introduction." Neuropharmacology **23**(12B): 1465-1466.
- Brodie, B. B. and P. A. Shore (1957). "A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain." Ann N Y Acad Sci **66**(3): 631-642.
- Buznikov, G. A. (1989). "[Transmitters in early embryogenesis (new data)]." Ontogenez **20**(6): 637-646.
- Buznikov, G. A., H. W. Lambert, et al. (2001). "Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis." Cell Tissue Res **305**(2): 177-186.

- Carley, D. W. and M. Radulovacki (1999). "Mirtazapine, a mixed-profile serotonin agonist/antagonist, suppresses sleep apnea in the rat." *Am J Respir Crit Care Med* **160**(6): 1824-1829.
- Carvin, C. D., R. D. Parr, et al. (2003). "Site-selective in vivo targeting of cytosine-5 DNA methylation by zinc-finger proteins." *Nucleic Acids Res* **31**(22): 6493-6501.
- Cerrito, F. and M. Raiteri (1979). "Evidence for an autoreceptor-mediated presynaptic control of serotonin release in central nerve endings [proceedings]." *Br J Pharmacol* **67**(3): 424P-425P.
- Cheng, C. H., B. Costall, et al. (1994). "Actions of 5-hydroxytryptophan to inhibit and disinhibit mouse behaviour in the light/dark test." *Eur J Pharmacol* **255**(1-3): 39-49.
- Clark, C. T., H. Weissbach, et al. (1954). "5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties." *J Biol Chem* **210**(1): 139-148.
- Cote, F., C. Fligny, et al. (2007). "Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(1): 329-334.
- Encio, I. J. and S. D. Detera-Wadleigh (1991). "The genomic structure of the human glucocorticoid receptor." *J Biol Chem* **266**(11): 7182-7188.
- Ersparmer, V. (1954). "Observations of the metabolism of endogenous 5-hydroxytryptamine (enteramine) in the rat." *Experientia* **10**(11): 471-472.
- Ersparmer, V. (1986). "Historical introduction: the Italian contribution to the discovery of 5-hydroxytryptamine (enteramine, serotonin)." *J Hypertens Suppl* **4**(1): S3-5.
- Garfield, A. S. and L. K. Heisler (2009). "Pharmacological targeting of the serotonergic system for the treatment of obesity." *J Physiol* **587**(Pt 1): 49-60.
- Gluckman, P. D., M. A. Hanson, et al. (2009). "Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases." *Nat Rev Endocrinol* **5**(7): 401-408.
- Guyenet, S. J. and M. W. Schwartz (2012). "Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Body Fat Mass: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Obesity." *J Clin Endocrinol Metab*.
- Halford, J. C. and J. E. Blundell (1996). "The 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence." *Physiol Behav* **60**(3): 933-939.
- Halliday, G., K. Baker, et al. (1995). "Serotonin and alcohol-related brain damage." *Metab Brain Dis* **10**(1): 25-30.
- Harris-Warrick, R. M. and A. H. Cohen (1985). "Serotonin modulates the central pattern generator for locomotion in the isolated lamprey spinal cord." *J Exp Biol* **116**: 27-46.
- Heisler, L. K., M. A. Cowley, et al. (2002). "Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine." *Science* **297**(5581): 609-611.
- Heisler, L. K., E. E. Jobst, et al. (2006). "Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake." *Neuron* **51**(2): 239-249.
- Hoyer, D., D. E. Clarke, et al. (1994). "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)." *Pharmacol Rev* **46**(2): 157-203.
- Hoyer, D., J. P. Hannon, et al. (2002). "Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors." *Pharmacol Biochem Behav* **71**(4): 533-554.
- Hunter, C. P. and C. Kenyon (1995). "Specification of anteroposterior cell fates in *Caenorhabditis elegans* by *Drosophila* Hox proteins." *Nature* **377**(6546): 229-232.
- Huszar, D., C. A. Lynch, et al. (1997). "Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice." *Cell* **88**(1): 131-141.
- Kim, T. D., J. S. Kim, et al. (2005). "Rhythmic serotonin N-acetyltransferase mRNA degradation is essential for the maintenance of its circadian oscillation." *Mol Cell Biol* **25**(8): 3232-3246.
- Kranz, G. S., S. Kasper, et al. "Reward and the serotonergic system." *Neuroscience* **166**(4): 1023-1035.
- Lagercrantz, H. (2006). "Hans Spemann (1869-1941): discoverer of the neuronal organizer." *Acta Paediatr* **95**(4): 386-387.
- Lauder, J. M. and H. Krebs (1978). "Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis." *Dev Neurosci* **1**(1): 15-30.
- Leibowitz, S. F. and J. T. Alexander (1998). "Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight." *Biol Psychiatry* **44**(9): 851-864.

- Lesch, K. P., D. Bengel, et al. (1996). "Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region." Science **274**(5292): 1527-1531.
- Liu, D., J. Diorio, et al. (1997). "Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress." Science **277**(5332): 1659-1662.
- Maes, M., H. Y. Meltzer, et al. (1995). "Effects of serotonin precursors on the negative feedback effects of glucocorticoids on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression." Psychoneuroendocrinology **20**(2): 149-167.
- Magni, P., E. Dozio, et al. (2009). "Feeding behavior in mammals including humans." Ann N Y Acad Sci **1163**: 221-232.
- Meaney, M. J., J. Diorio, et al. (2000). "Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones and serotonin." J Neurosci **20**(10): 3926-3935.
- Mitchell, J. B., W. Rowe, et al. (1990). "Serotonin regulates type II corticosteroid receptor binding in hippocampal cell cultures." J Neurosci **10**(6): 1745-1752.
- Nishiyama, H., T. Knopfel, et al. (2002). "Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 4037-4042.
- Oliveira, L. S., L. P. da Silva, et al. (2010). "Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats." Behav Processes **86**(1): 119-124.
- Ramon, Y. C. S. (1952). "Structure and connections of neurons." Bull Los Angel Neuro Soc **17**(1-2): 5-46.
- Rapport, M. M., A. A. Green, et al. (1948). "Serum vasoconstrictor, serotonin; chemical inactivation." J Biol Chem **176**(3): 1237-1241.
- Ravelli, G. P., Z. A. Stein, et al. (1976). "Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy." N Engl J Med **295**(7): 349-353.
- Sander, K. and P. E. Faessler (2001). "Introducing the Spemann-Mangold organizer: experiments and insights that generated a key concept in developmental biology." Int J Dev Biol **45**(1): 1-11.
- Sandler, M., M. A. Reveley, et al. (1981). "Human platelet monoamine oxidase activity in health and disease: a review." J Clin Pathol **34**(3): 292-302.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, et al. (2000). "Central nervous system control of food intake." Nature **404**(6778): 661-671.
- Silva, C. M., L. Goncalves, et al. (2010). "Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats." Neurosci Lett **483**(3): 179-183.
- Silveira, P. P., A. K. Portella, et al. (2004). "Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats." Physiol Behav **80**(5): 739-745.
- Simansky, K. J. (1996). "Serotonergic control of the organization of feeding and satiety." Behav Brain Res **73**(1-2): 37-42.
- Sinclair, K. D., R. G. Lea, et al. (2007). "The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms." Soc Reprod Fertil Suppl **64**: 425-443.
- Smythe, J. W., W. B. Rowe, et al. (1994). "Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT₂ receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression." Brain Res Dev Brain Res **80**(1-2): 183-189.
- Starke, K., M. Gothert, et al. (1989). "Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors." Physiol Rev **69**(3): 864-989.
- Strecker, R. E., M. M. Thakkar, et al. (1999). "Behavioral state-related changes of extracellular serotonin concentration in the pedunculopontine tegmental nucleus: a microdialysis study in freely moving animals." Sleep Res Online **2**(2): 21-27.
- Weaver, I. C., N. Cervoni, et al. (2004). "Epigenetic programming by maternal behavior." Nat Neurosci **7**(8): 847-854.
- Whitaker-Azmitia, P. M., R. Murphy, et al. (1990). "Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology." Brain Res **528**(1): 155-158.

- Wilson, C. C., K. M. Faber, et al. (1998). "Serotonin regulates synaptic connections in the dentate molecular layer of adult rats via 5-HT1a receptors: evidence for a glial mechanism." Brain Res **782**(1-2): 235-239.
- Wynne, K., S. Stanley, et al. (2005). "Appetite control." J Endocrinol **184**(2): 291-318.
- Yan, W., C. C. Wilson, et al. (1997). "Effects of neonatal serotonin depletion on the development of rat dentate granule cells." Brain Res Dev Brain Res **98**(2): 177-184.
- Yau, J. L., J. Noble, et al. (1997). "Site-specific regulation of corticosteroid and serotonin receptor subtype gene expression in the rat hippocampus following 3,4-methylenedioxymethamphetamine: role of corticosterone and serotonin." Neuroscience **78**(1): 111-121.

3. HIPÓTESES

A inibição da recaptação da serotonina durante a lactação programa os padrões de desenvolvimento do sistema serotoninérgico alterando sua ação sobre o comportamento alimentar de ratos.

A exposição crônica à fluoxetina durante o desenvolvimento aumenta as concentrações de antioxidantes no hipotálamo e hipocampo de ratos.

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da exposição crônica à fluoxetina durante a lactação sobre o controle dos comportamentos alimentar e de ansiedade e o balanço oxidativo no hipotálamo e hipocampo de ratos.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar peso e ingestão alimentar neonatal no 7º, 14º e 21º dias de vida;
- Estudar o ritmo circadiano alimentar aos 35 dias de vida;
- Avaliar a ingestão alimentar após oferta de dieta hiperlipídica dos 37 aos 40 dias de vida;
- Avaliar o consumo calórico alimentar após estímulos alimentares e de privação alimentar aos 40 dias de vida;
- Estudar o perfil de saciedade aos 40 e 41 dias de vida;
- Avaliar o estado de ansiedade aos 55 dias de vida;
- Analisar o balanço oxidativo no hipotálamo e hipocampo aos 60 dias de vida.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 114 ratos da linhagem *Wistar*, sendo que 12 fêmeas e 6 machos provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os filhotes (96) oriundos do acasalamento entre os animais foram utilizados no presente estudo.

Os animais foram obtidos através de critérios pré-estabelecidos, o que implicou em um trabalho sob ambientes controlados e com animais padronizados que garantiu a reprodutibilidade, a comparabilidade e a possibilidade de fazer generalizações e consequentemente à validade da pesquisa experimental. Contudo, para evitar contaminações e interferências nos experimentos, além de ter o bem estar do animal como prioridade, foi estabelecido um padrão sanitário definido (Faria 1998; Chorilli, Michelin et al. 2007).

As fêmeas selecionadas entre 220-250g foram abrigadas em biotério sob condições padrão de temperatura, iluminação e umidade com água e comida (dieta Labina – Purina S/A durante todo experimento) *ad libitum*. Em se tratando do controle da temperatura, sabe-se que a sinergia com a umidade do ambiente promove o equilíbrio térmico do animal. As mudanças nesses padrões levam a respostas adaptativas com alterações comportamentais, fisiológicas e metabólicas. A maioria dos animais de laboratório apresenta sudoração insignificante e usa taquipnéia como mecanismo de adaptação frente ao calor. A temperatura e a umidade foram seguidas segundo a recomendação para os ratos de laboratório sendo de 20-24°C e 60 +/- 10%, respectivamente (van Zutphen 1993). O monitoramento diário foi estabelecido a fim de evitar estresse térmico. Os animais estão constantemente perdendo calor, umidade e eliminando CO₂, além de outras substâncias resultantes de reações metabólicas, por isso os animais foram mantidos em ambiente onde existe renovação do ar, evitando o acúmulo de substâncias tóxicas nas salas, como a amônia por exemplo. A intensidade da luz e o fotoperíodo influenciam o metabolismo e o ciclo estral dos ratos, alterando suas respostas biológicas (Semple-Rowland and Dawson 1987). Logo foram promovidos períodos alternados e regulares de luz e escuridão (12/12 horas) e um período de adaptação de quinze dias para sincronizar o seu ciclo circadiano.

Após a adaptação, as ratas quando em período estral foram acasaladas na proporção de uma fêmea para um macho. Para isso foi acompanhado a tipagem das células do epitélio vaginal por método de esfregaço vaginal em lâmina e posterior observação ao microscópio óptico Leica DMLS. Foram consideradas prenhas as ratas que apresentaram espermatozóides

no esfregaço vaginal e aumento diário no peso corporal (Marcondes, Bianchi et al. 2002). Confirmado o acasalamento. As ratas foram mantidas em gaiolas individuais (policarbonato cristal, 49 x 34 x 32) e em condições padrão de biotério durante todo período de gestação segundo.

Os filhotes foram escolhidos de modo aleatório 1º dia após o nascimento com peso entre 6 e 8 gramas. A ninhada foi formada de quatro neonatos machos e 4 neonatos fêmeas os quais foram mantidos com as suas nutrizes até o 21º dia de vida pós natal. Os filhotes restantes da ninhada foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono. Após o desmame os filhotes foram alocados em gaiolas individuais nas mesmas condições padrões de biotério até o final do período experimental. A gaiola era para rato individual produzida em policarbonato cristal transparente, autoclavável e resistente a ácidos, nas medidas de 30x20x19. A cama dos animais foi composta de maravalha de madeira de pinho autoclavada. Após processo de secagem a maravalha foi devidamente peneirada para retirada do pó. O manejo e os cuidados, que se seguiu, foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE (Processo nº 23076.026644/2010-20).

5.2 Tratamento

Farmacológico

Para manipular o sistema serotoninérgico, foi utilizado durante a lactação (1º ao 21º dia de vida) um inibidor seletivo de recaptação de serotonina (ISRS), a fluoxetina (Sigma). Este fármaco bloqueia a proteína transportadora da 5-HT, da fenda ao botão neuronal pré-sináptico, aumentando sua disponibilidade para o processo de neurotransmissão (Hiemke and Hartter 2000; Qu, Aluisio et al. 2009). A fluoxetina foi escolhido devido suas seletividade e propriedades farmacocinéticas pois possui ampla absorção e um tempo de ½vida longo (aproximadamente 4 horas). Além disso seu metabólito, a norfloketina, também atua inibindo a recaptação de 5-HT e possui um tempo de meia vida mais prolongado que a fluoxetina (aproximadamente 13 horas) e não promove efeitos secundários (Wong and Bymaster 1995; Qu, Aluisio et al. 2009). Foi utilizado na concentração de 10 mg/Kg de peso corporal (p.c.), a qual já foi observada aumentar as concentrações encefálicas da 5-HT (Miller, Schultz et al. 2008). A droga foi obtida na forma de cloridrato de fluoxetina e dissolvida em veículo controle, uma solução salina (NaCl) a 0.9%.

Controle

Foi utilizado 10ml/kg p.c. de solução de Cloreto de Sódio (NaCl) á 0,9%.

5.3 Via de Manipulação

O tratamento foi administrado por via Subcutânea (sc) e o horário de manipulação dos animais ocorreu ao início do ciclo escuro (7:00h). Uma determinada dose de uma droga pode produzir efeitos diferentes quando aplicada em diferentes horários do dia. Logo, o horário de manipulação farmacológica foi mantido durante todo o experimento em concordância com o horário do segundo e maior pico de liberação da serotonina (Sanchez, Sanchez et al. 2008). Esse método consistiu na injeção da solução sob a pele do animal, a qual foi levantada antes da aplicação. Foi realizado com agulha hipodérmica curta (normalmente 25 x 5 mm ou mais fina), passando apenas pela derme, o mais próximo da superfície, formando uma pápula após a administração da substância. A região dorsal da pele foi a região de escolha. Essa via raramente induz dor e foi realizada com o animal consciente. Antes de injetar a solução, foi aspirado sob leve pressão o êmbolo da seringa para assegurar que a agulha não esteve penetrando em um vaso sanguíneo.

5.4. Grupos Experimentais

No período de lactação, cada ninhada (8 animais) foi formada por dois grupos experimentais segundo o tratamento:

- **4 Neonatos Controle** (C_{NEO} , n=48): foi tratado diariamente com solução salina a 0,9%, 10ml/kg, peso corporal (p.c.), sc, do 1º ao 21º dia pós-natal;
- **4 Neonatos Fluoxetina** (F_{NEO} n=48): os animais foram tratados com fluoxetina na dose de 10mg/kg, p.c., sc; do 1º ao 21º dia pós-natal.

5.5 Procedimentos

5.5.1 Acompanhamento do peso corporal

As gestantes e os animais dos grupos experimentais foram acompanhados periodicamente. O peso dos filhotes foi mensurado diariamente durante o período de lactação e nas avaliações pós desmame. O peso foi registrado no início do ciclo claro/escuro. Para medir o peso corporal dos animais foi utilizada uma balança digital (Marte, modelo S-100

com sensibilidade de 0.01g) a fim de estabelecer a evolução ponderal dos grupos experimentais.

