

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO**

**PLASTICIDADE DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR: UM ESTUDO DO
NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO**

LÍVIA DE ALMEIDA LIRA

RECIFE

2016

LÍVIA DE ALMEIDA LIRA

**PLASTICIDADE DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR: UM ESTUDO DO
NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutora em Neurociências.

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

**RECIFE
2016**

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

L768p Lira, Lívia de Almeida.
Plasticidade do comportamento alimentar: um estudo do núcleo do
trato solitário / Lívia de Almeida Lira. – 2016.
95 f.: il.; tab., 30 cm.

Orientadora: Sandra Lopes de Souza.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do
Comportamento. Recife, 2016.
Inclui referências e anexos.

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

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-198)

LÍVIA DE ALMEIDA LIRA
PLASTICIDADE DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR: UM ESTUDO DO
NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Neuropsiquiatria e Ciências do
Comportamento da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutora em Neurociências.

Aprovada em: 26/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro
(Presidente da Banca)
Universidade Federal de Pernambuco-CAV

Prof^a Dr^a Rhowena Jane Barbosa de Matos
Universidade Federal de Pernambuco-CAV

Prof^a Dr^a Matilde Cesiana da Silva
Universidade Federal de Pernambuco-CAV

Prof^a Dr^a Amanda Alves Marcelino da Silva
Universidade de Pernambuco-Petrolina

Prof^a Dr^a Elizabeth do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a permissão de chegar até aqui, e por toda a força concedida na concretização desse sonho. A Ele toda Honra e toda Glória!

Ao meu esposo Caio Falcão pelo amor, companheirismo, paciência e por sempre acreditar em mim e me dar forças quando acredito que não vou conseguir.

A minha mãe Vitória Almeida e minhas irmãs Sheila e Bruna por sempre estarem presente nos bons e maus momentos, pelo amor, carinho e constante apoio.

À Professora Sandra Lopes pela oportunidade de ingressar neste grupo de pesquisa e, sobretudo pelo carinho, paciência e profissionalismo.

À professora Manuela Figueiroa pela enorme ajuda e suporte na utilização do laboratório de morfometria da Pós-Graduação em Patologia.

Aos colegas do Laboratório Neuroplasticidade e Comportamento pela ajuda em todos esses anos de convivência.

A Larissa e Isabeli, amigas tão chegada como irmãs, por toda ajuda, pelas conversas, risadas e por sempre estarem presente quando mais precisei de vocês.

Aos meus irmãos e irmãs queridos pelas orações, carinho e torcida.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento e apoio ao projeto e aos recursos humanos.

RESUMO

O controle do comportamento alimentar é um fenômeno complexo dependente da interação entre os sinais originados na periferia do corpo e em várias regiões do sistema nervoso central, incluindo o núcleo do trato solitário (NTS). Esse núcleo regula muitos aspectos do comportamento alimentar e expressa receptores para vários peptídeos e hormônios indutores de saciedade, incluindo a serotonina. Prejuízos na via de sinalização e no conteúdo encefálico deste neurotransmissor estão associadas à hiperfagia e obesidade. Algumas regiões encefálicas responsáveis pela regulação do comportamento alimentar são alvos de ajustes permanentes promovidos por eventos que ocorrem durante os estágios iniciais do desenvolvimento. Nessa fase, a influência de estímulos ambientais, particularmente os nutricionais, podem modular os eventos ontogenéticos e promover sérias consequências na vida adulta. Nesse estudo, o objetivo foi investigar os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre aspectos morfofuncionais do NTS relacionados ao controle do comportamento alimentar. Ratos da linhagem Wistar, mantidos em condições padrões de biotério foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de acordo com a dieta ofertada para mães durante a gestação e lactação: grupo controle (C, caseína 17% / n = 10) ou grupo desnutrido (D, caseína 8% / n = 10). Foram avaliados aos 35 e 180 dias de vida: a) peso corporal; b) ingestão alimentar; c) expressão da proteína FOS nas regiões rostral e medial do NTS em resposta ao estímulo alimentar; d) sequência comportamental de saciedade e os parâmetros microestruturais da alimentação e apenas aos 35 dias de vida: e) densidade de terminais e distribuição de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1B} nos subnúcleos ventrolateral, intermediário, medial e comissural do NTS. As áreas estudadas foram identificadas e quantificadas com auxílio do atlas estereotático de Paxinos e Watson (1998). Com base nessas avaliações, o presente trabalho demonstrou que a desnutrição perinatal promove: 1) redução do peso corporal (35 dias: C=129.06±0.20; D=68.10±0.35; 180 dias: C = 435.70±0.70; D = 370.30±0.70); (2) hiperfagia (35 dias: C = 6.8±0.6; D = 11.9±0.9; 180 dias C = 6.6±0.4; D = 10±0.8); (3) retardo na saciedade, (4) aumento no tamanho (C= 5,5 ±0,43; D= 7,8± 0,57) e duração (C=14,3± 1.8; D= 20,4±1,7) das refeições; (5) aumento na ativação neuronal nas porções rostral (35 dias: C = 134.5±22.23; D= 366.8±58.02/ 180 dias = 240.6±38.10; D = 444.2±57.05) e medial do NTS (35 dias: C = 172.8±26.28; D= 435.2±72.69/180 dias: C= 224.4±33.10; D= 434.0±45.31); (6) aumento na densidade de terminais serotoninérgicos no NTS (C= 34,4 ± 1,5 n= 5; D= 48± 3,6) e no subnúcleo intermediário (C= 28,3 ± 2; D= 43± 1,5) e (7) maior quantidade de neurônios 5-HT_{1B}-IR no NTS (C= 159,6± 18,2; D= 317,1± 18,6) e nos subnúcleos ventrolateral (C= 20,1± 2,7/N=5; D= 34,4± 3,5), intermediário (C= 20,9± 2,8/N=5; D= 49,3± 3) e medial (C= 45,6 ± 6/N=5; D= 95,4± 6). Estes resultados indicam que o NTS é uma estrutura particularmente vulnerável às influências da manipulação nutricional nos estágios iniciais do desenvolvimento e pode ser alvo de processos adaptativos do controle comportamento alimentar observados nesses animais na vida adulta.

Palavras- chave: Serotonina. Desnutrição. Comportamento alimentar. Núcleo do trato solitário.