5.5.2 Avaliação da ingestão alimentar

Ingestão Alimentar Neonatal

O consumo alimentar individual dos filhotes, em miligramas (mg), foi obtido no 7^o, 14^o e 21^o dias de lactação. Para estimular o consumo alimentar, os animais foram isolados de sua mãe durante 3 horas. Durante esse período os filhotes com idade de 7 e 14 dias permaneceram juntos em caixa plástica mantida em incubadora com temperatura de 33 °C. O consumo foi quantificado pelo ganho de peso do filhote após uma hora de sua volta a caixa de origem (Haupt and Haupt 1975). Para garantir maior confiabilidade na quantificação de alimento ingerido foi realizada estimulação com objeto macio nos órgãos genitais dos filhotes para promover a excreção de urina e fezes (Hall 1977).

Medidas de Consumo Alimentar Pós Natal

O consumo alimentar, nos testes descritos a seguir, foi obtido pela diferença entre a dieta oferecida e a dieta rejeitada após o período de análise de cada avaliação.

- *Avaliação do ritmo circadiano alimentar*

Para avaliação do ritmo circadiano alimentar, em ratos com 35 dias de vida, foi medido em gramas o consumo alimentar de dieta padrão (LABINA) a cada 4 horas durante 24 horas. O consumo alimentar foi calculado pela diferença entre o peso da ração padrão oferecida e da rejeitada.

- *Teste de ingestão alimentar com dieta hiperlipídica*

Estudos mostram que as dietas ricas em gorduras são altamente palatáveis aos roedores, fazendo com que haja aumento substancial no consumo calórico em 1 hora de teste (Ishii, Blundell et al. 2003). Nesta análise o consumo alimentar foi registrado após 1 hora da oferta de dieta hiperlipídica (palatável-Tabela 2) sem exposição prévia ao jejum. Parte dos animais do grupo controle e tratado tiveram o consumo avaliado dos 37 aos 40 dias de vida. Foi calculado a média de ingestão (g) por cada grupo nos diferentes dias e o percentual calórico (%Kcal) ingerido no 40^o dia de vida.

- *Teste de ingestão alimentar com dieta padrão modificada*

A utilização de uma dieta padrão hidratada permite nos testes comportamentais o início imediato da alimentação eliminando a necessidade de privação alimentar antes do teste (Ishii, Blundell et al. 2003). Utilizamos para esse teste mistura de ração e água na proporção de 1:2. Foi oferecido aos animais quantidade conhecida de dieta, aos 40 dias de vida, e o consumo alimentar foi avaliado durante 60 minutos. Foi calculado e o percentual calórico (%Kcal) ingerido durante o tempo de avaliação.

- *Teste de ingestão alimentar após jejum*

A restrição alimentar de 6 e 12 horas promove aumento no consumo e duração da alimentação na fase inicial dos testes de comportamento alimentar, diferente do observado com apenas 3 horas de restrição (Ishii, Blundell et al. 2003). O consumo alimentar (g) de dieta padrão (LABINA) foi avaliado após 12 horas de jejum em animais com 49 dias de vida. Foi calculado a média de consumo (g) após 2, 4 e 12 horas de oferta em todos animais de ambos grupos experimentais.

Tabela 1: Composição centesimal da dieta hiperlipídica

Composição centesimal				
Proteína	Carboidratos	Lipídeos	Fibras	Kcal%
21,0	46,0	33,0	0,51	411,2

* Itens de enriquecimento por 100g de ração: Maisena (12,7g), Farinha de Trigo (15g), Biscoito Maisena (7,2g), Farinha de Soja (10g), Caseína (19,6g), Celulose (19,6mg), Goma Aguar (0,5g), Óleo de Soja (6 ml), Banha (4g), Margarina (4,2g), Açúcar (17g), Sais (15g), Vitaminas (0,5g), Colina (0,2g), Metionina (0,2g), Bht (0,14mg)

Tabela 2: Composição centesimal da dieta LABINA (Purina Brasil*)

Composição centesimal					
Proteína	Carboidratos	Lipídeos	Cinzas	Fibras	Kcal%
23,27	56,81	4,24	6,60	8,00	358,48

* Itens de enriquecimento por Kg de ração: ácido fólico (14,00mg), antioxidante (150,0mg), biotina (0,2mg), cobalto (2,00mg), cobre (30,00mg), colina (2.800,00m), ferro (180,00mg), iodo (2,00mg), manganês (110,00mg), niacina (242,00mg), selênio (0,20mg), pantoteno de cálcio (100,00mg), piridoxina (12,00mg), tiamina (12,00mg), vitamina A (28.000,00 UI), Vitamina B12 (44,00mg), Vitamina B2 (28,00mg) Vitamina D3 (4.400,00 UI), Vitamina E (90,00 UI), Vitamina K (7,00mg), zinco (110,00mg).

Fonte Silva, 2008

5.5.3 Estudo da Sequência Comportamental de Saciedade

A Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) é o nome dado às transições ordenada do comer, limpar e descansar onde é refletido os processos fisiológicos naturais subjacentes saciedade. Se os recursos ambientais forem mantidos constantes, a estrutura do comportamento animal pode ser usada para estudar os processos fisiológicos envolvidos na modulação da ingestão de alimentos (Halford, Wanninayake et al. 1998). O estudo da SCS foi realizado aos 40 e 41 dias pós-natal. Os filhotes desmamados já transferidos para gaiolas individuais de acrílico foram alocados para o local de avaliação na estante sete dias antes da realização do experimento. O tempo de permanência, antes do experimento, nessas gaiolas foi essencial para que o animal se adapte ao ambiente, evitando que o stress do isolamento inicial interfira nos resultados da SCS.

Neste estudo, cada animal dos diferentes grupos experimentais foi submetido, no dia da avaliação, à privação alimentar para estimular a busca pelo alimento. Esta privação se constitui da retirada da ração por um período de 3 horas antes do experimento (8h às 11h). A observação comportamental no 40^o e 41^o dia foi iniciada oferecendo quantidade de ração conhecida aos animais.

Esta análise nos permitiu avaliar: **ingestão alimentar** (medida através da diferença de peso entre o alimento oferecido e rejeitado após 3h privação alimentar); **parâmetros alimentares** (avaliado pela relação entre a quantidade de alimento ingerido e o tempo de alimentação (**LER**) e o tempo de avaliação (**GER**); **análise microestrutural do comportamento** (avaliado pela mudança nos comportamentos de alimentação, descanso, limpeza e atividade ao longo de 5 períodos que correspondem a divisão do tempo total de avaliação). Os comportamentos da SCS foram categorizados como:

Alimentação - O registro desse comportamento foi iniciado imediatamente após a observação do rato junto ao comedouro iniciando o consumo ao morder, roer, ou ingerir alimentos do comedouro ou de suas patas dianteiras. O mesmo foi finalizado quando o rato abandonou o comedouro.

- Limpeza - O comportamento de limpeza caracteriza-se por um comportamento estereotipado caracterizado por arranhar, morder ou lambear da região ventral e dorsal, calda, patas, ou genitais. Normalmente ocorre de forma mais intensa após o comportamento de alimentação.
- Descanso - Esse comportamento foi registrado quando o animal apresentar-se sentado ou deitado em uma posição de descanso ou ainda com a cabeça enrolada para baixo de seu corpo.

- Atividade - Incluem outros comportamentos como: locomoção, cheirar, levantar as patas anteriores e explorar a área.

O ponto de Satedade foi indicado pelo ponto de cruzamento dos comportamentos que determinam o final da alimentação e início do descanso.

No 41^o dia pós-natal avaliamos a SCS dos grupo C_{NEO} e F_{NEO} após 1 hora da administração aguda de fluoxetina (10 mg/kg, p.c), formando os grupos C_{NEO+FA} e F_{NEO+FA} respectivamente. Nos dias de avaliação, os comportamentos que constituem a sequência comportamental de satedade foram registrados em segundos durante 60 minutos. Para o registro da duração dos comportamentos foi utilizado o sistema de filmagem com auxílio de câmeras de infravermelho (1/3 480 linha chipsony). Os testes foram realizados no período de 11h -12h, com o ciclo de luz no período escuro.

5.5.4 Teste de ansiedade no labirinto em cruz elevado

A asiedade pode ser avaliada utilizando o labitinto em cruz elevado, com base na relação de entrada nos braços aberto e fechados do labirinto (Lister 1987). Com 55 dias de vida o nível de ansiedade foi analiado pelo labirinto em cruz elevado (50 cm do chão) em fêmeas. Este possui quatro braços dispostos em cruz, sendo dois abertos (50 x 10 cm) e dois fechados (50 x 10 x 40 cm). O teste foi realizado no ciclo escuro com auxilio de luz vermelha (11:00-11:30). Cada rato foi colocado no centro da plataforma e durante 5 min o número de entradas e o tempo gasto em cada braço foi registrado por um sistema de captação de imagem em infra-vermelho.

5.5.5 Coleta do material biológico

Aos 60 dias de vida as ratas foram anestesiadas com ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (0.1 ml/100 g and 0.05 ml/100 respectivamente, ip) (Lectez, Jeandel et al. 2009) para serem dissecados do encéfalo o hipotálamo e hipocampo.

5.5.6 Processamento do material biológico para análise bioquímica

O hipotálamo e hipocampo coletados foram homogeneizados em tampão de extração (Tris base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; fluoreto de sódio 100 mM; ortovanadato de sódio 1 mM; PMSF 2 mM). Após a homogenização as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, a 4° C, por 10 minutos e o sobrenadante foi submetido à quantificação de proteína.

5.5.7 Dosagem de proteína

A concentração de proteína da suspensão de cada tecido foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976). Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância foi considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1% foi utilizada como padrão.

5.5.8 Medida dos níveis de estresse oxidativo pela metodologia da Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A dosagem de TBARS foi realizada segundo Buege & Aust (1978) (Buege and Aust 1978), utilizando uma técnica colorimétrica para avaliar a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da lipoperoxidação, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. Coloca-se uma alíquota do homogenizado, de ácido tricloroacético a 10% e de ácido tiobarbiturico que reage com os produtos da lipoperoxidação para formar um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada. Na sequência, foi adicionado n-butanol e as amostras agitadas por 30 segundos, com o objetivo de extrair o pigmento formado. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, sendo então a fase com o n-butanol utilizada para a leitura da absorbância a 535nm, utilizando cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em nmoles de TBARS por mg de proteína.

5.5.9 Atividade enzimática: Catalase

A atividade da catalase (CAT) é diretamente proporcional a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, sendo assim, a atividade da enzima pode ser medida através da avaliação do consumo de peróxido pelo decréscimo na absorção a 240 nm ([] máx do H₂O₂) de um meio de reação, contendo tampão fosfato (pH=7,4) e H₂O₂. Os resultados foram expressos em pmol Catalase por minuto por mg de proteína (Halliwell 1989).

5.6 Análise estatística

Todos os dados foram analisados segundo a normalidade da distribuição. Os dados estiveram dentro da distribuição gaussiana e foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados pelo teste t student. Foi adotado o nível de significância de 5% em todos os casos. A construção do banco de dados e as análises estatísticas foram desenvolvidas no programa Excel (versão 2007, Microsoft, USA) e Graphpad Prisma 5® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), respectivamente.

6.1 ARTIGO ORIGINAL 1

INIBIÇÃO DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA DURANTE A LACTAÇÃO EM RATOS: AJUSTES NA EXPRESSÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR NA VIDA ADULTA

Resumo

A exposição neonatal a antidepressivos, incluindo os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), induz distúrbios comportamentais que persistem em ratos adultos. O sistema serotoninérgico desempenha um papel crucial no desenvolvimento e no controle homeostático e hedônico do comportamento alimentar. Neste estudo mostramos que a manipulação crônica do sistema serotoninérgico durante a lactação em ratos promove mudanças no comportamento alimentar após desmame. Os filhotes machos da linhagem *Wistar* foram utilizados e receberam injeção subcutânea diária de fluoxetina (F_{NEO} , 10 mg/kg, p.c, Grupo Tratado, n=24) e solução veículo da diluição do fármaco (C_{NEO} , 0,9% NaCl, p.c, Grupo Controle, n=24) às 7:00 h (início ciclo escuro), do 1º ao 21º dia pós-natal. Como resposta imediata ao tratamento os animais F_{NEO} apresentaram redução dos pesos corporais diários no 7º ($C_{NEO} = 17,21 \pm 0,62$ vs $F_{NEO} = 15,82 \pm 0,29$; $P=0,033$), 14º ($C_{NEO} = 34,61 \pm 0,72$ vs $F_{NEO} = 28,25 \pm 0,49$; $P<0,0001$) e 21º dia ($C_{NEO} = 52,38 \pm 1,26$ vs $F_{NEO} = 41,32 \pm 0,68$; $P<0,0001$). Quando estimulados com dieta palatável observamos diferença significativa entre C_{NEO} e F_{NEO} no 37º ($C_{NEO} = 1,86 \pm 0,28$ vs $F_{NEO} = 3,82 \pm 0,51$; $P= 0,0054$), 38º ($C_{NEO} = 2,09 \pm 0,19$ vs $F_{NEO} = 4,57 \pm 0,57$; $P=0,0014$) e 39º dia ($C_{NEO} = 3,18 \pm 0,20$ vs $F_{NEO} = 4,85 \pm 0,38$; $P=0,002$). A exposição ao jejum de 12 horas promoveu um aumento mais substancial no grupo F_{NEO} quando comparado ao grupo C_{NEO} nas duas primeiras horas de avaliação ($C_{NEO} = 2,67 \pm 0,19$ vs $F_{NEO} = 4,13 \pm 0,16$; $P<0,0001$). Nossos resultados mostram que a exposição neonatal crônica à ISRS pode resultar em anormalidades persistentes no comportamento adulto reforçando assim a importância da integridade do sistema serotoninérgico durante o período do desenvolvimento para a evolução normal das funções comportamentais.

Palavras chave: sistema serotoninérgico, fluoxetina, neuropeptídeos, hipotálamo, lactação.

Abstract

The neonatal exposure to antidepressants, including selective reuptake inhibitors (SSRIs), induces behavioral disturbances that may persist in adult. The serotonin system plays a crucial role in the development, homeostatic and hedonic control of eating behavior. In this study we show that chronic manipulation of the serotonergic system during lactation in rats causes changes in eating behavior. The male offspring of Wistar rats were used and received daily subcutaneous injection of fluoxetine (F_{NEO}, 10 mg / kg b.w.; Treated group, n = 24) and vehicle solution of the drug (C_{NEO}, 0.9% NaCl, b.w.; Control group, n = 24) at 7:00 pm (dark cycle), from 1st -21st days of life. As an immediate response to treatment, F_{NEO} group showed a reduction in body weight since 7th day of life (C_{NEO} = 17,21 ± 0,62 vs F_{NEO} = 15,82 ± 0,29; P=0,033), 14^o (C_{NEO} = 34,61 ± 0,72 vs F_{NEO} = 28,25 ± 0,49; P<0,0001) e 21^o day of life (C_{NEO} = 52,38 ± 1,26 vs F_{NEO} = 41,32 ± 0,68; P<0,0001). No difference was found in food intake with the standard diet or in consumption during the 24 hours of the circadian rhythm. After receiving acute dose of fluoxetine C_{NEO} + FA group showed a reduction in food intake when compared to control (C_{NEO} = 3,01 ± 0,17 vs. C_{NEO} + FA = 2,31 ± 0,21, P = 0,0142) and F_{NEO} + FA group showed no significant difference (F_{NEO} = 3,36 ± 0,22 vs. F_{NEO} + FA = 3,37 ± 0,26, P = 0,9767). However, when stimulated with palatable diet was observed significant difference between the 37th C_{NEO} and F_{NEO} (C_{NEO} = 1,86 ± 0,28 vs F_{NEO} = 3,82 ± 0,51, P= 0,0054), 38th (C_{NEO} = 2,09 ± 0,19 vs F_{NEO} = 4,57 ± 0,57; P=0,0014) and 39 days of life (C_{NEO} = 3,18 ± 0,20 vs. F_{NEO} = 4,85 ± 0,38; P=0,002). When subjected to fasting for 12 hours the group Fasting-F_{NEO} when compared to Basal-F_{NEO} increased significantly only 2 h (Basal-F_{NEO} = 1,66 ± 0,26 vs Fast-F_{NEO} = 4,13 ± 0,16, P <0.0001) and 4h (Basal-F_{NEO} = 3,37 ± 0,31 vs Fast-F_{NEO} = 4,99 ± 0,37, P = 0.0057) after food intake. In addition, exposure to starvation promoted a significant increase in the group F_{NEO} then C_{NEO} when compared to the first two hours of assessment (C_{NEO} = 2,67 ± 0,19 vs F_{NEO} = 4,13 ± 0,16, P <0.0001). Our results showed that chronic neonatal exposure to SSRIs could result in persistent abnormalities in adult behavior, thus reinforcing the importance of the integrity of the serotonergic system during the period of development during the normal expansion of behavioral functions.

Key words: serotonergic system, fluoxetine, neuropeptides, hypothalamus, lactation.

Introdução

A exposição neonatal a inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) vem ocorrendo com mais frequência nos dias atuais devido a grande incidência de mulheres gestantes que apresentam depressão e utilizam antidepressivos (Patil, Kuller et al. 2011). Em estudos com ratos, tem-se demonstrado que a administração crônica de antidepressivos (clomipramina, fluoxetina, zimeldine, citalopram) durante o início da vida resulta em retardo na ontogênese de reflexos e no crescimento somático, alterações na atividade locomotora, redução da atividade e competência sexual do macho, aumento do consumo de etanol, desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e aumento da imobilidade no teste de nado forçado (Mirmiran, van de Poll et al. 1981; Hilakivi, Sinclair et al. 1984; Hilakivi, Stenberg et al. 1987; Hansen, Sanchez et al. 1997; Ansorge, Zhou et al. 2004; Deiro, Carvalho et al. 2008; Silva, Goncalves et al. 2010). Alguns trabalhos associam essas adaptações comportamentais à redução na concentração de serotonina (5-HT) na vida pós-natal em várias regiões cerebrais (Hilakivi, Stenberg et al. 1987; Vijayakumar and Meti 1999).

O crescimento do encéfalo em roedores começa no período pré-natal, continua no período pós-natal e chega a idade madura no 28º dia de vida. Em comparação, o crescimento do encéfalo humano começa no período pré-natal, e continua além dos 30 meses após o parto (Dobbing 1974). Além do aumento na massa encefálica, a sinaptogênese e proliferação glial iniciam no final do período pré-natal continuando até o 40º dia pós-natal no rato e dos 4-6 anos de idade nos seres humanos. Da mesma forma, as proteínas transportadoras monoaminérgicas são pouco expressas no período pré-natal e sofrem maior proliferação de 5-6 semanas após o nascimento (Hansson, Mezey et al. 1998; Zhou, Sari et al. 2000). Assim, o desenvolvimento do sistema nervoso durante os períodos pré e pós-natal parece particularmente vulnerável a teratogenicidade neurobiológica devido à exposição a drogas exógenas (Lauder 1990; Whitaker-Azmitia 1991).

A 5-HT é considerada determinante para formação e diferenciação de células neurais, as quais estarão relacionadas as funções encefálicas normais (Whitaker-Azmitia, Murphy et al. 1990). Como consequência, a presença de 5-HT no sistema nervoso é crucial ao desenvolvimento dos comportamentos onde estes neurônios estão envolvidos. Através da ampla distribuição de receptores a 5-HT atua sobre o comportamento alimentar controlando o tamanho e a duração da refeição (Blundell 1991). Alterações no funcionamento dos neurônios serotoninérgicos, devido a proteínas de transporte mais eficaz ou a receptores mais sensíveis, por exemplo, reflete sobre a capacidade do cérebro e do organismo para se adaptar e ter sucesso na natureza (Lauder and Krebs 1978).

Diante da influência determinante da 5-HT como neurotransmissor e neuromodulador sobre os padrões normais de várias funções no adulto, procuramos investigar os efeitos da exposição crônica ao inibidor seletivo de recaptação da 5-HT durante a lactação sobre o controle do comportamento alimentar em ratos, uma vez que distúrbios neste comportamento são motivos de alerta a saúde pública no mundo.

Materiais e Métodos

Animais

Ratos Wistar machos foram mantidos a uma temperatura ambiente de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ em um ciclo claro-escuro de 12:12 horas (início ciclo escuro às 6:00h), com água e comida *ad libitum*. Um dia após o nascimento, considerado dia 1 de vida, foram aleatoriamente formadas ninhadas com 8 filhotes machos cada. Foram utilizados no máximo dois filhotes de cada ninhada para avaliações distintas. Todos os procedimentos foram realizados com a aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco com o número do processo 23076.026644/2010-20.

Tratamento farmacológico e grupos experimentais

Cada ninhada foi formada por 4 animais que recebiam fluoxetina ($F_{\text{NEO}} 10 \text{ mg / kg}$, dissolvido em solução salina, 10 ml / kg , p.c) mais 4 animais que recebiam solução veículo da diluição do fármaco ($C_{\text{NEO}} \text{ NaCl } 0,9\%$, 10 ml / kg , p.c). A fluoxetina ou salina eram administrada em uma única injeção subcutânea diária do 1º ao 21º dia pós-natal. Para evitar qualquer possível influência do ritmo circadiano de liberação da serotonina sobre as avaliações, a fluoxetina foi injetada sempre das 7:00-8:00h (Sanchez, Sanchez et al. 2008).

Medida de peso corporal

O peso corporal foi determinado em gramas com auxílio de balança digital do 1º ao 21º, do 33º ao 35º e no 40º e 41º dia pós-natal.

Medida do consumo alimentar neonatal

O consumo alimentar individual dos filhotes, em miligramas (mg), foi obtido no 7º, 14º e 21º dias de lactação. Para estimular o consumo alimentar, os animais foram isolados de sua mãe durante 3 horas. Durante esse período os filhotes com idade de 7 e 14 dias permaneceram

juntos em caixa plástica mantida em incubadora com temperatura de 33 °C. O consumo foi quantificado pelo ganho de peso do filhote após uma hora de sua volta a caixa de origem (Houpt and Houpt 1975). Para garantir maior confiabilidade na quantificação de alimento ingerido foi realizada estimulação com objeto macio nos órgãos genitais dos filhotes para promover a excreção de urina e fezes (Hall 1977).

Medidas de Consumo Alimentar Pós Natal

- *Avaliação do ritmo circadiano alimentar*

Para avaliação do ritmo circadiano alimentar, em ratos com 35 dias de vida, foi medido em gramas o consumo alimentar de dieta padrão (LABINA) a cada 4 horas durante 24 horas. O consumo alimentar foi calculado pela diferença entre o peso da ração padrão oferecida e da rejeitada.

- *Teste de ingestão alimentar com dieta hiperlipídica*

Estudos mostram que as dietas ricas em gorduras são altamente palatáveis aos roedores, fazendo com que haja aumento substancial no consumo calórico em 1 hora de teste (Ishii, Blundell et al. 2003). Nesta análise o consumo alimentar foi registrado após 1 hora da oferta de dieta hiperlipídica (palatável) sem exposição prévia ao jejum. Parte dos animais do grupo controle e tratado tiveram o consumo avaliado dos 37 aos 40 dias de vida. Foi calculado a média de ingestão (g) por cada grupo nos diferentes dias e o percentual calórico (%Kcal) ingerido no 40º dia de vida.

- *Teste de ingestão alimentar com dieta padrão modificada*

A utilização de uma dieta padrão hidratada permite nos testes comportamentais o início imediato da alimentação eliminando a necessidade de privação alimentar antes do teste (Ishii, Blundell et al. 2003). Utilizamos para esse teste mistura de ração e água na proporção de 1:2. Foi oferecido aos animais quantidade conhecida de dieta, aos 40 dias de vida, e o consumo alimentar foi avaliado durante 60 minutos. Foi calculado e o percentual calórico (%Kcal) ingerido durante o tempo de avaliação.

- *Teste de ingestão alimentar após jejum*

A restrição alimentar de 6 e 12 horas promove aumento no consumo e duração da alimentação na fase inicial dos testes de comportamento alimentar, diferente do observado

com apenas 3 horas de restrição (Ishii, Blundell et al. 2003). O consumo alimentar (g) de dieta padrão (LABINA) foi avaliado após 12 horas de jejum em animais com 49 dias de vida. Foi calculado a média de consumo (g) após 2, 4 e 12 horas de oferta em todos animais de ambos grupos experimentais.

Sequência comportamental de saciedade (SCS)

A SCS tem sido utilizada para observar o processo fisiológico da saciedade (Antin, Gibbs et al. 1975; Halford, Wanninayake et al. 1998). Neste estudo, parâmetros alimentares foram avaliados aos 40 e 41 dias de vida após 3 horas de privação alimentar. A SCS é a transição ordenada do comer e descansar e foi registrada durante um período de 60 minutos. Os comportamentos da SCS foram categorizados como: comer (ingestão de alimentos, roer, mastigar ou a exploração de alimentos nas patas), limpar (movimentos com a boca e patas de limpeza do corpo) e descansar (sentado ou deitado em posição de repouso). A duração de cada comportamento foi expressa em períodos de 10 minutos cada. A ingestão alimentar (g) foi medida através da diferença de peso entre o alimento oferecido e rejeitado. Foi também analisada a relação entre a quantidade de alimento ingerido (g) e o tempo (minutos) de alimentação (**LER**) e o tempo de avaliação (**GER**). No 41^o dia pós-natal avaliamos a SCS dos grupo C_{NEO} e F_{NEO} após 1 hora da administração aguda de fluoxetina (10 mg/kg, p.c), formando os grupos C_{NEO+FA} e F_{NEO+FA} respectivamente.

Análise estatística

Todos os dados foram analisados segundo a normalidade da distribuição. Os dados estiveram dentro da distribuição gaussiana e foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados pelo teste t student (comparação entre duas médias) e Two-Way ANOVA (análise de variância). Foi adotado o nível de significância de 5% em todos os casos. A construção do banco de dados e as análises estatísticas foram desenvolvidas no programa Excel (versão 2007, Microsoft, USA) e Graphpad Prisma 5® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), respectivamente.

Resultados

1. Peso e Consumo Alimentar Neonatal

Os filhotes do grupo F_{NEO} quando comparados ao grupo C_{NEO} apresentaram redução dos pesos corporais diários no 7^o ($C_{NEO} = 17,21 \pm 0,62$ vs $F_{NEO} = 15,82 \pm 0,29$; $P=0,033$), 14^o ($C_{NEO} = 34,61 \pm 0,72$ vs $F_{NEO} = 28,25 \pm 0,49$; $P<0,0001$) e 21^o dia ($C_{NEO} = 52,38 \pm 1,26$ vs $F_{NEO} = 41,32 \pm 0,68$; $P<0,0001$) (Figura 1A). No entanto, não foi encontrada nenhuma diferença no consumo alimentar relativo entre os grupos C_{NEO} (7^o = $2,13 \pm 0,19$; 14^o = $2,76 \pm 0,26$; 21^o = $3,7 \pm 0,18$) versus F_{NEO} (7^o = $2,03 \pm 0,16$; 14^o = $2,81 \pm 0,19$; 21^o = $3,88 \pm 0,26$) nos respectivos dias (Figura 1B).

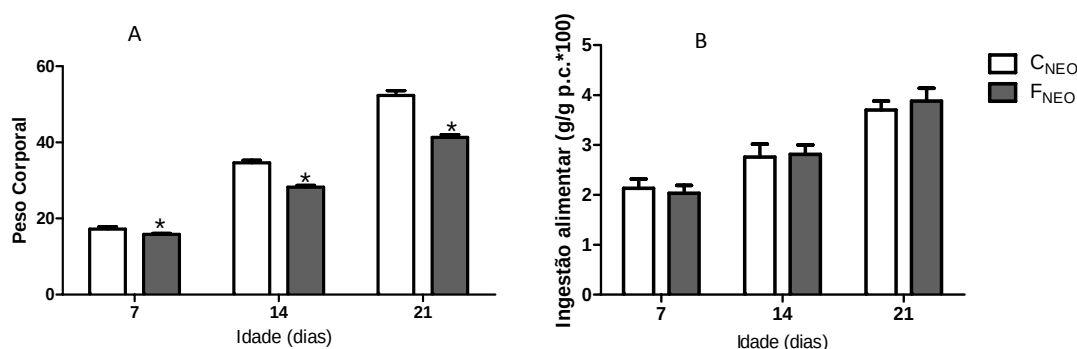


Figura 1- Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina sobre o peso corporal (g) (A) e consumo alimentar relativo (g/g peso corporal (p.c.)*100) (B) em filhotes de ratos machos tratados com fluoxetina ou solução salina durante o período de aleitamento. Os ratos receberam fluoxetina ($F_{NEO} = 10$ mg / kg p.c., sc; n = 24) ou salina ($C_{NEO} = NaCl$ 0,9%, 1ml/Kg, p.c., sc; n = 18) do 1^o ao 21^o dia de vida. Foi avaliado a ingestão alimentar no 7^o, 14^o e 21^o dia de vida pós-natal a partir da diferença de peso antes e após teste. Os dados de peso corporal e consumo relativos estão apresentados como média $\pm$ EPM. * Significa diferença entre grupos de mesma idade.

2. Ritmo Circadiano Alimentar

Na análise do ritmo circadiano alimentar (4h-4h) após desmame não foi observado nenhuma diferença significativa entre os grupos C_{NEO} versus F_{NEO} nos períodos claro (1^o

$C_{NEO}=1,01 \pm 0,49$ vs $F_{NEO}= 1,38 \pm 0,89$; 2^o $C_{NEO}=2,25 \pm 1,2$ vs $F_{NEO}= 1,61 \pm 0,76$; 3^o $C_{NEO}=3,15 \pm 0,60$ vs $F_{NEO}= 2,75 \pm 0,80$) e escuro (1^o $C_{NEO}=5,47 \pm 1,38$ vs $F_{NEO}= 5,21 \pm 1,81$; 2^o $C_{NEO}=4,51 \pm 0,88$ vs $F_{NEO}= 3,9 \pm 0,73$; 3^o $C_{NEO}=5,66 \pm 1,54$ vs $F_{NEO}= 4,71 \pm 1,15$) (Figura 2).

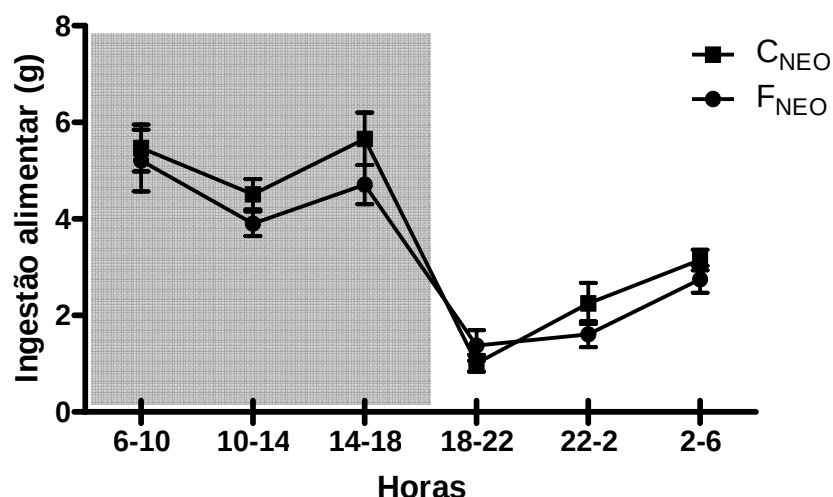


Figura 2. Efeito do tratamento neonatal com fluoxetine sobre o ritmo circadiano (4/4h) da ingestão alimentar absoluta (g) durante 24 em ratos aos 35 dias de vida. Os animais receberam fluoxetina (F_{NEO} = 10 mg / kg p.c., sc; n = 8) ou salina (C_{NEO} = NaCl 0,9%, 10ml/Kg p.c., sc; n = 8) do 1 ° ao 21 ° dia de vida. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. O retângulo cinza compreende os períodos escuro.

3. Teste de Ingestão Alimentar Pós-natal

Nenhuma diferença foi encontrada sobre a ingestão alimentar relativa quando comparados os grupos C_{NEO} e F_{NEO} (C_{NEO} $3,01 \pm 0,17$ vs F_{NEO} $3,36 \pm 0,22$; $P= 0,222$) tratados

no período neonatal. Após receberem dose aguda de fluoxetina os animais do grupo C_{NEO+FA} apresentaram redução no consumo alimentar quando comparados ao seu controle ($C_{NEO}=3,01 \pm 0,17$ vs $C_{NEO+FA} = 2,31 \pm 0,21$; $P = 0,0142$) e o grupo F_{NEO+FA} não apresentou nenhuma diferença significativa ($F_{NEO}=3,36 \pm 0,22$ vs $F_{NEO+FA} = 3,3,7 \pm 0,26$; $P = 0,9767$) (Figura 3).