ABSTRACT

The control of feeding behavior is dependent on the interactions among a variety of signals originated from periphery and several brain areas, such as the nucleus of the solitary tract (NTS) in the caudal brainstem. This nucleus regulates many aspects of feeding behavior and expressed receptors for several satiety inducing peptides and hormones including serotonin. Losses in the signaling pathway and the brain content of this neurotransmitter are associated with hyperphagia and obesity. Some brain regions responsible for the regulation of feeding behavior are targets of permanent adjustments promoted by events that occur during the early stages of development. At that stage, the influence of environmental stimuli, particularly the nutritional, may modulate ontogenetic events and promote serious consequences in adult life. In this study, the main aim was to investigate the effects of perinatal protein malnutrition on morphological and functional aspects of the NTS related to control of feeding behavior. Male Wistar rats were divided into two groups according to the diet offered to the dams during gestation and lactation: control group (C, diet containing 17% casein/ n=10) or isocaloric low-protein group (LP, diet containing 8% casein/ n=10). We evaluated: a) body weight; b) food intake; c) c-Fos protein expression in the rostral and medial NTS; d) behavioural sequence satiety and micro-structural parameters of feeding and e) density of serotonergic terminals and distribution of 5-HT_{1B} receptor in the ventro-lateral, intermediate, medial and commissural subnucleus of NTS. The areas studied were identified and quantified with Stereotactic atlas of Paxinos and Watson (2005). Based on these evaluations, the present study showed that the malnutrition: (1) promotes perinatal reduced body weight (35 days: C = 129.06 ± 0.20 ; D = 68.10 ± 0.35 ; 180 days: C = 435.70 ± 0.70 ; D = 370.30 ± 0.70); (2) hyperphagia (35 days: C = 6.8 ± 0.6 ; D = 11.9 ± 0.9 ; 180 days C = 6.6 ± 0.4 ; D = 10 ± 0.8); (3) delay in satiety, (4) increase in size (C = 5.5 ± 0.43 ; D = 7.8 ± 0.57) and duration (C = 14.3 ± 1.8 ; D = 20.4 ± 1.7) meals; (5) increase in neuronal activation in the rostral portions (35 days: C = ± 134.5 22.23; D = $\pm 366.8/58.02$ 180 days = 240.6 ± 38.10 ; D = ± 444.2 57.05) and medial NTS (35 days: C = 172.8 ± 26.28 ; D = $\pm 72.69/180$ days 435.2: C = ± 224.4 33.10; D = ± 45.31 434.0); (6) increase in density of serotonergic terminals in the NTS (C = 34.4 ± 1.5 n = 5; D = 48 ± 3.6) and the intermediate subnucleus (C = 28.3 ± 2 ; D = 43 ± 1.5) and (7) increased amount of 5-HT_{1B}-IR neurons in the NTS (C = 159.6 ± 18.2 ; D = 317.1 ± 18.6) and ventro-lateral (C = $20.1 \pm 2.7/N = 5$ d = 34.4 ± 3.5), intermediate (C = $20.9 \pm 2.8/N = 5$; D = 49.3 ± 3) and medial subnucleus (C = $45.6 \pm 6/N = 5$; D = 95.4 ± 6). These results indicate that the NTS is a particularly vulnerable structure to the influences of nutritional manipulation in the early stages of development and may be adaptive processes of control feeding behavior observed in these animals into adulthood.

Key words: Serotonin. Undernutrition. Feeding behavior. Nucleus of solitary tract.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras da Tese

- Figura 1-** Representação esquemática da subdivisão do NTS em seu eixo rostrocaudal. Fonte: Adaptação de Liu et al, 2000 e Loewy AD, 1990.....18
- Figura 2-** Representação esquemática das porções rostral (A) e medial (C) do NTS (Paxinos; Watson 2005).....58
- Figura 3-** Representação esquemática do NTS evidenciando seus subnúcleos estudados a partir dos níveis de bregma -12,96 (A) e -13,92 (B) (Paxinos; Watson 2005). (1) SolM- subnúcleo Medial; (2) SolIM Subnúcleo Intermediário; (3) SolVL Subnúcleo Ventrolateral e (4) SolC- Subnúcleo Comissural;.....59
- Figura 4-** Efeito da desnutrição perinatal sobre a densidade de terminais serotoninérgicos no NTS e em subnúcleos específicos.....62
- Figura 5-** Efeito da desnutrição perinatal sobre a densidade de terminais serotoninérgicos no NTS a partir de seu eixo ântero-posterior.....63
- Figura 6-** Efeito da manipulação nutricional perinatal sobre a densidade de terminais serotoninérgicos em subnúcleos específicos do NTS a partir de seu eixo ântero-posterior.....64
- Figura 7-** Análise quantitativa de neurônios imunorreativos ao receptor 5-HT1B no NTS e seus subnúcleos específicos de animais desnutridos.....65
- Figura 8-** Efeito da desnutrição perinatal sobre a densidade de neurônios imunorreativos ao receptor 5-HT1B no NTS a partir de seu eixo ântero-posterior.....66
- Figura 9-** Efeito da desnutrição perinatal sobre a densidade neurônios imunorreativos ao receptor 5-HT1B em subnúcleos específicos do NTS a partir de seu eixo ântero-posterior.....67

Figuras da Revisão Sistemática

- Figura 1-** Representação esquemática do processo de seleção dos artigos.....32

LISTA DE TABELAS

Tabelas da Tese

Tabela 1: Composição das dietas experimentais ofertadas durante o período perinatal (g/100g dieta).....	50
--	-----------

Tabelas da Revisão Sistemática

Tabela 1: Síntese dos estudos incluídos na revisão sistemática.....	35
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT** – Serotonina;
- α -MSH**- Homônimo estimulado do melanócito alfa;
- C**- Grupo experimental controle;
- CART**- Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina;
- CCK** – Colecistocinina;
- cNTS**- Núcleo do trato solitário caudal;
- D**- Grupo experimental desnutrido;
- DAB**- 3,3-diaminobenzidina;
- GLP-1**- Peptídeo semelhante ao glucagon 1;
- IOD**- Índice de densidade óptica;
- ISRS**- Inibidores seletivos da receptação da serotonina;
- mNTS**- Núcleo do trato solitário medial;
- NPY**- Neuropeptídio Y;
- NTS**- Núcleo do trato solitário;
- PBS**- Tampão fosfato-salino;
- PCR**- reação em cadeia da polimerase;
- POMC**- Proopiomelanocortina;
- PVN**- Núcleo paraventricular do hipotálamo;
- rNTS**- Núcleo do trato solitário rostral;
- SCS**- Sequência comportamental de saciedade;
- SNC**- Sistema Nervoso Central
- SOLC**- Subnúcleo comissural do núcleo do trato solitário;
- SOLCE**- Subnúcleo central do núcleo do trato solitário;
- SOLDL**- Subnúcleo dorsolateral do núcleo do trato solitário;
- SOLDM**- Subnúcleo dorsomedial do núcleo do trato solitário;
- SOLG**- Subnúcleo gelatinoso do núcleo do trato solitário;
- SOLI**- Subnúcleo intersticial do núcleo do trato solitário;
- SOLIM**- Subnúcleo intermediário do núcleo do trato solitário;