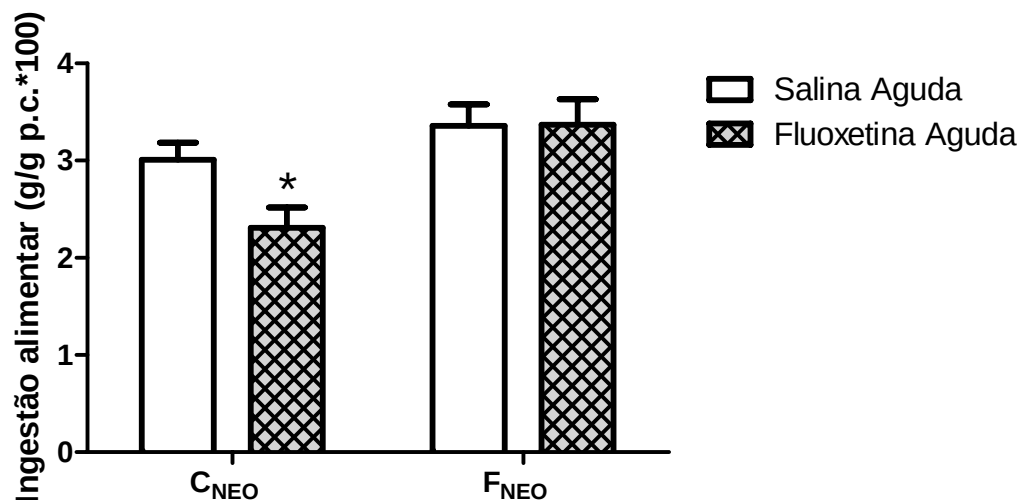


Figura 3- Efeito do tratamento com dose aguda de fluoxetina ou salina sobre a ingestão relativa (g/g pc*100) em ratos com 40 e 41 dias de vida. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina ($F_{NEO} = 10\text{mg/Kg p.c., sc; n} = 18$) ou salina ($C_{NEO} = 0,9\% \text{ NaCl } 10\text{ml/kg p.c., sc; n} = 18$) do 1 ° ao 21 ° dia de vida. Os grupos experimentais receberam dose aguda de fluoxetina (C_{NEO+FA} ; $F_{NEO+FA} = 10 \text{ mg / kg p.c., sc, n}=18$) uma hora antes da avaliação aos 41 dias de vida. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. * Significa diferença entre

4. Estudo da Sequência Comportamental de Saciedade

Nas avaliações da SCS foram observadas nos grupos C_{NEO} , F_{NEO} , C_{NEO+FA} e F_{NEO+FA} a progressão dos comportamentos de alimentação, limpeza e descanso, sem interrupção da sequência comportamental. Cada período de 5min foi quantificado para a duração de cada comportamento não havendo diferença entre os grupos experimentais nos 12 períodos de avaliação. O ponto de saciedade ocorreu em 34 min no grupo C_{NEO} e 30min no grupo F_{NEO} . Analisando o efeito do tratamento neonatal observamos uma leve antecipação no desencadeamento da saciedade no grupo F_{NEO} em comparação ao grupo C_{NEO} . Após dose aguda de fluoxetina nos grupos C_{NEO} e F_{NEO} o ponto de saciedade ocorreu em 28min no grupo C_{NEO+FA} e em 35min no grupo F_{NEO+FA} . Quando comparamos o efeito do tratamento agudo com fluoxetina o grupo C_{NEO+FA} apresentou antecipação na saciedade e o grupo F_{NEO+FA} um

pequeno retardo quando comparado aos seus respectivos controles, C_{NEO} e F_{NEO} (Figura 4). Durante o período total da SCS, os animais dos grupos C_{NEO} e F_{NEO} não apresentaram diferenças nos tempos dos comportamentos. Quando foi administrada a dose aguda de fluoxetina em ambos grupos os animais do grupo C_{NEO+FA} quando comparado ao C_{NEO} mostraram um aumento no período de descanso e redução em sua atividade (Tabela 1).

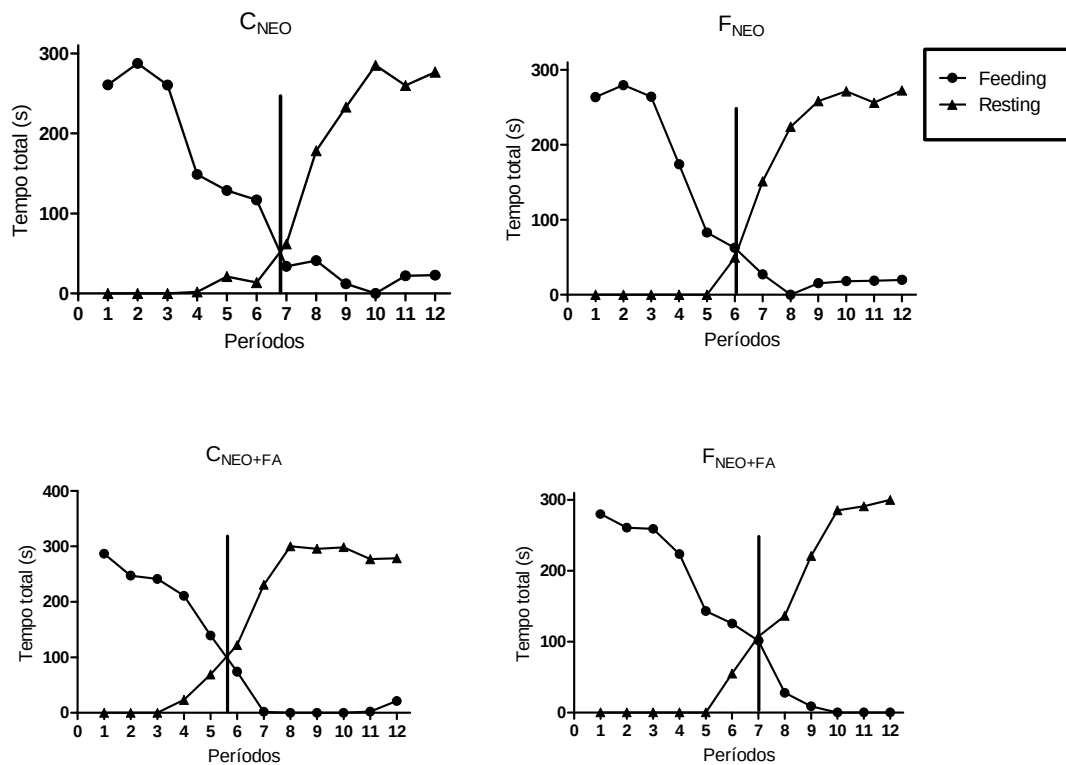


Figura 4- Efeito da manipulação farmacológica sobre a sequência comportamental de saciedade em ratos com 40 e 41 dias de vida. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina ($F_{NEO}=10\text{mg/Kg p.c., sc; n}=13$) ou salina ($C_{NEO}= 0,9\% \text{ NaCl } 10\text{ml/kg p.c., sc; n}=13$) do 1º ao 21º dia de vida. Os grupos C_{NEO} e F_{NEO} receberam dose aguda de fluoxetina (C_{NEO+FA} ; $F_{NEO+FA}=10 \text{ mg / kg pc., sc, n}=13$) uma hora antes da avaliação aos 41 dias de vida. O ponto de transição entre o comportamento de alimentação e descanso é mostrado por intercessão de uma linha vertical. Os dados estão expressos como média.

Tabela 1. Efeito do tratamento com fluoxetina em dose crônica ou aguda sobre os parâmetros avaliados durante a sequência comportamental de saciedade.

	C _{NEO}	F _{NEO}	P	C _{NEO+FA}	P	F _{NEO+FA}	P
Duração alimentação (s)	1336,77 ± 84,63	1226,47 ± 58,6	0,284	1225,93 ± 74,0	0,332	1341,44 ± 118,32	0,391
Duração limpeza (s)	166,62 ± 45,6	163,07 ± 27,45	0,711	90,36 ± 10,35	0,057	96,22 ± 28,24	0,101
Duração descanso (s)	1342,21 ± 80,23	1482,8 ± 89,99	0,253	1895,2 ± 85,33 ^b	<0,0001	1163,61 ± 175,91	0,117
Duração atividade (s)	671,33 ± 36,4	665,36 ± 44,07	0,919	388,5 ± 32,93 ^b	<0,0001	657,33 ± 59,27	0,914
Taxa local alimentação (g/min)	12,46 ± 0,5	15,32 ± 0,57 ^a	0,001	9,83 ± 0,42 ^{bb}	0,0005	14,99 ± 1,39	0,818
Taxa global alimentação (g/min)	4,8 ± 0,27	5,07 ± 0,21	0,434	3,5 ± 0,22 ^b	0,0012	5,73 ± 0,56	0,252

Os dados são apresentados como média ± EPM. ^a Indica a diferença entre os grupos tratados no período neonatal (C_{NEO} e F_{NEO}); Os grupos C_{NEO+FA} e F_{NEO+FA} foram comparados aos seus controles C_{NEO} e F_{NEO} respectivamente. ^b Indicam diferença entre os grupos C_{NEO} e C_{NEO+FA}.

5. Teste de ingestão alimentar com dieta hiperlipídica

No teste de ingestão alimentar com dieta hiperlipídica observamos diferença significativa entre C_{NEO} e F_{NEO} no 37^o (C_{NEO}= 1,86 ± 0,28 vs F_{NEO}= 3,82 ± 0,51), 38^o (C_{NEO}= 2,09 ± 0,19

vs $F_{NEO} = 4,57 \pm 0,57$) e 39^o ($C_{NEO} = 3,18 \pm 0,20$ vs $F_{NEO} = 4,85 \pm 0,38$) dia. Os animais C_{NEO} e F_{NEO} apresentaram mesma ingestão alimentar no 40^o dia pós natal ($C_{NEO} = 3,44 \pm 0,35$; $F_{NEO} = 4,49 \pm 0,46$).

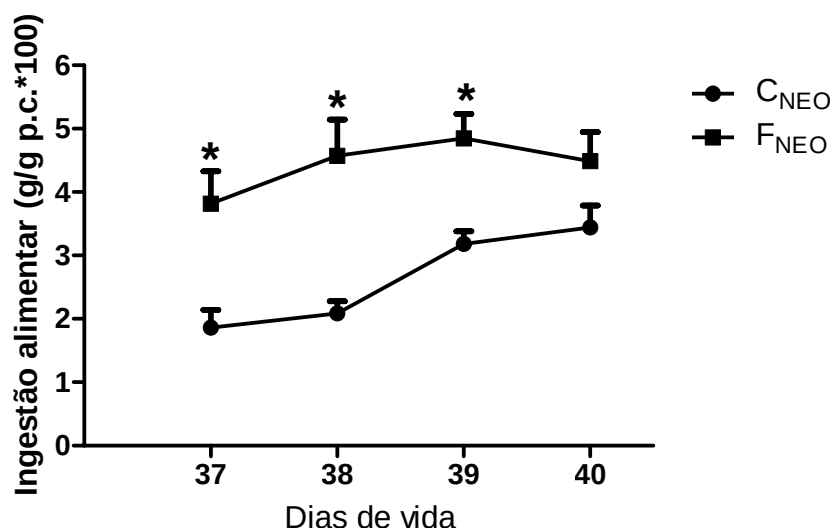


Figura 5- Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina sobre o consumo alimentar relativo (g/g pc*100) após oferta de dieta hiperlipídica em ratos dos 37 aos 40 dias de vida. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina ($F_{NEO} = 10\text{mg/Kg p.c., sc; } n = 9$) ou salina ($C_{NEO} = 0,9\%$ NaCl 10ml/kg p.c., sc; $n = 8$) do 1^o ao 21^o dia de vida. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. (* $p < 0,05$).

6. Percentual calórico de ingestão com dieta padrão, padrão modificada e dieta hiperlipídica

Nesta análise os animais C_{NEO} e F_{NEO} do grupo Labina Hidratada (C_{NEO}= 1,625 ± 0,083; F_{NEO}= 1,56 ± 0,087) apresentaram redução no percentual calórico ingerido em relação aos animais C_{NEO} e F_{NEO} do grupo Labina (C_{NEO}= 10,79 ± 0,62; F_{NEO}= 11,47 ± 0,60) respectivamente. Os animais C_{NEO} e F_{NEO} do grupo dieta Hiperlipídica (C_{NEO}= 14,3 ± 0,143; F_{NEO}= 18,44 ± 1,89) apresentaram maior percentual calórico ingerido comparados aos animais C_{NEO} e F_{NEO} do grupo Labina respectivamente.

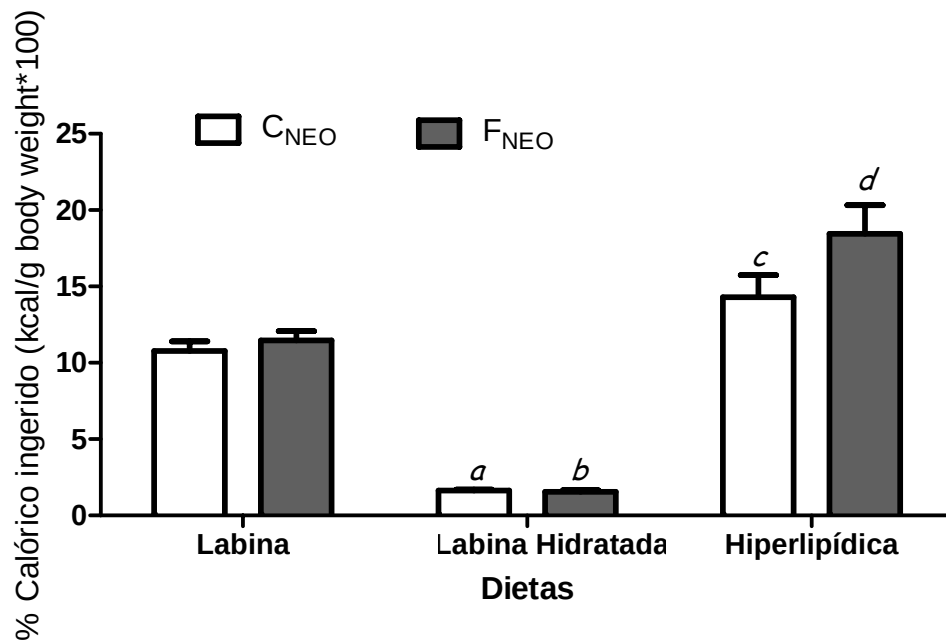


Figura 6- Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina sobre o percentual calórico relativo (%Calórico/g pc*100) ingerido após oferta de dieta padrão de biotério (LABINA, n=18), dieta padrão hidratada (n=14) e dieta hiperlipídica (n=8) em ratos com 40 dias de vida. Os dados estão apresentados como média ± EPM. (a e b indica diferença comparativa entre animais C_{NEO} e F_{NEO} do grupo Labina hidratada aos do grupo Labina respectivamente, p>0,0001; c e d indica diferença entre animais C_{NEO} (p=0,138) e F_{NEO} (p=0,0002) do grupo Hiperlipídica aos do grupo Labina respectivamente. Two-Way ANOVA.

7. Teste de ingestão após jejum de 12 horas

Após jejum de 12 horas os animais do grupo C_{NEO} quando coparado ao grupo Basal- C_{NEO} aumentou o consumo de alimento após 2 (Basal-C_{NEO}=1,76 ± 0,13 vs Jejum-C_{NEO} 2,67 ± 0,19; P=0,0027), 4 (Basal-C_{NEO}= 3,48 ± 0,19 vs Jejum-C_{NEO} 4,37± 0,29; P=0,028) e 12 h (Basal-C_{NEO}= 5,52 ± 0,45 vs Jejum-C_{NEO} 7,06 ± 0,26; P=0,0142) de oferta de alimento. O grupo Jejum-F_{NEO} quando comparado ao grupo Basal-F_{NEO} apresentou aumento significativo apenas 2 (Basal-F_{NEO}=1,66 ± 0,26 vs Jejum-F_{NEO} 4,13 ± 0,16;P<0,0001) e 4h (Basal-F_{NEO}= 3,37 ± 0,31vs Jejum-F_{NEO} 4,99 ± 0,37; P=0,0057) após oferta de alimento. No entanto, a exposição ao jejum promoveu um aumento mais substancial no grupo F_{NEO} quando comparado ao grupo C_{NEO} nas duas primeiras horas de avaliação (C_{NEO}= 2,67 ± 0,19 vs F_{NEO}= 4,13 ± 0,16;P<0,0001).

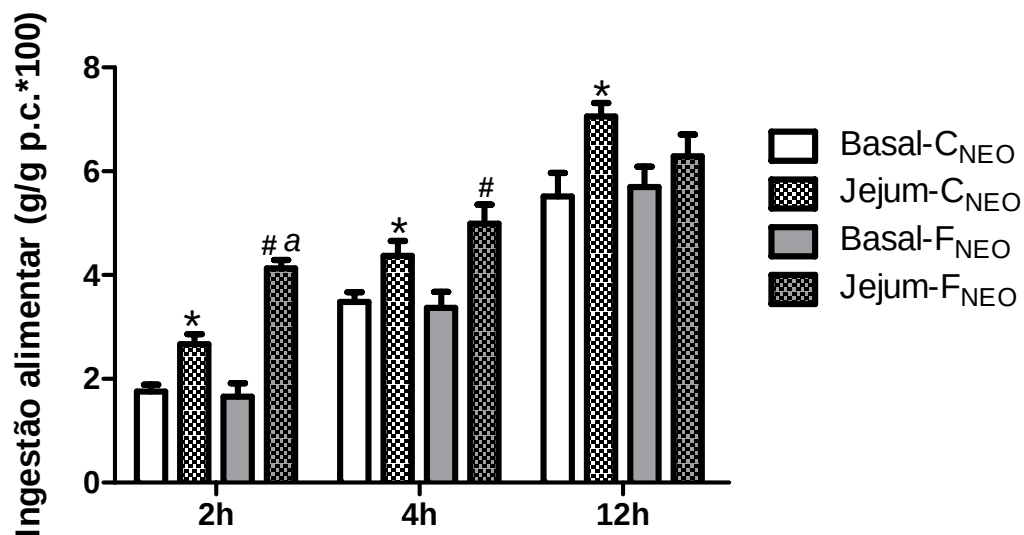


Figura 7- Efeito do jejum de 12 horas sobre o consumo alimentar relativo (g/g pc*100) após oferta de dieta padrão em ratos com 49 dias de vida. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina (F_{NEO} = 10mg/Kg p.c., sc; n = 7) ou salina (C_{NEO} = 0,9% NaCl 10ml/kg p.c., sc; n=7) do 1 ° ao 21 ° dia de vida. Os dados estão apresentados como média ± EPM. (*indicam diferença entre o grupo Basal e Jejum C_{NEO}; # indicam diferença entre o grupo Basal e Jejum F_{NEO}; a indica diferença entre os grupos Jejum-C_{NEO} e Jejum-F_{NEO}). Two-Way ANOVA.

Discussão

O objetivo do nosso estudo foi investigar os efeitos da exposição crônica a fluoxetina durante a lactação, sobre o controle do comportamento alimentar em ratos machos. A partir dos resultados obtidos, confirmamos a hipótese de que o sistema serotoninérgico se torna vulnerável a influências neuroquímica durante o desenvolvimento se adaptando a novas condições que podem refletir em alterações tardias sobre o comportamento alimentar. Apesar de algumas diferenças em respeito às condições de tratamento e do fármaco utilizado, nossos resultados corroboram com estudos prévios de outros grupos que utilizaram antidepressivos em fases precoces (8-21 dia de vida) e observaram na vida adulta um padrão de comportamento adaptado mesmo após a descontinuidade da droga (Mirmiran, van de Poll et al. 1981; Hilakivi, Sinclair et al. 1984; Hilakivi, Hilakivi et al. 1987; Hartley, Neill et al. 1990; Hansen, Sanchez et al. 1997; Ansorge, Zhou et al. 2004; Maciag, Simpson et al. 2006; Harris, Maciag et al. 2012).

Em nosso estudo, quando utilizado dieta padrão de laboratório, não observamos nenhuma alteração significativa sobre o consumo alimentar no período neonatal (7^o, 14^o e 21^o dias) entre os grupos experimentais. Resultado semelhante foi encontrado nos testes de ingestão na fase pós desmame, corroborando com estudo de Ansorge e colaboradores (2004) onde observaram que a ingestão alimentar, após exposição crônica com fluoxetina do 4^o ao 21^o dia pós natal, permaneceu inalterada. Resultado contrário foi obtido por outro estudo utilizando clomipramina do 8^o ao 21^o dia de vida onde foi observado redução na ingestão de alimentos (Vijayakumar and Meti 1999). Entretanto, vale ressaltar, que em nosso estudo iniciamos o tratamento com o ISRS a partir do primeiro dia de vida. Logo temos sete dias a mais de tratamento crônico com o antidepressivo, o que possivelmente induziu uma adaptação comportamental diferente do observado pelo grupo citado acima. Além disto a clomipramina é um antidepressivo tricíclico que também apresenta uma moderada seletividade para sítios de recaptação de noradrenalina (Hrdina, Foy et al. 1990). Todavia, podemos sugerir que o tratamento com ISRS foi capaz de suprimir a ação da serotonina (5-HT) sobre a redução da ingestão alimentar mesmo após a descontinuidade do tratamento.

Avaliando ainda o efeito da fluoxetina sobre a ingestão alimentar, administramos fluoxetina de forma aguda nos grupos C_{NEO} e F_{NEO} na mesma concentração do tratamento crônico (10 mg/Kg p.c.). Nossos resultados mostraram que administração aguda com fluoxetina promoveu redução da ingestão alimentar no grupo controle, ao passo que, não obteve nenhum efeito nos animais expostos a fluoxetina neonatal crônica. É possível que o tratamento crônico com fluoxetina promoveu alterações em receptores envolvidos neste comportamento. Estudos prévios relatam que exposição à fármacos que bloqueiam a proteína

de transporte da 5-HT, em período crônico, é capaz de promover uma redução na sensibilidade dos receptores serotoninérgicos pré e pós-sinápticos em regiões específicas do sistema nervoso (Newman, Gur et al. 2000; Vidal, Valdizan et al. 2009). Dentre os estudos, Newman e colaboradores (2000) observaram que os receptores 5-HT_{1B} pré sinápticos do hipotálamo, envolvidos na redução de ingestão de alimentos, estavam menos sensíveis para aumentar as concentrações de 5-HT.

Na literatura já foi descrito que em animais adultos, a utilização de inibidores de recaptação da 5-HT (citalopram, sertralina e fluoxetina), bem como a administração de 5-HT ou do seu precursor, o aminoácido triptofano, promovem redução na ingestão alimentar (Blundell and Latham 1979; McGuirk, Muscat et al. 1992). Ao contrário, a utilização de drogas que depletam a 5-HT cerebral (p-cloroanfetamina) é capaz de promover um aumento no consumo de alimentos após 24h de aplicação intraperitoneal (Stein, Wayner et al. 1978). A maturação do sistema nervoso é contínua do período pré-natal até o 40º dia pós-natal, fazendo destes períodos vulneráveis a variações neurobiológica (Hansson, Mezey et al. 1998; Zhou, Sari et al. 2000). Desta forma, é muito provável que o período de manipulação com antidepressivos seja determinante para o desenvolvimento de comportamentos adaptativos específicos. Os mecanismos envolvidos nessas adaptações comportamentais, devido à tratamento com antidepressivos, ainda não foram totalmente elucidados. Entretanto, alguns estudos sugerem que após exposição neonatal (8º - 21º dia) com clomipramina, zimelidine, ou desipramina, o níveis de 5-HT extracelular no hipotálamo encontram-se reduzidos (Hilakivi, Stenberg et al. 1987; Feenstra, van Galen et al. 1996; Vijayakumar and Meti 1999), e que os níveis do RNAmensageiro (RNAm) da proteína transportadora de 5-HT (SERT) no núcleo dorsal da rafe em ratos adultos também reduzem (Hansen and Mikkelsen 1998). Esses estudos juntamente aos nossos resultados sugerem que a exposição neonatal à ISRS pode produzir alterações neuroquímicas e funcionais em componentes serotoninérgicos que refletem em alterações comportamentais na vida adulta.

Diferente dos resultados de ingestão com dieta padrão, os animais tratados com fluoxetina neonatal quando expostos a um ambiente diferente do habitual (estimulado com jejum e dieta hiperlipídica), apresentaram aumento significativo no percentual calórico ingerido. A exposição a novos ambientes (estresse, dietas hipercalóricas, sedentarismo) é prática frequente nos dias atuais. A industrialização e urbanização trouxeram o aumento da ingestão de calorias e diminuição da atividade física. Em conjunto, o ritmo de vida exigido atualmente, influencia o ritmo e a qualidade alimentar (Tardido and Falcão 2006; Boyland, Harrold et al. 2011). No entanto, ambos grupos experimentais aumentaram o consumo de

calorias quando expostos ao jejum e dieta hiperlipídica, porém a exposição com fluoxetina crônica promove um consumo alimentar inicial maior. É conhecido a maior preferência dos animais controle pelas dietas ricas em gordura (Prats, Monfar et al. 1989). Nosso trabalho vem mostrar que a exposição a ISRS durante o desenvolvimento pode alterar o padrão alimentar quando o organismo é exposto a diferentes estímulos (jejum ou dieta hiperlipídica).

A utilização de ração modificada no teste de ingestão não promoveu diferenças sobre o percentual calórico ingerido nos animais expostos a fluoxetina. No entanto comparando os valores àquele ingerido no teste com labina padrão (seca) observamos uma significativa redução. A utilização desta dieta em testes comportamentais elimina a necessidade da privação alimentar além de aumentar o percentual calórico ingerido em ratos ingênuos (Ishii, Blundell et al. 2003). Por isso utilizamos esta dieta em nosso estudo, para certificarmos que a maior preferência seria pela dieta rica em gordura e não simplesmente pela experiência de um novo sabor e textura de alimento, como promovido pelas dietas padrão modificada e hiperlipídica. Até quanto sabemos, não existem relatos semelhantes na literatura o que torna nosso estudo ainda mais interessante e relevante no tocante a saúde pública, visto que há um grande número de ocorrência de depressão pré e pós-parto. Desta forma, a utilização de antidepressivos no período de gestação e amamentação pode, através da placenta e leite materno, expor os bebês a doses consideráveis deste fármaco que possam promover alterações no sistema nervoso refletindo em um possível padrão alimentar alterado na vida adulta.

Em concordância com estudos utilizando o mesmo modelo experimental, a fluoxetina crônica neonatal reduziu o peso corporal ao longo da lactação, durante o período pré-desmame e na vida adulta (Silva, Goncalves et al. 2010). Outros estudos utilizando o antidepressivos citalopram (10 mg/Kg, pc, sc), também promoveu redução do peso corporal (Magalhaes, de Lima et al. 2006). Os mecanismos responsáveis pela redução do peso não estão somente relacionados a redução da ingestão alimentar. Em um estudo utilizando o antidepressivo D-fenfluramina (inibidor de recaptação e estimulador da liberação de 5-HT) foi observado um aumento na expressão do proopiomelanocortina (POMC) (Heisler, Cowley et al. 2002). O neuropeptídeo POMC é sintetizado em núcleos hipotalâmicos que emitem projeções para neurônios pré-ganglionares, localizados na coluna mediolateral da medula espinal, e estes se comunicam com o músculo esquelético por meio de fibras pós-ganglionares simpáticas (Cechetto and Saper 1988; Broberger 2005). Quando esta via hipotalâmica é estimulada pode gerar mudanças no metabolismo energético do músculo esquelético resultando em maior gasto de energia e redução do peso corporal (Cha, Hu et al. 2005). Esses achados juntamente com os nossos dados dão subsídios a novas investigações a cerca dos

mecanismos envolvidos na redução do peso corpóreo. Além disto, nossos achados corroboram com relatos que mostram que os mecanismos do controle alimentar, de ingestão e gasto energéticos podem caminhar por vias independentes quando o organismo sofre intervenções em períodos críticos do desenvolvimento (Orozco-Solis, Lopes de Souza et al. 2009).

O comportamento alimentar se traduz pela escolha do alimento, início e término da alimentação, na frequência, no tempo e tamanho da refeição (Blundell 1991). A sequência comportamental de saciedade (SCS) é um conceito que descreve a estrutura normal do comportamento alimentar em roedores (Antin, Gibbs et al. 1975). Neste modelo a integridade estrutural da SCS foi totalmente preservada, mas os animais tratados apresentaram uma antecipação da saciedade devido a uma aumento da velocidade de ingestão comparado ao grupo controle. A saciedade é mediada pela ação da 5-HT nos receptores 5-HT_{1B} e 2C a qual controla o tamanho e duração das refeições respectivamente. Estudos utilizando o antidepressivo clomipramina no período neonatal (8^o - 21^o dia), produziu em ratos adultos uma redução dos níveis do RNAm da SERT no núcleo dorsal da rafe, por mecanismos ainda não conhecidos (Hansen and Mikkelsen 1998). Mas, além disso, há evidências que a ausência de expressão SERT é acompanhada por redução na densidade de receptores 5HT_{1A} no núcleo dorsal da rafe, bem como aumento na densidade de receptores 5HT_{2A} e 5HT_{2C} na amígdala e no plexo coróide (Li, Chlan-Fourney et al. 2000). No entanto, não se sabe se estes efeitos são o resultado da adaptação do adulto para a ausência de SERT ou se devido a alterações nos níveis de serotonina extracelular durante períodos críticos de desenvolvimento. E também não é conhecido se essas alterações em componentes serotoninérgicos se estendem a outras regiões encefálicas, como o hipotálamo, região envolvida nos estágios de fome e saciedade. Esses relatos somados aos nossos resultados podem nortear novas pesquisas para clarear os mecanismos responsáveis pela antecipação da saciedade sem redução da ingestão alimentar.

Com os nossos resultados podemos concluir que a exposição neonatal ao ISRS, promove alterações adaptativas nos comportamentos alimentar em ratos machos e que esses achados indicam um papel crítico da serotonina no amadurecimento de sistemas encefálicos que modulam a função alimentar na idade adulta.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) por tornarem possível a realização deste estudo.

Referências

- Ansorge, M. S., M. Zhou, et al. (2004). "Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice." *Science* **306**(5697): 879-881.
- Antin, J., J. Gibbs, et al. (1975). "Cholecystokinin elicits the complete behavioral sequence of satiety in rats." *J Comp Physiol Psychol* **89**(7): 784-790.
- Blundell, J. (1991). "Pharmacological approaches to appetite suppression." *Trends Pharmacol Sci* **12**(4): 147-157.
- Blundell, J. E. and C. J. Latham (1979). "Serotonergic influences on food intake: effect of 5-hydroxytryptophan on parameters of feeding behaviour in deprived and free-feeding rats." *Pharmacol Biochem Behav* **11**(4): 431-437.
- Boyland, E. J., J. A. Harrold, et al. (2011). "Food commercials increase preference for energy-dense foods, particularly in children who watch more television." *Pediatrics* **128**(1): e93-100.
- Broberger, C. (2005). "Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks." *J Intern Med* **258**(4): 301-327.
- Cechetto, D. F. and C. B. Saper (1988). "Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat." *J Comp Neurol* **272**(4): 579-604.
- Cha, S. H., Z. Hu, et al. (2005). "Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(41): 14557-14562.
- Deiro, T. C., J. Carvalho, et al. (2008). "Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats." *Arq Neuropsiquiatr* **66**(3B): 736-740.
- Dobbing, J. (1974). "The later growth of the brain and its vulnerability." *Pediatrics* **53**(1): 2-6.
- Feenstra, M. G., H. van Galen, et al. (1996). "Decreased hypothalamic serotonin levels in adult rats treated neonatally with clomipramine." *Pharmacol Biochem Behav* **55**(4): 647-652.
- Halford, J. C., S. C. Wanninayake, et al. (1998). "Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake." *Pharmacol Biochem Behav* **61**(2): 159-168.
- Hall, W. G. (1977). "Suckling behavior and intake control in the developing rat pup." *Journal of Comparative Physiological Psychology* **91**(6).
- Hansen, H. H. and J. D. Mikkelsen (1998). "Long-term effects on serotonin transporter mRNA expression of chronic neonatal exposure to a serotonin reuptake inhibitor." *Eur J Pharmacol* **352**(2-3): 307-315.
- Hansen, H. H., C. Sanchez, et al. (1997). "Neonatal administration of the selective serotonin reuptake inhibitor Lu 10-134-C increases forced swimming-induced immobility in adult rats: a putative animal model of depression?" *J Pharmacol Exp Ther* **283**(3): 1333-1341.
- Hansson, S. R., E. Mezey, et al. (1998). "Serotonin transporter messenger RNA in the developing rat brain: early expression in serotonergic neurons and transient expression in non-serotonergic neurons." *Neuroscience* **83**(4): 1185-1201.
- Harris, S. S., D. Maciag, et al. (2012). "Dose-dependent effects of neonatal SSRI exposure on adult behavior in the rat." *Brain Res* **1429**: 52-60.
- Hartley, P., D. Neill, et al. (1990). "Procedure- and age-dependent hyperactivity in a new animal model of endogenous depression." *Neurosci Biobehav Rev* **14**(1): 69-72.
- Heisler, L. K., M. A. Cowley, et al. (2002). "Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine." *Science* **297**(5581): 609-611.