SOLL- Subnúcleo lateral do núcleo do trato solitário;

SOLM- Subnúcleo medial do núcleo do trato solitário;

SOLV- Subnúcleo ventral do núcleo do trato solitário;

SOLVL- Subnúcleo ventro-lateral do núcleo do trato solitário;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
3. REVISÃO SISTEMÁTICA	28
4. HIPÓTESE	47
5. OBJETIVOS	48
5.1 Objetivo Geral	48
5.2 Objetivos Específicos	48
6. MATERIAIS E MÉTODOS	49
6.1 Animais	49
6.2 Grupos Experimentais	49
6.3 Procedimentos Experimentais	51
6.3.1 Acompanhamento do peso corporal	51
6.3.2 Consumo Alimentar	51
6.3.3 Sequência Comportamental de Saciedade (SCS	51
6.3.4 Estímulo alimentar para expressão da proteína FOS	52
6.3.5 Perfusão Transcardíaca	53
6.3.6 Procedimentos Imunohistoquímicos	54
6.3.6.1 Imunohistoquímica contra a proteína FOS	54
6.3.6.2 Imunohistoquímica contra serotonina	55
6.3.6.3 Imunohistoquímica contra receptor serotoninérgico 5-HT1B	56
6.3.7 Análise quantitativa de neurônios Fos-IR e 5-HT1B-IR no NTS	57
6.3.8 Análise da densidade de terminais serotoninérgicos no NTS	59
6.4 Análises Estatísticas	60
7. RESULTADOS	61
7.1 Análise da ativação neuronal do NTS em resposta ao estímulo alimentar	61
7.2 Análise da densidade de terminais serotoninérgicos no NTS	61
7.3 Análise quantitativa de neurônios 5-HT1B-IR no NTS	64
8. DISCUSSÃO	68
9. CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	86

1 INTRODUÇÃO

Alimentar-se é essencial para a sobrevivência e, por esta razão, ao longo do processo evolutivo, as diferentes espécies animais desenvolveram um gama de estratégias morfo-fisiológicas, bioquímicas e comportamentais na tentativa de otimizar e assegurar a alocação, metabolização e armazenamento da energia proveniente dos recursos alimentares (Berthoud; Morrison, 2008; Kringelbach et al, 2012; Zambrano; Nathanielsz, 2013). Devido à sua importância biológica, o controle do comportamento alimentar é realizado por um sistema altamente complexo, dependente da atividade coordenada do sistema nervoso central (SNC) e periferia do corpo, que atuam em conjunto para detectar e integrar as informações provenientes dos estímulos externos e internos ao organismo de forma a gerar as respostas mais apropriadas às necessidades do mesmo (Barbano; Cador, 2005; Berthoud; Morrison, 2008; Schwartz; Zeltser, 2013).

Os mecanismos envolvidos na gênese do comportamento alimentar são tipicamente considerados como mecanismos de entrada-integração-saída de informações (Berthoud; Morrison, 2008). De modo geral, os múltiplos sinais interoceptivos (que refletem a disponibilidade energética do indivíduo), em conjunto com as informações sensoriais associadas às propriedades dos alimentos (o sabor, odor, textura, temperatura e apresentação do alimento) e os fatores sociais, cognitivos e emocionais (incluindo motivação e recompensa alimentar) convergem para o SNC onde, diferentes áreas como o hipotálamo, o tronco encefálico e as estruturas cortico-límbicas, integram e ajustam essas informações de forma a produzir coordenadamente sinais somatomotores, autonômicos e neuroendócrinos (Berthoud; Morrison, 2008; Kringelbach et al, 2012; Morton et al, 2014). Todas essas informações associadas à ritmicidade circadiana e as predisposições individuais são fundamentais para determinar o início, as escolhas, a duração, a frequência e o término das refeições (Berthoud, 2011; Schwartz; Zeltser, 2013).

Embora se conheça muitos aspectos dos mecanismos neurais envolvidos na regulação do comportamento alimentar, e se reconheça a importância de algumas regiões do SNC como o hipotálamo, alvo de intensas pesquisas e que por muito tempo foi considerado o principal centro regulador deste comportamento, muito ainda permanece a ser esclarecido, principalmente no que diz respeito às patologias associadas ao comportamento alimentar (Berthoud, 2004, 2002; Gahagan, 2012).

Nas últimas décadas, com o aumento nos índices globais da obesidade, as pesquisas nesta área de conhecimento foram impulsionadas. A busca pelas causas, bem como tratamentos

eficazes no combate desta desordem metabólica trouxeram importantes contribuições para o entendimento de como os fatores metabólicos (homeostático) e não metabólicos (hedônico) são integrados para conduzir o comportamento ingestivo (Berthoud, 2011; Kenny, 2011). O progresso alcançado nas últimas décadas pode ser sumarizado a partir de três importantes achados: (1) a descoberta da leptina e seus receptores que caracterizaram o ponto de partida para o conhecimento de uma nova neuroquímica funcional do hipotálamo; (2) a investigação sistemática da interação intestino-encéfalo, com foco nas vias aferentes humorais e neurais para o SNC, e centrado nos conceitos de saciação e saciedade e (3) o reconhecimento do prazer, recompensa alimentar e seus substratos neurológicos processados principalmente em várias estruturas do sistema cortico-límbico (Berthoud, 2004, 2008). Essas descobertas, por um lado reafirmaram a crucial importância do hipotálamo na regulação do comportamento alimentar, e por outro lado reforçaram a ideia que o controle deste comportamento está distribuída ao longo de todo esse sistema, com as diferentes áreas atuando em conjunto para gerar a resposta mais apropriada as necessidades do indivíduo (Schwartz; Zeltser, 2013).

Dentre essas regiões encefálicas envolvidas na manutenção da quantidade de energia adquirida, metabolizada e armazenada pelo organismo, destaca-se o tronco encefálico. Este, desempenha papel fundamental na integração entre os sinais provenientes da periferia do corpo e do SNC (Grill; Hayes, 2009; Grill; Kaplan, 2002; Grill, 2010). Uma estrutura específica desta região, o núcleo do trato solitário (NTS), vem sendo implicado diretamente no controle do comportamento alimentar. Por ser a primeira via de recepção das informações provenientes da cavidade oral e de órgãos periféricos, o NTS ganhou destaque nas pesquisas. O NTS exerce importantes funções interoceptivas e integrativas modulando muitos aspectos do comportamento alimentar, principalmente no que diz respeito a sua sensibilidade em responder aos estímulos alimentares e determinar o início, o término, bem como tamanho das refeições (Grill; Hayes, 2009; Grill; Kaplan, 2002; Grill, 2006, 2010).