- Hilakivi, L. A., I. Hilakivi, et al. (1987). "Neonatal antidepressant administration suppresses concurrent active (REM) sleep and increases adult alcohol consumption in rats." Alcohol Alcohol Suppl **1**: 339-343.
- Hilakivi, L. A., J. D. Sinclair, et al. (1984). "Effects of neonatal treatment with clomipramine on adult ethanol related behavior in the rat." Brain Res **317**(1): 129-132.
- Hilakivi, L. A., D. Stenberg, et al. (1987). "Neonatal desipramine or zimeldine treatment causes long-lasting changes in brain monoaminergic systems and alcohol related behavior in rats." Psychopharmacology (Berl) **91**(4): 403-409.
- Houpt, K. A. and T. R. Houpt (1975). "Effects of gastric loads and food deprivation on subsequent food intake in suckling rats." J Comp Physiol Psychol **88**(2): 764-772.
- Hrdina, P. D., B. Foy, et al. (1990). "Antidepressant binding sites in brain: autoradiographic comparison of [3H]paroxetine and [3H]imipramine localization and relationship to serotonin transporter." J Pharmacol Exp Ther **252**(1): 410-418.
- Ishii, Y., J. E. Blundell, et al. (2003). "Effects of systematic variation in presatiation and fasting on the behavioural satiety sequence in male rats." Physiol Behav **79**(2): 227-238.
- Ishii, Y., J. E. Blundell, et al. (2003). "Palatability, food intake and the behavioural satiety sequence in male rats." Physiol Behav **80**(1): 37-47.
- Lauder, J. M. (1990). "Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal." Ann N Y Acad Sci **600**: 297-313; discussion 314.
- Lauder, J. M. and H. Krebs (1978). "Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis." Dev Neurosci **1**(1): 15-30.
- Li, X. M., J. Chlan-Fourney, et al. (2000). "Antidepressants upregulate messenger RNA levels of the neuroprotective enzyme superoxide dismutase (SOD1)." J Psychiatry Neurosci **25**(1): 43-47.
- Maciag, D., K. L. Simpson, et al. (2006). "Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry." Neuropsychopharmacology **31**(1): 47-57.
- Magalhaes, C. P., L. O. de Lima, et al. (2006). "[Neonatal treatment effect with selective inhibitor of 5-HT recapture on [corrected] the cranium-encephalic anatomic development]." Arq Neuropsiquiatr **64**(4): 990-993.
- McGuirk, J., R. Muscat, et al. (1992). "Effects of the 5-HT uptake inhibitors, femoxetine and paroxetine, and a 5-HT_{1A/B} agonist, eltoprazine, on the behavioural satiety sequence." Pharmacol Biochem Behav **41**(4): 801-805.
- Mirmiran, M., N. E. van de Poll, et al. (1981). "Suppression of active sleep by chronic treatment with chlorimipramine during early postnatal development: effects upon adult sleep and behavior in the rat." Brain Res **204**(1): 129-146.
- Newman, M. E., E. Gur, et al. (2000). "Chronic clomipramine alters presynaptic 5-HT(1B) and postsynaptic 5-HT(1A) receptor sensitivity in rat hypothalamus and hippocampus, respectively." Neuropharmacology **39**(12): 2309-2317.
- Orozco-Solis, R., S. Lopes de Souza, et al. (2009). "Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding." Physiol Behav **96**(3): 481-492.
- Patil, A. S., J. A. Kuller, et al. (2011). "Antidepressants in pregnancy: a review of commonly prescribed medications." Obstet Gynecol Surv **66**(12): 777-787.
- Prats, E., M. Monfar, et al. (1989). "Energy intake of rats fed a cafeteria diet." Physiol Behav **45**(2): 263-272.
- Sanchez, S., C. Sanchez, et al. (2008). "Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of rats." Mol Cell Biochem **317**(1-2): 105-111.
- Silva, C. M., L. Goncalves, et al. (2010). "Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats." Neurosci Lett **483**(3): 179-183.
- Stein, J. M., M. J. Wayner, et al. (1978). "Short- and long-term effects of para-chloroamphetamine on ingestive behavior." Pharmacol Biochem Behav **9**(1): 115-122.
- Tardido, A. P. and M. C. Falcão (2006). "O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade." Revista Brasileira de Nutrição Clínica **21**(2): 117-124.

- Vidal, R., E. M. Valdizan, et al. (2009). "Long-term treatment with fluoxetine induces desensitization of 5-HT₄ receptor-dependent signalling and functionality in rat brain." J Neurochem **110**(3): 1120-1127.
- Vijayakumar, M. and B. L. Meti (1999). "Alterations in the levels of monoamines in discrete brain regions of clomipramine-induced animal model of endogenous depression." Neurochem Res **24**(3): 345-349.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (1991). "Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology." Pharmacol Rev **43**(4): 553-561.
- Whitaker-Azmitia, P. M., R. Murphy, et al. (1990). "Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology." Brain Res **528**(1): 155-158.
- Zhou, F. C., Y. Sari, et al. (2000). "Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain." Brain Res Dev Brain Res **119**(1): 33-45.

6.2 ARTIGO ORIGINAL 2

AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL E DO ESTADO OXIDATIVO DO HIPOTÁLAMO E HIPOCAMPO DE RATAS APÓS EXPOSIÇÃO NEONATAL CRÔNICA COM FLUOXETINA

Resumo

Atualmente existe um grande numero de gestantes e lactantes que apresentam distúrbio psíquicos que as levam a utilizar antidepressivos. Entretanto, estudos recentes demonstraram que uma parte considerável de recém-nascidos de mães que tomaram antidepressivos durante a gravidez apresentam sinais claros da retirada do fármaco, indicando que estas drogas podem penetrar no cérebro fetal. O cérebro é particularmente vulnerável as manipulações exógena por ser altamente sensível ao estresse oxidativo, devido aos baixos níveis de antioxidantes, altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e da grande necessidade de oxigênio nas reações neuro-químicas. Numerosos estudos vem demonstrando um envolvimento direto entre o estresse oxidativo e os comportamentos alimentares e de ansiedade. No presente estudo procuramos relacionar o efeito crônico da inibição da recaptação de serotonina durante a lactação com os comportamentos alimentares e de ansiedade, e biomarcadores de estresse oxidativo no hipotálamo e hipocampo. Os filhotes fêmeas da linhagem *Wistar* receberam injeção subcutânea diária de fluoxetina (F_{NEO} , 10 mg/kg, p.c, Grupo Tratado) e solução veículo da diluição do fármaco (C_{NEO} , 0,9% NaCl, p.c, Grupo Controle) às 7:00 h (ciclo escuro), do 1º ao 21º dia pós-natal. Em relação a ingestão alimentar não observamos nenhuma diferença entre os grupos C_{NEO} ($2,76 \pm 0,19$ g/g pc*100) e F_{NEO} ($2,85 \pm 0,26$ g/g pc*100). Já o tratamento crônico com fluoxetina no período neonatal aumentou o número de entradas ($C_{NEO} = 8,7 \pm 1,2$; $F_{NEO} = 11,6 \pm 0,20$; $P=0,0299$) e o tempo gasto ($C_{NEO} = 89,6 \pm 14,1$; $F_{NEO} = 124,5 \pm 5,4$; $P=0,0345$) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, o que sugere um padrão de comportamento de diminuição da ansiedade no grupo F_{NEO} . Quando foi analisado o biomarcador de estresse oxidativo observamos que o grupo F_{NEO} ($0,12 \pm 0,01$ nmol/mg prot) apresentou uma redução dos níveis de malondialdeído no hipocampo quando comparado ao grupo C_{NEO} ($0,28 \pm 0,05$ nmol/mg prot) e nenhuma diferença significativa foi encontrada no hipotálamo entre os grupos ($C_{NEO} = 0,30 \pm 0,05$ nmol/mg prot; $F_{NEO} = 0,39 \pm 0,07$ nmol/mg prot) sugerindo um menor estresse oxidativo no hipocampo desses animais. Quando avaliamos a atividade da enzima antioxidante catalase

observamos que o grupo F_{NEO} apresentou um aumento na atividade da enzima no hipotálamo ($C_{NEO} = 7,41 \pm 1,08$ nmol/min/mg prot; $F_{NEO} = 33,14 \pm 5,45$ nmol/min/mg prot) e hipocampo ($C_{NEO} = 87,92 \pm 12,19$ nmol/min/mg prot; $F_{NEO} = 150,3 \pm 9,48$ nmol/min/mg prot) quando comparado ao grupo C_{NEO} . Através dos nossos resultados, podemos concluir que a exposição neonatal ao ISRS, promove alterações adaptativas nos comportamentos alimentar e de ansiedade e que a ação da fluoxetina nessas regiões do cérebro atuou reduzindo os níveis de estresse oxidativo em ratas fêmea, trazendo mais indícios de interações complexas entre estresse oxidativo e comportamentos alimentares e de ansiedade.

Palavras chave: serotonina, estresse oxidativo, ansiedade, ingestão alimentar, sistema nervoso

Abstract:

Currently a large number of pregnant and lactating women who have mental disorders use antidepressants. However, recent studies have shown that a considerable proportion of infants born to mothers who took antidepressants during pregnancy show clear signs of drug withdrawal, indicating that these drugs can act in fetal brain. The brain is particularly vulnerable to manipulation to be highly sensitive to oxidative stress due to low levels of antioxidants, high levels of polyunsaturated fatty acids and the great need for oxygen in the biochemical reactions. Numerous studies have demonstrated a direct involvement of oxidative stress and eating behaviors and anxiety. In this study we try to relate the effect of chronic inhibition of serotonin reuptake during lactation with the feeding behavior and anxiety, and biomarkers of oxidative stress in the hypothalamus and hippocampus. The Wistar female pups received daily subcutaneous injection of fluoxetine (F_{NEO} , 10 mg / kg, b.w, Treated group) and vehicle solution dilution of the drug (C_{NEO} , 0.9% NaCl, b.w, Control group) at 7:00 h (dark cycle), from the 1st to 21st day of life. Regarding food intake we did not observe any difference between groups: C_{NEO} (2.76 ± 0.19 g/g b.w*100) and F_{NEO} (2.85 ± 0.26 g/g b.w*100). Although chronic treatment with fluoxetine during the neonatal period increased the number of entries ($C_{NEO} = 8,7 \pm 1,2$; $F_{NEO} = 11,6 \pm 0,20$; $P=0,0299$) time spent ($C_{NEO} = 89,6 \pm 14,1$; $F_{NEO} = 124,5 \pm 5,4$; $P=0,0345$) in the open arms of elevated plus maze, suggesting a decreased anxiety in the group F_{NEO} . When we analyzed the oxidative stress biomarker we observe that the F_{NEO} group showed a reduction (0.12 ± 0.01 nmol/mg prot) of malondialdehyde levels in the hippocampus when compared to C_{NEO} (0.28 ± 0.05 nmol/mg prot) and no significant difference was found in the hypothalamus ($C_{NEO} = 0.30 \pm 0.05$

nmol/mg prot; $F_{\text{NEO}} = 0.39 + 0.07$ nmol/mg prot), suggesting a lower oxidative stress in the hippocampus of these animals. When evaluating the activity of the antioxidant enzyme-Catalase, we observed that the FNEO group showed an increase in enzyme activity in the hypothalamus ($C_{\text{NEO}} = 7.41 + 1.08$ nmol/min/mg prot; $F_{\text{NEO}} = 33.14 + 5.45$ nmol/min/mg prot) and hippocampus ($C_{\text{NEO}} = 87, 92 + 12.19$ nmol/min/mg prot; $F_{\text{NEO}} = 150.3 + 9.48$ nmol/min/mg prot) when compared to C_{NEO} . Our results suggest that neonatal exposure to SSRIs, promotes adaptive changes in eating behaviors and anxiety and that the action of fluoxetine in these brain regions served by reducing levels of oxidative stress in female rats, providing more evidence of the interactions between oxidative stress and eating behaviors and anxiety.

Keywords: serotonin, oxidative stress, anxiety, food intake, the nervous system

Introdução

Gravidez durante um tempo foi considerado um período de bem-estar emocional, reduzindo os eventos de desordens psiquiátricas (Kendell, Chalmers et al. 1987). Entretanto estudos atuais mostram que aproximadamente 20% das mulheres grávidas apresentam sintomas de depressão durante a gravidez em grau de severidade que as obrigam a utilizar antidepressivos (Patil, Kuller et al. 2011; Rayen, van den Hove et al. 2011). Pesquisa recente relata que uma parte considerável de recém-nascidos de mães que tomaram antidepressivos do tipo inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) durante a gravidez apresentam sinais claros da retirada do fármaco, indicando que estas drogas podem penetrar no cérebro fetal em níveis biologicamente significativos (Diav-Citrin and Ornoy 2012). Em estudos com roedores foi demonstrado que a exposição precoce a alguns antidepressivos pode resultar em anormalidades comportamentais e alterações nos índices de atividade monoaminérgica, mostrando-se persistentes na vida adulta (Mirmiran, van de Poll et al. 1981; Hilakivi, Sinclair et al. 1984; Hilakivi, Stenberg et al. 1987; Hansen, Sanchez et al. 1997; Ansorge, Zhou et al. 2004). A não presença de alterações comportamentais persistentes em ratos adultos expostos a doses e durações similares de antidepressivos, sugere que a resposta neurobiológicas a longo prazo aos antidepressivos difere marcadamente entre infância e idade adulta (Maciag, Simpson et al. 2006).

O sistema nervoso imaturo sofre mudanças notáveis na organização durante o desenvolvimento fetal e pós-natal. Estas mudanças criam potenciais "janelas" de vulnerabilidade seletiva a danos (Dobbing and Smart 1974). A plasticidade do sistema nervoso fetal e neonatal permite que o cérebro programe sua capacidade de resposta à estimulação futura com base em estímulos sensoriais durante períodos críticos do desenvolvimento. Ao mesmo tempo, isto deixa o organismo imaturo vulnerável a insultos que produzem teratologia comportamental, onde insultos inadequados causam permanentes mudanças no desempenho dos sistemas (Dobbing 1974).

Todos os comportamentos surgem da interação de processos neuroquímicos os quais se estabelecem por vias distintas. Estas vias são constituídas por estruturas celulares as quais necessitam de uma condição ótima para sua devida função. Sabe-se que o estresse oxidativo desempenha um papel importante no dano e morte celular (Trouche, Mias et al. 2010) o que possivelmente reflete sobre o estado comportamental. O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e os sistemas antioxidantes pode resultar em uma maior concentração das ERO promovendo o estresse oxidativo (Brand, Pamplona et al. 2002). Normalmente, cerca de 95 a 98% do oxigênio absorvido pelos organismos aeróbicos sofre a redução tetravalente, formando água na cadeia respiratória através do transporte de elétrons na mitocôndria (Gutteridge and Halliwell 1989). De forma inevitável em condições normais, 2 a 5% do oxigênio é reduzido univalentemente, produzindo intermediários altamente reativos, as ERO, onde as principais formas são: o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlet (1O_2) e o radical hidroxil ($HO\cdot$) que são combatidos pelo sistemas antioxidantes (Sies 1991). Os sistemas antioxidantes são constituídos por enzimas capazes de anular a ação oxidativas das ERO, as principais são: catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase (Marklund 1985).

Estudos prévios relacionando antidepressivos e estresse oxidativo mostram resultados conflitantes. Alguns estudos sugerem que os antidepressivos induzem a produção excessiva de radicais livres, mas apontam a fluoxetina também como agente antioxidante pois observaram nos grupos tratados uma redução nos níveis de EROs (Khanzode, Dakhale et al. 2003; Zafir, Ara et al. 2009; Ahmad, Rasheed et al. 2010; Moretti, Colla et al. 2011). Já outros estudos mostraram que ratos adultos expostos a fluoxetina apresentam uma produção elevada de EROs e que o sistema de defesa antioxidante no fígado está afetado (Inkielewicz-Stepniak 2011). Além disso, foi demonstrado que a utilização crônica de fluoxetina promoveu aumento nos indicadores de apoptose e na fragmentação do DNA também no fígado (Djordjevic, Djordjevic et al. 2011). Em um outro estudo trabalhando com antidepressivos

(clomipramina, norfloretina e desipramina) mas em cultura de célula cardíaca, os pesquisadores demonstraram que os antidepressivos promoveram aumento da morte celular por apoptose, e atribuem esse dano ao rompimento da função mitocondrial resultante da inibição de vários complexos enzimáticos (Abdel-Razaq, Kendall et al. 2011). Por fim, em um estudo utilizando o baço, os autores sugerem que a fluoxetina após um tratamento de 14 dias não altera os sistemas de defesa nem a peroxidação lipídica neste órgão (Kirkova, Tzvetanova et al. 2010).

A partir das evidências apresentadas observamos que os dados a respeito do papel dos antidepressivos em relação ao estado oxidativo celular ainda não foi totalmente elucidado. Em adição, até onde pudemos verificar, nenhum estudo com animais de experimentação foi realizado com o intuito de investigar o efeito de inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio no hipotálamo e hipocampo associando a alterações comportamentais envolvidos por estas estruturas. Desta forma, estudando os efeitos da exposição crônica com fluoxetina durante a lactação em ratas *Wistar* começamos a estabelecer uma associação entre as alterações comportamentais e o balanço oxidativo das regiões encefálicas envolvidas no controle comportamental.

Materiais e Métodos

Animais

Ratos *Wistar* fêmeas foram mantidos a uma temperatura ambiente de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ em um ciclo claro-escuro de 12:12 horas (início ciclo claro às 6:00h), com à água e comida *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos com 8 filhotes por ninhada 24h após o nascimento. Todos os procedimentos cirúrgicos e experimentais foram realizados com a aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco com o número do processo 23076.026644/2010-20.

Tratamento farmacológico e grupos experimentais

Os grupos experimentais e controle receberam uma única injeção subcutânea diária de fluoxetina ($F_{\text{NEO}} 10 \text{ mg / kg}$, dissolvido em solução salina, 10 ml / kg , p.c) ou solução veículo do fármaco ($C_{\text{NEO}} \text{ NaCl } 0,9\%$, 10 ml / kg , p.c) do 1º ao 21º dia pós-natal respectivamente. Para evitar qualquer possível influência do ritmo circadiano sobre as avaliações, a fluoxetina foi injetada das 7:00-8:00h.

Teste de ansiedade no labirinto em cruz elevado

Com 55 dias de vida o nível de ansiedade foi analisado pelo labirinto em cruz elevado (50 cm do chão) em fêmeas (Lister 1987). Este possui quatro braços dispostos em cruz, sendo dois abertos (50 x 10 cm) e dois fechados (50 x 10 x 40 cm). O teste foi realizado no ciclo escuro com auxílio de luz vermelha (11:00-11:30). Cada rato foi colocado no centro da plataforma e durante 5 min o número de entradas e o tempo gasto em cada braço foi registrado por um sistema de captação de imagem em infra-vermelho.

Teste de ingestão alimentar com dieta padrão

Ratas com 40 dias de vida foi submetido a uma privação alimentar de 3 horas. Após este período foi oferecido uma quantidade conhecida de dieta padrão de biotério (LABINA) e após 1 hora foi registrado o consumo alimentar através da diferença de peso entre a dieta oferecida e a rejeitada.

Processamento do material biológico para análise bioquímica

O hipotálamo e hipocampo coletados foram homogeneizados em tampão de extração (Tris base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; fluoreto de sódio 100 mM; ortovanadato de sódio 1 mM; PMSF 2 mM). Após a homogenização as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm, a 4° C, por 10 minutos e o sobrenadante foi submetido à quantificação de proteína.

Dosagem de proteína

A concentração de proteína da suspensão de cada tecido foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976). Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância foi considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1% foi utilizada como padrão.

Medida dos níveis de estresse oxidativo pela metodologia da Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A dosagem de TBARS foi realizada segundo Buege & Aust (1978) (Buege and Aust 1978), utilizando uma técnica colorimétrica para avaliar a lipoperoxidação, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da lipoperoxidação, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos. Coloca-se uma alíquota do homogenizado, de ácido tricloroacético a 10% e de ácido

tiobarbiturico que reage com os produtos da lipoperoxidação para formar um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada. Na sequência, foi adicionado n-butanol e as amostras agitadas por 30 segundos, com o objetivo de extrair o pigmento formado. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, sendo então a fase com o n-butanol utilizada para a leitura da absorbância a 535nm, utilizando cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em nmoles de TBARS por mg de proteína.

Atividade enzimática: Catalase

A atividade da catalase (CAT) é diretamente proporcional a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, sendo assim, a atividade da enzima pode ser medida através da avaliação do consumo de peróxido pelo decréscimo na absorção a 240 nm ([] máx do H₂O₂) de um meio de reação, contendo tampão fosfato (pH=7,4) e H₂O₂. Os resultados foram expressos em pmol Catalase por minuto por mg de proteína (Halliwell 1989).

Análise estatística

Todos os dados foram analisados segundo a normalidade da distribuição. Os dados estiveram dentro da distribuição gaussiana e foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). Os mesmos foram analisados pelo teste t student. Foi adotado o nível de significância de 5% em todos os casos. A construção do banco de dados e as análises estatísticas foram desenvolvidas no programa Excel (versão 2007, Microsoft, USA) e Graphpad Prisma 5® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), respectivamente.

Resultados

1. Teste de ingestão alimentar com dieta padrão

Nenhuma diferença foi encontrada sobre a ingestão alimentar relativa quando comparados os grupos C_{NEO} ($2,76 \pm 0,19$) e F_{NEO} ($2,85 \pm 0,26$) tratados no período neonatal.

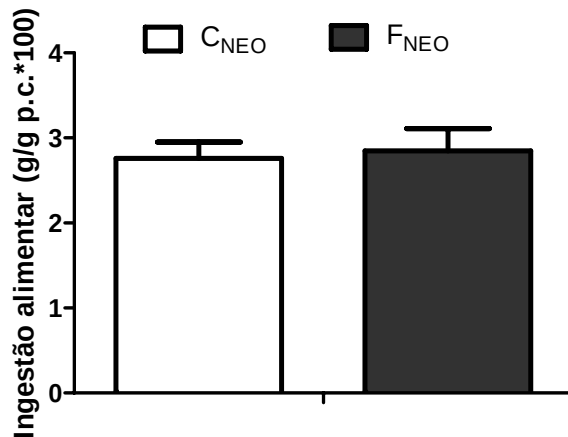


Figura 1- Efeito do tratamento com dose aguda de fluoxetina ou salina sobre a ingestão relativa (g/g pc*100) em ratos com 40 dias de vida. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina ($F_{NEO} = 10\text{mg/Kg p.c., sc; n} = 11$) ou salina ($C_{NEO} = 0,9\% \text{ NaCl } 10\text{ml/kg p.c., sc; n} = 7$) do 1° ao 21° dia de vida. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. ($P=0,8066$).

2. Teste de ansiedade no labirinto em cruz elevado

Na avaliação de ansiedade comparado ao grupo C_{NEO} os animais F_{NEO} aumentaram o número de entrada ($C_{NEO} = 8,7 \pm 1,2$; $F_{NEO} = 11,6 \pm 0,20$; $P=0,0299$) e o tempo gasto ($C_{NEO} = 89,6 \pm 14,1$; $F_{NEO} = 124,5 \pm 5,4$; $P=0,0345$) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.

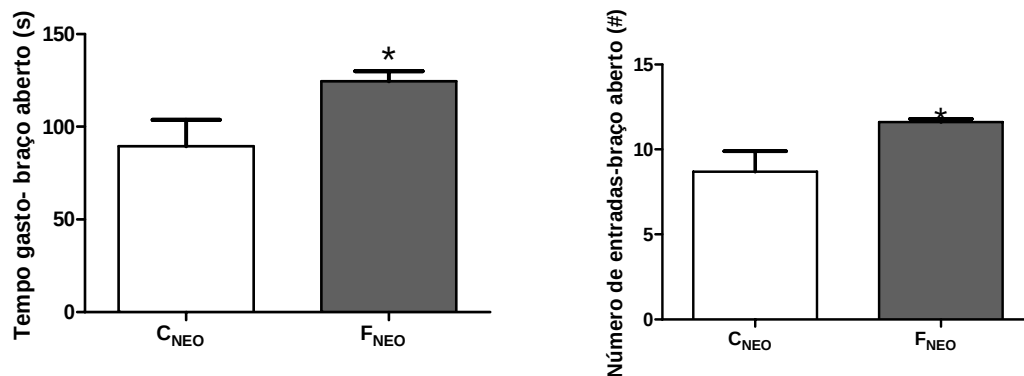


Figura 2- Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina do 1° ao 21° dia de vida (10mg/Kg pc, sc) sobre o comportamento de ansiedade. Ratos com 55 dias foram expostos durante 5 minutos ao labirinto em cruz elevado e a ansiedade foi avaliado apartir do númenro de entrdas

nos braços abertos e fechado. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. (C_{NEO} e F_{NEO} , $n=9$).

3. Medida dos níveis de estresse oxidativo pela metodologia da Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Medindo os níveis de estresse oxidativo por este método observamos que o grupo F_{NEO} ($0,12 \pm 0,01$) apresentou uma redução dos níveis de malondialdeído no hipocampo quando comparado ao grupo C_{NEO} ($0,28 \pm 0,05$) e nenhuma diferença significativa foi encontrada no hipotálamo entre os grupos ($C_{NEO} = 0,30 \pm 0,05$; $F_{NEO} = 0,39 \pm 0,07$)

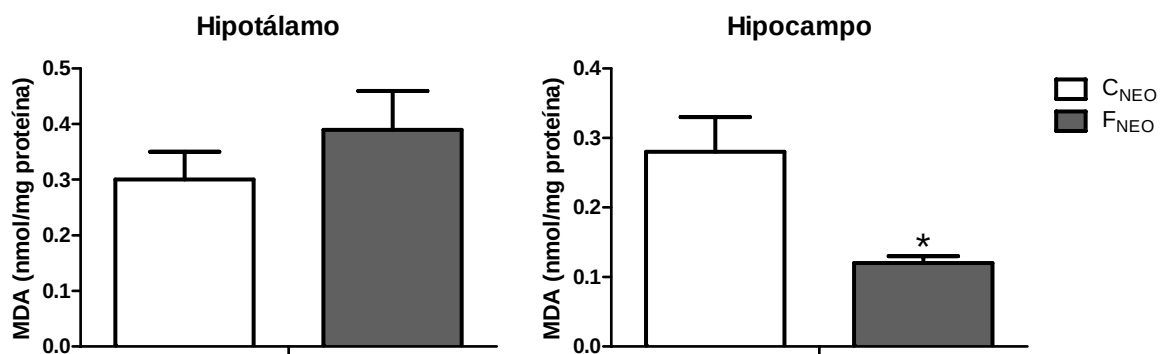


Figura 3- Efeito da exposição crônica com fluoxetina sobre os níveis de estresse oxidativo (MDA-Malondialdeído) em ratos com 60 dias de vida. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina ($F_{NEO} = 10\text{mg/Kg p.c., sc; } n = 6$) ou salina ($C_{NEO} = 0,9\% \text{ NaCl } 10\text{ml/kg p.c., sc; } n=6$) do 1º ao 21º dia de vida. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. (* $p=0,0105$).

4. Atividade enzimática da Catalase

Nesta avaliação observamos que o grupo F_{NEO} apresentou um aumento na atividade da catalase no hipotálamo ($C_{NEO} = 7,41 \pm 1,08$; $F_{NEO} = 33,14 \pm 5,45$) e hipocampo ($C_{NEO} = 87,92 \pm 12,19$; $F_{NEO} = 150,3 \pm 9,48$) quando comparado ao grupo C_{NEO} .

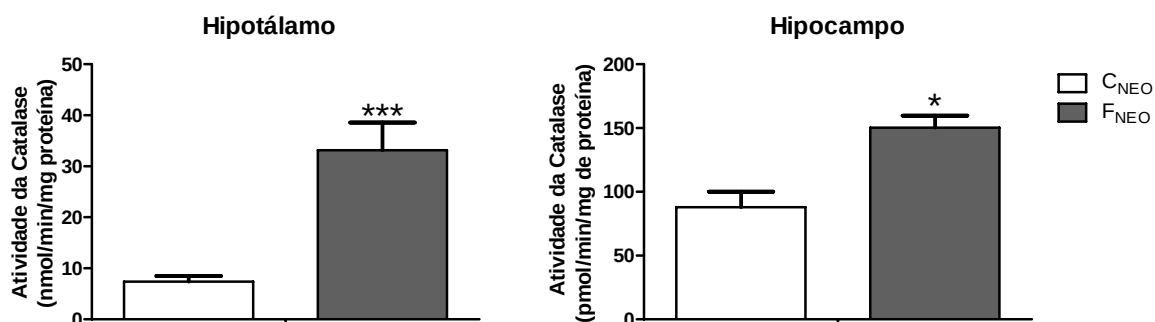


Figura 4- Efeito da exposição crônica com fluoxetina sobre a atividade da catalase em ratos com 60 dias de vida. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina ($F_{NEO} = 10\text{mg/Kg p.c., sc; n} = 6$) ou salina ($C_{NEO} = 0,9\% \text{ NaCl } 10\text{ml/kg p.c., sc; n} = 6$) do 1º ao 21º dia de vida. Os dados estão apresentados como média $\pm$ EPM. (* $p=0,0105$, *** $p=0,0009$).

Discussão

Utilizando o tratamento com fluoxetina em ratas *Wistar* durante a lactação, tivemos como objetivo investigar os efeitos do bloqueio crônico da proteína de recaptação da 5-HT (5-HTT) durante o desenvolvimento sobre os comportamentos alimentar e de ansiedade, além do estado oxidativo em estruturas cerebrais. Nossos resultados confirmam nossa hipótese de que a exposição crônica à fluoxetina durante o desenvolvimento altera os níveis de antioxidantes no hipotálamo e hipocampo de ratos. Também observamos alterações significativas no comportamento de ansiedade e uma preservação da alimentação após descontinuidade do tratamento. Neste modelo, o hipocampo e hipotálamo dos animais F_{NEO} apresentaram aumento da atividade antioxidante, o qual exerceu proteção contra as espécies reativas de oxigênio (ERO). Esses resultados corroboram com grande parte dos achados da literatura, onde atribuem a fluoxetina, um papel antioxidante a várias regiões tanto em ratos quanto em humanos (Zafir, Ara et al. 2009; Kirkova, Tzvetanova et al. 2010; Moretti, Colla et al. 2011; Novio, Nunez et al. 2011). Até onde temos conhecimento, não existem trabalhos associando alterações nos comportamentos alimentares e de ansiedade ao estado oxidativo nas

regiões de controle no sistema nervoso quando submetidos ao tratamento crônico neonatal com fluoxetina, o que dá ao nosso trabalho relevância significativa.

Avaliando o estado oxidativo hipotalâmico, a exposição a fluoxetina neonatal promoveu um aumento da atividade da catalase, mas nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de peroxidação lipídica. Poucos estudos com animais têm investigado o efeito dos ISRS sobre o estado antioxidante no cérebro. Entretanto estudos de Li et. al. (2000) e Kolla et al. (2005) demonstraram que o uso de antidepressivos diminui a expressão gênica e a atividade enzimática da superóxido dismutase, uma importante enzima antioxidante neuroprotetora (SOD) (Li, Chlan-Fourney et al. 2000; Kolla, Wei et al. 2005). No entanto, outro estudo demonstrou que a fluoxetina só exerce função antioxidante em animais com as concentrações de ERO já aumentadas (Zafir, Ara et al. 2009). Vale ressaltar que esses estudos foram realizados utilizando um tratamento crônico mas em período onde o sistema nervoso já está formado, ao passo que em nosso estudo, realizamos o tratamento crônico no período que o sistema nervoso ainda se encontra em formação. Todavia, nosso modelo experimental sugere que o tratamento crônico com fluoxetina exerce efeito protetor as EROs do hipotálamo.

Associado aos resultados do estado oxidativo hipotalâmico, não observamos nenhuma modificação no consumo alimentar de ratas F_{NEO} . Esses dados corroboram com estudo prévio do nosso grupo de pesquisa utilizando mesmo modelo experimental em ratos machos (Silva et al, 2012; dados não publicados). Em outro trabalho utilizando concentração diferente de fluoxetina, em ratos machos do 4º ao 21º dia pós natal, também não foi observado alterações significativas sobre a ingestão alimentar (Ansorge, Zhou et al. 2004). Como dissemos anteriormente, não encontramos artigos que relacionem fluoxetina, comportamento alimentar e estresse oxidativo, entretanto já existem relatos na literatura que o aumento dos níveis de EROs têm sido implicados na patologia de diversas doenças neurodegenerativa, podendo induzir a apoptose ou necrose celular (Orrenius 2007). Apesar das EROs estarem muitas vezes associadas a disfunção celular, as EROs tem também papel importante como molécula de sinalização metabólica, além de ser um sensor oxidativo (Diano, Liu et al. 2011)

Leloup et al. (2006) e Benani et al. (2007) demonstraram que as EROs atuavam como sinalizadores intracelulares ativando vias de sinalização no hipotálamo que atuam no controle metabólico de glicose e lipídios (Leloup, Magnan et al. 2006; Benani, Troy et al. 2007). Sendo assim, altas concentrações de glicose aumentam a produção de EROs, que por sua vez estimula a ativação neuronal de neurónios no núcleo arqueado hipotalâmico (Leloup, Magnan et al. 2006). Explicando um pouco mais como o estado oxidativo está associado ao controle

alimentar, estudos do grupo do Dr. Luc Penicaud mostraram que a produção hipotalâmica de EROs também são essenciais para a redução da ingestão de alimentos observada em ratos injetados com uma sobrecarga de lipídios (Benani, Troy et al. 2007). Além dessas observações, mais recentemente foi demonstrado que a geração descontrolada de EROs em neurônios que expressam o neuropeptídeo Y e o peptídeo relacionado ao gene Agouti (NPY/AgRP), reduz a taxa de disparo desses neurônios (Andrews, Liu et al. 2008; Horvath, Andrews et al. 2009). Associando nossos dados com a literatura podemos sugerir que a fluoxetina por atuar freando os níveis de EROs e por estar estimulando a enzima antioxidante, está também modulando o comportamento alimentar.