O NTS além de integrar as informações periféricas provenientes do trato gastrointestinal, pâncreas e tecido adiposo, é responsivo a estímulos gustatórios e a informações relacionadas à motivação e recompensa (Grill; Hayes, 2009; Grill, 2006; Kenny, 2011). Além disso, mantém conexões diretas e recíprocas com outras estruturas encefálicas envolvidas no controle da ingestão e balanço energético como o núcleo accumbens, vários núcleos hipotalâmicos, a amígdala, a área tegumentar ventral, o núcleo dorsal da rafe e a área postrema (Berthoud, 2002; Grill, 2010; Rinaman, 2010). Este núcleo possui ainda um importante conjunto de neurônios e circuitos que participam do controle da ingestão, digestão e absorção dos alimentos (Berthoud, 2004). O NTS expressa uma variedade de receptores e

peptídeos relacionados ao controle da alimentação, tais como a colecistocinina (CCK), peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), leptina, nefastina, urocortina, ghrelina e galanina (Ellacott et al, 2006; Hayes et al., 2010; Huo et al., 2008). Além destes, estudos têm evidenciado a presença de sítios pós-sinápticos para a ação da serotonina (Feldman, 1994) e diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos, tais como 5-HT1A/B (Manaker and Verderame, 1990; Thor et al., 1992), 5-HT2A/C (Pompeiano et al., 1994), 5-HT3 (Steward et al., 1993), 5-HT5A (Oliver et al., 2000), 5-HT6 (Garfield et al, 2014) e 5-HT7 (Gustafson et al., 1996) já foram identificados no NTS.

Há mais de quatro décadas a serotonina vem sendo apontada como um importante neurotransmissor envolvido no controle da saciedade (Voigt; Fink, 2015). Seu efeito hipofágico foi estudado a partir de vários modelos animais e atualmente compreende-se, parcialmente, como esse efeito é mediado. Em regiões como hipotálamo, sabe-se que a ação combinada da serotonina sobre receptores 5-HT1B e 5-HT2C situados em populações de neurônios consideradas chaves para o controle do comportamento alimentar resulta em redução do consumo alimentar e promoção da saciedade (De Vry; Schreiber, 2000; Heisler et al, 2006; Magalhães et al, 2010; Voigt; Fink, 2015). Devido a seu importante papel saciogênico, a serotonina vem sendo objeto de particular interesse de diversas pesquisas, principalmente daquelas que estudam os efeitos de manipulações durante os estágios iniciais do desenvolvimento sobre a maturação das vias associadas ao controle do comportamento alimentar e suas possíveis correlações com desordens metabólicas na vida adulta (Resnick; Morgane, 1984; Hernandez et al., 1989; Manjarrez et al., 1993; Lopes de Souza et al., 2008; Manuel-Apolinar et al, 2014)

Nos últimos anos, relevantes estudos epidemiológicos e experimentais tem ressaltado a participação dos estímulos ambientais, particularmente o nutricional, durante os estágios iniciais do desenvolvimento sobre o aparecimento de desordens metabólicas na idade adulta. Esses estudos conduziram à formulação da hipótese da “Plasticidade Fenotípica”, que propõem que a exposição a um inadequado ambiente nutricional é capaz de aumentar a suscetibilidade de desenvolver doenças na idade adulta (Lucas, 1991; Hales; Barker, 1992). Ainda segundo essa hipótese, essa suscetibilidade surge quando as adaptações fisiológicas e metabólicas, realizadas pelo organismo em formação para assegurar sua sobrevivência em um ambiente adverso, se tornam incompatíveis com o novo ambiente nutricional em que se encontra (Lucas, 1991; Hales; Barker, 1992, Gluckman et al, 2010).

Está bem estabelecido pela literatura que o aporte nutricional inadequado ainda durante o período perinatal está associado ao risco aumentado de obesidade, doenças cardiovasculares e

diabetes na vida adulta. Além disso, em animais, a restrição alimentar, seja proteica ou calórica, correlaciona-se com hiperfagia, aumento persistente dos níveis de serotonina encefálica e maior preferência por alimentos palatáveis. Assim como está relacionada ainda, ao retardo no disparo da saciedade associado à hiperfagia e a redução dos efeitos anorexígenos da serotonina devido à dessensibilização dos receptores 5-HT1B (Bellinger, et al., 2004, 2006; Yamamoto, 2006; Lopes de Souza et al., 2008; Orozco-Solís, et al., 2009).

Os conhecimentos acerca dos efeitos da manipulação nutricional precoce, tal como a desnutrição perinatal, sobre as vias relacionadas ao controle do comportamento alimentar e suas implicações no aparecimento de desordens metabólicas na vida adulta, quanto as vias neurais que regulam a ação anorexígena da serotonina, estão bem estabelecidos para regiões como hipotálamo, sendo incipiente para áreas como o NTS. Assim o aprofundamento das contribuições do NTS para esse processo é de extrema importância para se compreender um pouco mais como a desnutrição perinatal pode interferir na habilidade desta região em controlar o balanço energético, assim como o papel da serotonina nesse processo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O Núcleo do trato solitário participa do controle distribuído do comportamento alimentar.

A perspectiva da regulação neural distribuída do comportamento alimentar é algo relativamente recente. Por muito tempo perdurou na comunidade científica a ideia de que o hipotálamo era o único centro regulador do comportamento ingestivo (Grill; Kaplan, 2002; Young, 2012).

As características essenciais do modelo hipotalâmico do controle do comportamento alimentar foram articuladas entre as décadas de 30 e 50 a partir de estudos envolvendo lesões em determinadas áreas hipotalâmicas. Neste modelo, o tronco encefálico e, conseqüentemente o núcleo do trato solitário, não era considerado uma região independente atuante regulação do comportamento alimentar, mas sim dependente do comando do hipotálamo que compreendia o topo hierárquico do controle do comportamento alimentar (Grill; Hayes, 2009; Grill; Kaplan, 2002; Grill, 2010).

Somente com o advento dos marcadores neurais na década de 70, tornou-se claro que o hipotálamo não atuava de forma isolada, mas sim em conjunto com outras áreas encefálicas com as quais mantinha conexões recíprocas (Berthoud, 2004).

Assim, a capacidade do NTS em orquestrar o comportamento alimentar foi examinada a partir de uma série de estudos iniciados no final da década de 70 por Grill e Colaboradores (Berthoud, 2004; Grill, 2006). Esses autores observaram que animais cronicamente descerebrados, ou seja, que perderam cirurgicamente a comunicação entre tronco encefálico e hipotálamo, submetidos à infusão intra-oral de dieta líquida apresentavam um repertório de mecanismos integrativos independentes da função hipotalâmica que incluíam a capacidade de discriminar diferentes estímulos palatáveis através das respostas de aceitação ou rejeição do alimento (Grill; Norgren, 1978), de gerar resposta simpato-adrenais antagônicas a glicoprivação (Dirocco; Grill, 1979) e respostas ingestivas a hipoglicemia induzida pela insulina (Flynn; Grill, 1983). Além de induzir normalmente a saciedade em resposta a presença de hormônios e peptídeos gastrointestinais e distensão gástrica, e de gerar respostas simpáticas relacionadas à severa depleção energética (Grill; Smith, 1988; Seeley et al, 1994). Além disso, animais descerebrados quando confrontados com diferentes concentrações de solução de sacarose realizavam escolhas semelhantes a animais neurologicamente intactos, sugerindo um comportamento orientado de recompensa dependente de um processo de comparação envolvendo a memória a curto prazo (Grigson et al., 1997). No entanto,

diferentemente de animais neurologicamente intactos, animais descerebrados não respondiam à privação alimentar aumentando a ingestão de alimentos em uma refeição ou em um período de 24 horas (Grill; Kaplan, 2002; Seeley et al, 1994).

A partir destes estudos tornou-se evidente que (1) o NTS, em isolamento, é suficiente para controlar o término da refeição, (2) essa região apresenta os comportamentos básicos associados à saciedade e (3) a incapacidade de animais descerebrados em aumentar adequadamente o tamanho da refeição em resposta à privação alimentar, sugere que o NTS, em isolamento, não é capaz de responder a um desafio homeostático a longo- prazo (Berthoud, 2004; Grill; Hayes, 2009; Grill; Kaplan, 2002; Grill, 2006, 2010).

Desde os estudos pioneiros de Grill e colaboradores, inúmeras outras evidências acerca da participação do NTS no controle do comportamento alimentar foram sendo obtidas. Ao longo de quase 40 anos de pesquisa já se reconhece que o NTS recebe e processa uma variedade de sinais relacionados ao estado energético dos organismos, as vias, projeções e populações de neurônios que estão implicadas na detecção e integração de tais sinais e como a informação processada no NTS é distribuída as demais regiões encefálicas envolvidas no controle do comportamento alimentar (Grill; Hayes, 2012; Grill, 2010; Schwartz; Zeltser, 2013).

Todas essas regulações sobre a alimentação realizadas pelo NTS serão abordadas nos tópicos subsequentes.

2.2 O NTS expressa diversos peptídeos e receptores associados ao comportamento alimentar.

O NTS, localizado na porção dorsomedial da medula oblonga, é uma estrutura formada por um agregado de corpos celulares neurais dispostos na forma de Y que se estende como uma coluna bilateral desde o nível do polo caudal do núcleo motor do nervo facial até a porção posterior do óbex, onde as duas colunas se unem para formar uma única estrutura, na linha média, que continua caudalmente até a parte caudal da decussação piramidal (Barraco et al., 1992; Ciriello et al, 1994; Rubio-Navarro et al, 2011; Young, 2012).

Devido ao fato desta região está implicada na recepção e integração de importantes informações cardiovasculares, respiratórias, gastrointestinais e gustatórias, e dado a sua proximidade com a área postrema, é comum a sua subdivisão, levando-se em consideração a sua orientação rostro-caudal, em três regiões principais: rostral (rNTS), medial (mNTS) e caudal (cNTS) (Figura 1). Assim, a porção mais rostral do NTS (rNTS) está associada a recepção das informações gustatórias, enquanto que as porções medial e caudal estão mais

envolvidas na recepção das informações cardiorrespiratórias e gastrointestinais (Barraco et al., 1992; King, 2007; Rubio-Navarro et al, 2011; Young, 2012)

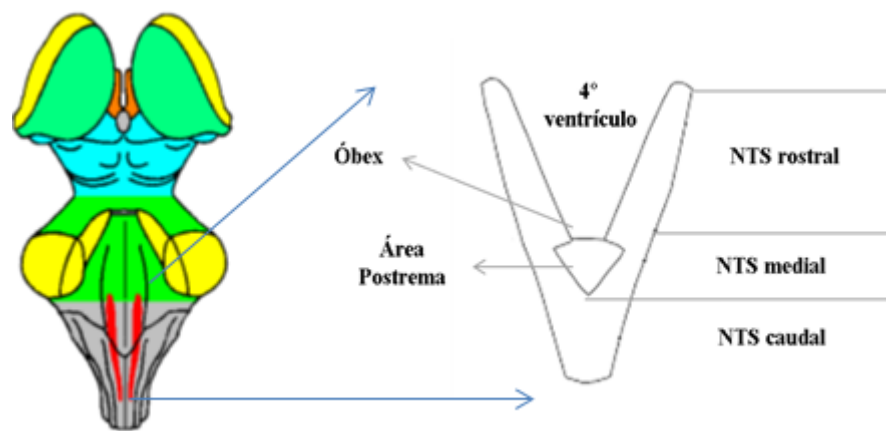


Figura 1- Representação esquemática da subdivisão do NTS em seu eixo rostrocaudal. Fonte: Adaptação de Liu et al, 2000 e Loewy AD, 1990.

Essa variedade de informações que chegam e são processadas pelo NTS são reflexos da sua heterogeneidade neuronal (Rui, 2013). Este núcleo é constituído por uma variedade de células/neurônios que diferem entre si em sua forma, tamanho, orientação e coloração (Barraco et al, 1992). Levando-se em consideração essas diferenças é possível observar regiões ou subnúcleos evidentes que em conjunto compõem a citoarquitetura do NTS.

Embora a nomenclatura possa variar, em geral, são reconhecidos os seguintes subnúcleos: *Comissural* (SOLC)- localizado entre o canal central e a área postrema e constituído por um conjunto de pequenos neurônios ovalados; *medial* (SOLM)- composto por neurônios de forma elíptica de tamanho médio e com núcleo central distinto, sendo considerado o maior e mais proeminente subnúcleo do NTS; *dorsomedial* (SOLDM)- que corresponde a uma coleção de neurônios em forma de lágrimas e orientados na direção mediolateral e dorsal ao subnúcleo e o *intermediário* (SOLIM)- corresponde a um aglomerado de células compactas e alongadas orientadas paralelamente a borda medial do trato solitário, localiza-se entre o subnúcleo medial e o trato solitário, sendo o subnúcleo mais proeminente na porção rostral e medial do NTS (Altschuler et al, 1989; Herbert et al, 1990; Ciriello et al, 1994; Paxino; Watson, 2005).

Além destes, também são distinguidos no NTS os subnúcleos: *central* (SOLCE)- constituído por um conjunto de pequenos neurônios arredondados que podem ser facilmente distinguidos por coloração de Nissl, devido ao denso aglomerado de seus corpos celulares. Este subnúcleo é seletivamente innervado por neurônios do núcleo retrofacial e ambíguo;

ventral (SOLV)- composto por células multipolares de tamanho médio; *ventrolateral* (SOLVL)- composto tanto por neurônios grandes de coloração intensa, quanto pequenos neurônios levemente corados e que se distribuem ao longo do eixo rostrocaudal e o *intersticial* (SOLI)- consiste em um conjunto de pequenos neurônios ovoides reconhecidos em todos os níveis do NTS (Altschuler et al, 1989; Herbert et al, 1990; Ciriello et al, 1994; Paxino; Watson, 2005).

Por fim, podemos encontrar ainda os subnucleos *lateral* (SOLL), constituído pela presença de neurônios elípticos de tamanho pequeno a médio e coloração intensa que, assim como o subnúcleo intersticial, é proeminente em todos os níveis do NTS; *dorsolateral* (SOLDL) que corresponde um componente do subnúcleo lateral que se estende dorsolateralmente ao NTS e o *gelatinoso* (SOLG), localizado medial ao subnúcleo medial, no mesmo nível do subnúcleo central e que consiste numa coleção de neurônios relativamente pequenos, de coloração menos intensa e orientados paralelamente a superfície do quarto ventrículo (Altschuler et al, 1989; Herbert et al, 1990; Ciriello et al, 1994; Paxino; Watson, 2005).

Apesar do NTS organizar-se em subnúcleos distintos, estes não necessariamente estão diretamente implicados em um função específica, isto porque, no NTS os neurônios apresentam um certo grau de sobreposição de forma que uma mesma sub-região recebe diferentes entradas aferentes periféricas, podendo assim controlar múltiplas funções (Paton, 1999; Baptista et al, 2005).

A identificação dos “tipos” celulares presentes no NTS é importante não só para facilitar nossa compreensão da organização deste núcleo, como também para nos fornecer uma base importante para a análise das possíveis relações entre estrutura e função (Schweitzer et al, 1995; Paton, 1999; Baptista et al, 2005). Desta forma, as pesquisas nesta área de conhecimento têm direcionado suas atenções para esse propósito.

Assim no NTS já é possível reconhecer a presença de diferentes tipos de peptídeos, neurotransmissores e populações de neurônios que estão envolvidos no controle das funções gastrointestinais e associadas ao controle do comportamento alimentar (Berthoud, 2004; Migita et al, 2001; Ellacott; Cone, 2004; Huo et al., 2008; Blevins; Baskin, 2010)

Evidências mostram que assim como o hipotálamo, o NTS também contém populações de neurônios que expressam importantes peptídeos no controle do comportamento alimentar como o neuropeptídeo Y (NPY), a proopiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) (Berthoud, 2004; Ellacott; Cone, 2004; Sánchez-Lashera et al, 2010). Dentre todos estes, a proopiomelanocortina é a melhor caracterizada no

NTS, embora, ainda seja necessário uma melhor compreensão de como ocorre a sua sinalização nesta região. Neurônios que expressam CART e NPY estão presentes nos subnúcleos medial e intersticial do NTS, respectivamente, mas suas vias de sinalização ainda são desconhecidas (Berthoud, 2004; Migita et al, 2001; Blevins; Baskin, 2010; Armbruszt et al, 2013).

Estudos utilizando as técnicas de imunohistoquímica e reação em cadeia polimerase (PCR), evidenciaram que no NTS, os neurônios que expressam POMC estão localizados em uma pequena região deste núcleo, a comissural (Ellacott; Cone, 2004). Além disto, estes estudos também demonstraram que os neurônios do NTS expressam uma quantidade moderada de receptores melanocortinérgicos MC4-R (Adan et al., 2006; Ellacott; Cone, 2004). Administração no 4º ventrículo ou diretamente no NTS de agonistas (MTII) e antagonista (SHU9112) dos receptores melanocortinérgicos MC3-R /MC4-R promovem redução e aumento do consumo alimentar, respectivamente, mostrando que este sistema desempenha um papel importante na regulação homeostática no NTS (Grill et al., 1998).

Embora se reconheça existência de neurônios POMC intrínsecos ao NTS, evidências mostram que este núcleo recebe projeções proopiomelanocortinérgicas originadas do hipotálamo, particularmente, do núcleo arqueado (Grill; Hayes, 2012). Além disso, o homônimo estimulado do melanócito alfa (α -MSH) contém fibras imunorreativas que estão em estreita proximidade neuroanatômica ao NTS, podendo ser ativadas por distensão gástrica, sugerindo um circuito neural que poderia permitir a modulação melanocortinérgica a partir dos sinais ascendentes intestinais (Ellacott; Cone, 2004). Consistente com esta sugestão, Fan et al., (2004) demonstraram que os neurônios POMC do NTS são ativados por administração periférica de CCK e que a ativação neuronal do receptor MC4-R é necessária para a indução da supressão da alimentação realizada pela CCK.

Receptores para CCK também são observados no NTS, particularmente nos subnúcleos medial e dorsomedial (Herbert et al, 1990; Mercer et al, 2000). Este peptídeo intestinal inibe o consumo alimentar reduzindo o tamanho e a duração da refeição. Seus efeitos inibitórios sobre o consumo alimentar parecem ser mediados e dependentes da interação com outros peptídeos e neurotransmissores relacionados ao comportamento alimentar e também presentes no NTS (Schwartz, 2006). Um exemplo disto é a interação entre o CCK e a serotonina (5-HT) que atuam de forma sinérgica na supressão do consumo alimentar através da ativação simultânea de receptores CCK-1 e 5-HT₃. Estudos evidenciaram que o bloqueio sistemático destes receptores está envolvido na atenuação do efeito supressor da alimentação do CCK, o que reforça a ideia de inter-relação dos receptores

do CCK e serotonina (Aja, 2006; Hayes; Covasa, 2005). Uma melhor caracterização da participação da serotonina na via de sinalização anorexígenas mediada pelo NTS será mais bem abordada no tópico subsequente.

Além disto, o CCK ativa os neurônios catecolaminérgicos, os que expressam NPY e GLP-1 no NTS e estes se projetam para a região paraventricular do hipotálamo (PVN). A saciedade induzida pelo CCK parece ser ainda dependente da interação deste peptídeo com os receptores da leptina, o que foi evidenciado a partir de estudos que mostram que a administração simultânea de leptina e CCK aumenta a expressão de Fos no NTS e PVN (Blevins; Baskin, 2010).

Além destes peptídeos mencionados, o NTS também contém populações específicas de neurônios que expressam receptores funcionais para outros peptídeos e hormônios tanto estimuladores do apetite como ghrelina e galanina quanto indutores de saciedade como leptina, nefastina e urocortina (Ellacott; et al, 2006; Hayes et al., 2010; Huo et al., 2008) que são capazes de modular determinados aspectos do comportamento alimentar que regulam a curto-prazo o início, o término, bem como o tamanho das refeições (Emond et al, 2001; Huo et al, 2006; Li et al., 2007).

Embora NTS contenha populações de neurônios que respondem a sinais orexígenos a maioria dos peptídeos que se expressam nesta região são anorexígenos, evidenciando que a regulação do comportamento ingestivo neste núcleo é realizada principalmente pela via de sinalização anorexígena, sendo o NTS responsável por responder apropriadamente aos sinais neuro-hormonais de feedback negativo originados na periferia do corpo (Berthoud, 2002; Faipoux et al., 2008; Grill; Hayes, 2009; Grill; Kaplan, 2002; Koegler; Ritter, 1998; Lutz et al., 1998; Menani et al., 1996; Williams et al, 2009).

2.3 O NTS é densamente innervado por terminais serotoninérgicos e expressa diversos receptores para serotonina.

O NTS é uma estrutura complexa que apresenta uma variedade de peptídeos e neurotransmissores, como foi mencionado no tópico acima. Dentre estes, a serotonina merece destaque, não somente por ser um dos neurotransmissores mais antigos e filogeneticamente conservados, mas por sua diversidade de funções, especialmente aquelas relacionadas ao comportamento alimentar e promoção da saciedade (Venter et al, 1988; Hen, 1992; Voigt; Flick, 2015)

Desde a descoberta da serotonina, a mais de 50 anos, um grande volume de estudos relacionados à distribuição e propriedades fisiológicas e farmacológicas desta substância já

foram realizados (Rapport, 1949; Kapczinski et al., 1998; Vergé; Calas, 2000). Estes estudos ganharam particular destaque no início dos anos 50, quando este composto foi encontrado no sistema nervoso de vertebrados e invertebrados (Twarong, 1954; Woolley; Shaw, 1954; Kapczinski et al., 1998; Whitaker-Azmitia, 1999).

Hoje já se reconhece que a 5-HT é uma indolamina amplamente distribuída na natureza, estando presente em praticamente todos os organismos e exercendo as mais diversas funções biológicas (Villalón et al. 1997; Azmitia, 2007; Voigt; Fink, 2015). O grande número de famílias e subtipos de receptores para serotonina, além da complexa inervação serotoninérgica no encéfalo de mamíferos, possivelmente pode explicar porque este neurotransmissor está envolvido em muitos comportamentos (Voigt & Fink, 2015).

Os primeiros estudos relacionando a serotonina ao consumo alimentar, mas particularmente seu efeito saciogênico, tiveram início na década de 60, desde então este campo de pesquisa alcançou grande avanço (Voigt & Fink, 2015). A combinação da abordagem farmacológica e o aumento da disponibilidade de agonistas e antagonistas seletivos para serotonina, assim como a utilização de técnicas transgênicas e da biologia molecular permitiram não só a identificação dos receptores serotoninérgicos específicos envolvidos no controle do comportamento alimentar, como também tem possibilitado elucidar as vias de sinalização utilizada para realizar tal função (Halford et al, 1998; De Vry; Schreiber, 2000; Voigt & Fink, 2015).

Reconhece-se na literatura a participação dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} na mediação da saciedade endógena. Ambos receptores estão envolvidos na redução do consumo alimentar (hipofagia): a estimulação do 5-HT_{2C} parece estar relacionada a inibição da taxa de alimentação, enquanto que o 5-HT_{1B} parecem mediar a duração da alimentação. Além disto, estes receptores parecem atuar de modo compensatório, de forma que o controle serotoninérgico da alimentação é expresso quando ambos estão ativados (Simansky, 1996; Dalton et al, 2006; Heisler et al, 2006).

Além destes, os receptores 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₆ também vêm sendo implicado como possíveis candidatos na via de promoção de saciedade exercida pela serotonina (Hayes; Covasa, 2005; Garfield et al, 2014; Voigt; Fink, 2015). Entretanto, comparados aos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}, as evidências acerca da efetiva participação destes receptores ainda são incipientes. É importante destacar que diferentemente dos demais receptores serotoninérgicos envolvidos no controle da saciedade que, em geral, são ativados para exercer suas funções, é a inativação do 5HT₆ que parece mediar os efeitos saciogênicos da serotonina (Garfield et al, 2014).

Os receptores serotoninérgicos implicados no controle da saciedade apresentam uma diversificada distribuição no sistema nervoso central. Estes foram mais bem caracterizados no hipotálamo, particularmente no núcleo arqueado, paraventricular e na área hipotalâmica lateral. Entretanto, outras regiões encefálicas, tais como o tronco encefálico e, mais precisamente, o NTS também apresentam sítios pós-sinápticos e receptores específicos para a ação da serotonina (Feldman, 1994).

Estudos utilizando técnicas de imunohistoquímica e autorradiografia demonstraram que o NTS, particularmente os subnúcleos ventral, ventrolateral, intermediário e medial contêm uma densa rede de fibras e terminais serotoninérgicos, originados em sua maioria nos núcleos magno e dorsal da rafe. Muito embora, esses terminais também possam ser provenientes de corpos celulares do gânglio nodoso e de neurônios próprios do NTS (Calza et al, 1985; Leslie, 1985; Schaffar et al, 1988; Austegen et al, 2012).

Diferentes receptores serotoninérgicos foram identificados no NTS inclusive aqueles relacionados a saciedade como 5-HT1A/B (Manaker and Verderame, 1990; Thor et al., 1992), 5-HT2A/C (Pompeiano et al., 1994), 5-HT3 (Steward et al., 1993), 5-HT5A (Oliver et al., 2000), 5-HT6 (Garfield et al, 2014) e 5-HT7 (Gustafson et al., 1996). A organização e distribuição destes receptores por subnúcleos específicos no NTS ainda não são bem conhecidos, exceto para o receptor 5-HT1B que apresenta uma densidade de alta a moderada no subnúcleos ventrolateral, central, dorsolateral, intermediário e medial (Manaker and Verderame, 1990).

De uma forma geral, acredita-se que a serotonina atue no NTS integrando os sinais periféricos de saciedade através da modulação dos receptores 5-HT2C e 5-HT3 (Madza et al, 2004; Hayes e Covasa, 2005; Assarian, 2009; Voigt e Fink, 2014). Este último receptor, além de participar do controle do tamanho da refeição, medeia a resposta de saciedade induzida pelo CCK e distensão gástrica (Madza et al, 2004; Hayes e Covasa, 2005). Entretanto, a maneira pela qual este neurotransmissor atua nestes receptores e como ele recruta os neurônios serotoninérgicos para mediar as suas ações anoréticas ainda é pouco conhecida.

2.4 O NTS recebe, integra e processa os sinais relacionados à alimentação.

Dentre as diferentes regiões encefálicas que contribuem para o controle balanço energético, o NTS sem dúvida recebe e processa uma variedade enorme de sinais relacionados ao estado energético do organismo (Berthoud, 2004; Schwartz, 2006; Schwartz; Zeltser, 2013).

Os sinais processados pelo NTS são originados primariamente da cavidade oral e do trato gastrointestinal. (Rinaman, 2010; Kenny, 2011; Grill; Hayes, 2012). A recepção das informações provenientes do trato gastrointestinal pelo NTS é mediada através das aferências vagais em resposta a distensão gástrica mecânica e volumétrica. Estas parecem envolver, respectivamente, a transmissão vagal-glutamatérgica e a sinalização serotoninérgica mediada pelos receptores 5-HT₃ que se expressam nos terminais dendríticos periféricos da aferência vagal que inervam o estômago (Schwartz, 2006; Grill; Hayes, 2012).

Além da distensão gástrica, as propriedades químicas e nutritivas dos alimentos também são capazes de estimular o NTS, uma vez que estimulam a liberação de uma variedade de neurotransmissores e peptídeos intestinais como CCK, GLP-1, PYY, serotonina, glutamato, entre outros. Enquanto a maioria dos receptores destes peptídeos é expressa no encéfalo, sob condições fisiológicas normais, a disponibilidade dos níveis circulantes desses sinais químicos parecem não se elevarem suficientemente para terem ação direta no encéfalo. Ao invés disso, a maioria dos sinais provenientes do trato gastrointestinal se comunica com o NTS através da ativação do tipo parácrina de receptores específicos que se expressam nos terminais dendríticos das aferências vagais (Hayes et al., 2010; Moran, 2006; Ritter, 2004; Smith, 1996).

Esses sinais relacionados à alimentação que chegam até o NTS pode ser integrado ou pelo próprio núcleo, ou pela interação com outras áreas encefálicas relacionadas ao controle do comportamento alimentar, particularmente o hipotálamo (Schwartz, 2006).

O exemplo mais importante da capacidade integrativa própria do NTS é a que envolve o CCK e a distensão gástrica (Grill; Hayes, 2012). Estudos mostraram que uma única fibra aferente vagal é responsiva tanto ao CCK quanto a distensão gástrica e que a ação conjunta destes sinais periféricos contribui para o aumento da supressão do consumo alimentar (Schwartz e Moran, 1996; Moran et al., 2001; Ritter, 2004). Sob condições fisiológicas normais, o CCK suprime o esvaziamento gástrico, aumentando temporariamente a distensão gástrica. É importante notar, no entanto, que os receptores CCK-1 não medeiam a sinalização neuronal relacionada à distensão gástrica (van de Wall et al., 2005.; Yoshida-Yoneda et al., 1996). Portanto, as interações vagais entre CCK e distensão gástrica provavelmente envolve a participação de outros sinais de saciedade derivados do trato gastrointestinal, tais como a 5-HT, que parece ser liberada tanto em resposta a distensão gástrica (Mazda et al., 2004) quanto pela interação com o CCK para reduzir a ingestão alimentar (Hayes; Covasa, 2005).

No que diz respeito à interação com outras áreas encefálicas, o NTS apresenta uma vasta projeção ascendente para diversas áreas encefálicas como amígdala, núcleo acumbens,

área tegmentar ventral e diversas áreas hipotalâmicas (Rinaman, 2010). As relações entre hipotálamo- NTS são mais bem delimitadas pela literatura (Rinaman, 2010). Essas regiões mantêm conexões diretas e recíprocas permutando e integrando as diversas informações relacionadas ao controle da ingestão de alimentos. As principais áreas hipotalâmicas que se projetam para o NTS são o hipotálamo lateral (HL), paraventricular (PVN) e arqueado (ARC) (Rinaman, 2010, Grill; Hayes, 2012).

As fibras do hipotálamo lateral que expressam orexina projetam-se para os neurônios catecolaminérgicos do NTS onde parecem atuar na atenuação dos sinais de saciedade gastrointestinais mediados pelas aferências vagais. Isto é evidenciado, a partir de estudos que mostram que a estimulação elétrica do hipotálamo lateral inibe os neurônios da porção medial do núcleo do trato solitário e que as respostas excitatórias a distensão gástrica ou intestinal no NTS é revertida pela concorrente estimulação (elétrica ou glutamatérgica) do hipotálamo lateral (Jiang et al., 2003; Zheng et al., 2005; Puska' s et al., 2010).

A integração NTS-Hipotálamo pode ser ainda observada na sinalização hipotalâmica da leptina (Zheng et al., 2010). A projeção de axônios do NST para os neurônios melanocortinérgicos do arqueado parece ser um dos contribuidores dos circuitos neurais que medeiam o efeito supressivo da leptina sobre o consumo alimentar, uma vez que a injeção de antagonista do receptor MC4-R no NTS atenua o efeito supressivo da leptina hipotalâmica sobre o consumo alimentar (Zheng et al., 2010). Os neurônios proopiomelanocortinérgico parecem ainda contribuir de outra forma para a essa sinalização. E envolve a projeções para o PVN que por sua vez se projeta para o NTS (Liu et al, 2003).

Como pode ser observado, a capacidade de integração é uma característica marcante do NTS, e embora se conheça algumas vias de integração, outras vias como as que relaciona NTS e regiões mesolímbicas devem ser investigados para determinar a extensão, os tipos de integração neural e suas consequências comportamentais para o controle do comportamento alimentar (Schwartz, 2006).

2.4 A função do NTS no controle do comportamento alimentar é possivelmente vulnerável as influências de estímulos perinatais

A ideia de que a exposição a ambientes hostis ainda durante a vida intrauterina e pós-natal pode predispor o organismo a desenvolver doenças metabólicas na vida adulta, em particular a obesidade, já