No hipocampo o grupo F_{NEO} apresentou um aumento na atividade da catalase e redução da peroxidação lipídica associado a uma redução dos níveis de ansiedade quando expostos ao labirinto em cruz elevado. O cérebro tem um alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados oxidável e a prevenção da peroxidação lipídica serve para manter a integridade da membrana (Mattson 1998). Nossos resultados corroboram com aqueles que mostram a redução da peroxidação lipídica como benefícios terapêuticos de muitos antidepressivos (Zafir, Ara et al. 2009).

Nossos dados referentes a ansiedade em ratas tratadas cronicamente com fluoxetina aparentemente diferem dos estudos de Ansorge e colaboradores (2004) onde o tratamento com fluoxetina promoveu um modelo animal de depressão e ansiedade (Ansorge, Zhou et al. 2004). Entretanto, mais uma vez é importante lembrar que nosso tratamento foi desde o primeiro dia de vida e se estendeu até o 21 dia, já no estudo de Ansorge e colaboradores o tratamento foi realizado do 4º ao 21º dia pós natal o que pode refletir em respostas diferentes nos níveis de ansiedade quando expostos a ambientes ou situações desafiadoras.

Os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da ansiedade normal e patológica são na sua maioria desconhecidos. Entretanto, estudos recentes vem demonstrando um envolvimento direto entre o estresse oxidativo e a ansiedade (de Oliveira, Silvestrin et al. 2007; Souza, Moreira et al. 2007). Em um estudo de Hovatta e colaboradores (2005) verificaram que expressão alterada de dois genes associados ao estresse oxidativo (glyoxalase 1 e glutathione reductase 1) apresentavam um papel causal na gênese da ansiedade (Hovatta, Tennant et al. 2005). Já no estudo de Berry e colaboradores (2007) verificaram em camundongos mutantes para uma determinada proteína (p66Shc - reduz o estresse oxidativo), que a manutenção dos níveis baixos de estresse oxidativo é capaz de prevenir alguns dos efeitos comportamentais do envelhecimento, particularmente em resposta a estímulos dolorosos ou emocionalmente excitante (Berry, Capone et al. 2007). Os autores concluem o

estudo sugerindo que há indícios de novas e complexas interações entre estresse oxidativo e estresse emocional.

Em um interessante estudo associando estresse oxidativo e ansiedade, Masood e colaboradores (2008) verificaram que quando tratavam camundongos com um fármaco (L-buthionine-(S,R)-sulfoximina-BSO) que induz estresse oxidativo havia uma diminuição em ambos os percentuais de entradas nos braços abertos, como também no tempo de permanência nos braços abertos em comparação com o controle (Masood, Nadeem et al. 2008). Já quando os camundongos eram tratado com o BSO mas também com dois outros fármacos (Bay 60-7550 e Apocinina) que reduzem os níveis de estresse oxidativo, eles verificavam que havia um aumento nos percentuais de entradas nos braços abertos, como também no tempo de permanência nos braços abertos em comparação com o tratado com BSO (indutor de estresse oxidativo). Dessa forma nossos resultados corroboram com grande parte dos achados da literatura, onde verificam que através de manipulações farmacológicas com ISRS há uma diminuição dos níveis de estresse oxidativo acompanhado de uma redução nos níveis de ansiedade.

Através dos nossos resultados, julgamos poder concluir que a exposição neonatal ao ISRS, promove alterações adaptativas nos comportamentos alimentar e de ansiedade bem como nos níveis de estresse oxidativo em ratas fêmea. Cada vez mais, os ISRS são usados para tratar distúrbios emocionais em crianças e mulheres grávidas. No entanto, os efeitos a longo prazo destes medicamentos sobre o desenvolvimento do cérebro são em grande parte desconhecido.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) por tornarem possível a realização deste estudo.

Referências

- Abdel-Razaq, W., D. A. Kendall, et al. (2011). "The effects of antidepressants on mitochondrial function in a model cell system and isolated mitochondria." *Neurochem Res* **36**(2): 327-338.
- Ahmad, A., N. Rasheed, et al. (2010). "Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress." *Stress* **13**(4): 355-364.
- Andrews, Z. B., Z. W. Liu, et al. (2008). "UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals." *Nature* **454**(7206): 846-851.
- Ansorge, M. S., M. Zhou, et al. (2004). "Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice." *Science* **306**(5697): 879-881.
- Benani, A., S. Troy, et al. (2007). "Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake." *Diabetes* **56**(1): 152-160.
- Berry, A., F. Capone, et al. (2007). "Deletion of the life span determinant p66Shc prevents age-dependent increases in emotionality and pain sensitivity in mice." *Exp Gerontol* **42**(1-2): 37-45.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brand, M. D., R. Pamplona, et al. (2002). "Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3." *Biochem J* **368**(Pt 2): 597-603.
- Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). "Microsomal lipid peroxidation." *Methods Enzymol* **52**: 302-310.
- de Oliveira, M. R., R. B. Silvestrin, et al. (2007). "Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses." *Neurotoxicology* **28**(6): 1191-1199.
- Diano, S., Z. W. Liu, et al. (2011). "Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity." *Nat Med* **17**(9): 1121-1127.
- Diav-Citrin, O. and A. Ornoy (2012). "Selective serotonin reuptake inhibitors in human pregnancy: to treat or not to treat?" *Obstet Gynecol Int* **2012**: 698947.
- Djordjevic, J., A. Djordjevic, et al. (2011). "Fluoxetine affects antioxidant system and promotes apoptotic signaling in Wistar rat liver." *Eur J Pharmacol*.
- Dobbing, J. (1974). "The later growth of the brain and its vulnerability." *Pediatrics* **53**(1): 2-6.
- Dobbing, J. and J. L. Smart (1974). "Vulnerability of developing brain and behaviour." *Br Med Bull* **30**(2): 164-168.
- Gutteridge, J. M. and B. Halliwell (1989). "Iron toxicity and oxygen radicals." *Baillieres Clin Haematol* **2**(2): 195-256.
- Halliwell, B. (1989). "Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis." *Br J Exp Pathol* **70**(6): 737-757.
- Hansen, H. H., C. Sanchez, et al. (1997). "Neonatal administration of the selective serotonin reuptake inhibitor Lu 10-134-C increases forced swimming-induced immobility in adult rats: a putative animal model of depression?" *J Pharmacol Exp Ther* **283**(3): 1333-1341.
- Hilakivi, L. A., J. D. Sinclair, et al. (1984). "Effects of neonatal treatment with clomipramine on adult ethanol related behavior in the rat." *Brain Res* **317**(1): 129-132.
- Hilakivi, L. A., D. Stenberg, et al. (1987). "Neonatal desipramine or zimeldine treatment causes long-lasting changes in brain monoaminergic systems and alcohol related behavior in rats." *Psychopharmacology (Berl)* **91**(4): 403-409.
- Horvath, T. L., Z. B. Andrews, et al. (2009). "Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS." *Trends Endocrinol Metab* **20**(2): 78-87.
- Hovatta, I., R. S. Tennant, et al. (2005). "Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice." *Nature* **438**(7068): 662-666.

- Inkielewicz-Stepniak, I. (2011). "Impact of fluoxetine on liver damage in rats." Pharmacol Rep **63**(2): 441-447.
- Kendell, R. E., J. C. Chalmers, et al. (1987). "Epidemiology of puerperal psychoses." Br J Psychiatry **150**: 662-673.
- Khanzode, S. D., G. N. Dakhale, et al. (2003). "Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors." Redox Rep **8**(6): 365-370.
- Kirkova, M., E. Tzvetanova, et al. (2010). "Antioxidant activity of fluoxetine: studies in mice melanoma model." Cell Biochem Funct **28**(6): 497-502.
- Kolla, N., Z. Wei, et al. (2005). "Amitriptyline and fluoxetine protect PC12 cells from cell death induced by hydrogen peroxide." J Psychiatry Neurosci **30**(3): 196-201.
- Leloup, C., C. Magnan, et al. (2006). "Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing." Diabetes **55**(7): 2084-2090.
- Li, X. M., J. Chlan-Fourney, et al. (2000). "Antidepressants upregulate messenger RNA levels of the neuroprotective enzyme superoxide dismutase (SOD1)." J Psychiatry Neurosci **25**(1): 43-47.
- Lister, R. G. (1987). "The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse." Psychopharmacology (Berl) **92**(2): 180-185.
- Maciag, D., K. L. Simpson, et al. (2006). "Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry." Neuropsychopharmacology **31**(1): 47-57.
- Marklund, S. L. (1985). "Oxygen toxicity and protective systems." J Toxicol Clin Toxicol **23**(4-6): 289-298.
- Masood, A., A. Nadeem, et al. (2008). "Reversal of oxidative stress-induced anxiety by inhibition of phosphodiesterase-2 in mice." J Pharmacol Exp Ther **326**(2): 369-379.
- Mattson, M. P. (1998). "Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity." Trends Neurosci **21**(2): 53-57.
- Mirmiran, M., N. E. van de Poll, et al. (1981). "Suppression of active sleep by chronic treatment with chlorimipramine during early postnatal development: effects upon adult sleep and behavior in the rat." Brain Res **204**(1): 129-146.
- Moretti, M., A. Colla, et al. (2011). "Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress." J Psychiatr Res.
- Novio, S., M. J. Nunez, et al. (2011). "Effects of fluoxetine on the oxidative status of peripheral blood leucocytes of restraint-stressed mice." Basic Clin Pharmacol Toxicol **109**(5): 365-371.
- Orrenius, S. (2007). "Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death." Drug Metab Rev **39**(2-3): 443-455.
- Patil, A. S., J. A. Kuller, et al. (2011). "Antidepressants in pregnancy: a review of commonly prescribed medications." Obstet Gynecol Surv **66**(12): 777-787.
- Rayen, I., D. L. van den Hove, et al. (2011). "Fluoxetine during development reverses the effects of prenatal stress on depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis in adolescence." PLoS One **6**(9): e24003.
- Sies, H. (1991). "Role of reactive oxygen species in biological processes." Klin Wochenschr **69**(21-23): 965-968.
- Souza, C. G., J. D. Moreira, et al. (2007). "Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior." Life Sci **81**(3): 198-203.
- Trouche, E., C. Mias, et al. (2010). "Characterization of monoamine oxidases in mesenchymal stem cells: role in hydrogen peroxide generation and serotonin-dependent apoptosis." Stem Cells Dev **19**(10): 1571-1578.
- Zafir, A., A. Ara, et al. (2009). "In vivo antioxidant status: a putative target of antidepressant action." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **33**(2): 220-228.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A integridade do sistema serotoninérgico durante o período do desenvolvimento se faz necessária à evolução normal das funções comportamentais. Reforçando esses achados, nossos resultados mostram que a exposição a inibidores de recaptação de serotonina durante a lactação, e de forma crônica, é capaz de modular os comportamentos alimentar e de ansiedade bem como os níveis de componentes de defesa antioxidantes do nosso organismo. Ratificando os efeitos a curto prazo, o tratamento com fluoxetina crônica durante a lactação promoveu significativa redução no crescimento somático. Após descontinuidade do tratamento foi observado, nos filhotes machos tratados, um comportamento alimentar adaptativo e exarcebado quando expostos ao jejum e a dieta palatável. Também foi observado nesses animais uma antecipação da saciedade, sem alteração na quantidade de alimento ingerido e uma não responsividade a fluoxetina administrada de forma aguda 1 hora antes da avaliação. O bloqueio crônico das proteínas de transporte em período de acelerado desenvolvimento do sistema nervoso parece reduzir a capacidade de resposta da serotonina sobre o comportamento alimentar promovendo comportamentos adaptativos *a posteriore*.

Além disso os mecanismos adaptativos resultantes da exposição à fluoxetina em filhotes fêmea parece preservar o sistema nervoso, nesta análise o hipotálamo e hipocampo, das agressões promovidas pelas espécies reativas de oxigênio. Observamos nos animais tratados um aumento da capacidade antioxidante e redução da lipoperoxidação no hipotálamo e hipocampo, acompanhada de preservação da ingestão alimentar e redução dos níveis de ansiedade. A fluoxetina é amplamente utilizada no tratamento da depressão em gestantes e lactantes por aumentar a atividade do sistema serotoninérgico. Nossos achados sugerem que a utilização de antidepressivos em fases críticas ao desenvolvimento deve ser feita de forma consciente dos possíveis riscos causados pela exposição a este fármaco de forma crônica. E que os ISRS bem como outros fatores agressores ao sistema serotoninérgico podem sim promover comportamentos adaptativos que levem ao surgimento de doenças metabólicas na vida adulta.

PERSPECTIVAS

✓ Após exposição crônica durante o período neonatal com o inibidor de recaptação da serotonina, investigar o funcionamento dos mecanismos do controle do balanço energético avaliando: Peso corporal; Temperatura corporal; Os níveis de atividade física voluntária; A quantidade de tecido branco retroperitoneal; A quantidade de tecido adiposo marrom dorsal e subescapular; Expressão protéica dos neuropeptídeos POMC e NPY no hipotálamo; Expressão protéica de UCP-1 em tecido adiposo marrom; Expressão protéica de UCP-3 no músculo extensor longo dos dedos.

✓ Estudar a função mitocondrial avaliando o estado do balanço oxidativo e o consumo de oxigênio em mitocôndrias do hipotálamo, tecido adiposo e músculo extensor longo dos dedos.

REFERÊNCIAS

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.
- Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). "Microsomal lipid peroxidation." Methods Enzymol 52: 302-310.
- Chorilli, M., D. C. Michelin, et al. (2007). "Animais de laboratório: o camundongo. ." Rev Ciênc Farm Básica 28(1): 11-23.
- Faria, H. G. (1998). "Conforto e bem estar dos animais de laboratório." Arq. Ciênc. Saúde Unipar 2(1): 83-87.
- Halford, J. C., S. C. Wanninayake, et al. (1998). "Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake." Pharmacol Biochem Behav 61(2): 159-168.
- Hall, W. G. (1977). "Suckling behavior and intake control in the developing rat pup." Journal of Comparative Physiological Psychology 91(6).
- Halliwell, B. (1989). "Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis." Br J Exp Pathol 70(6): 737-757.
- Hiemke, C. and S. Hartter (2000). "Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors." Pharmacol Ther 85(1): 11-28.
- Houpt, K. A. and T. R. Houpt (1975). "Effects of gastric loads and food deprivation on subsequent food intake in suckling rats." J Comp Physiol Psychol 88(2): 764-772.
- Ishii, Y., J. E. Blundell, et al. (2003). "Effects of systematic variation in presatiation and fasting on the behavioural satiety sequence in male rats." Physiol Behav 79(2): 227-238.
- Ishii, Y., J. E. Blundell, et al. (2003). "Palatability, food intake and the behavioural satiety sequence in male rats." Physiol Behav 80(1): 37-47.
- Lectez, B., L. Jeandel, et al. (2009). "The orexigenic activity of the hypothalamic neuropeptide 26RFa is mediated by the neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons of the arcuate nucleus." Endocrinology 150(5): 2342-2350.
- Lister, R. G. (1987). "The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse." Psychopharmacology (Berl) 92(2): 180-185.
- Marcondes, F. K., F. J. Bianchi, et al. (2002). "Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations." Braz J Biol 62(4A): 609-614.
- Miller, B. H., L. E. Schultz, et al. (2008). "Genetic regulation of behavioral and neuronal responses to fluoxetine." Neuropsychopharmacology 33(6): 1312-1322.
- Qu, Y., L. Aluisio, et al. (2009). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of norfluoxetine in rats: Increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex." Pharmacol Biochem Behav 92(3): 469-473.
- Sanchez, S., C. Sanchez, et al. (2008). "Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of rats." Mol Cell Biochem 317(1-2): 105-111.
- Semple-Rowland, S. L. and W. W. Dawson (1987). "Cyclic light intensity threshold for retinal damage in albino rats raised under 6 lx." Exp Eye Res 44(5): 643-661.
- van Zutphen, L. F. (1993). "Toxicity testing and genetic quality control." J Exp Anim Sci 35(5-6): 202-209.
- Wong, D. T. and F. P. Bymaster (1995). "Development of antidepressant drugs. Fluoxetine (Prozac) and other selective serotonin uptake inhibitors." Adv Exp Med Biol 363: 77-95.

ANEXO

Anexo A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

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, 17 de junho de 2010.

Ofício nº 282/2010

Da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Profª. Sandra Lopes de Souza**

Departamento: Anatomia - CCB - UFPE

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076. 026644/2010-20

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 NEONATAL POR MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO: ESTUDO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR E DA ATIVIDADE NEURONAL EM RATOS"**.

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

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

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

Observação:

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição-UFPE; Animais: Ratos, linhagem, Wistar, Sexo: Masculino e Feminino; Idade: Adultas gestantes e filhotes da infância à vida adulta. Número de animais previsto no protocolo: 16 (dezesesseis) ratas e 96 (noventa e seis) filhotes.

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansen



Profª. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA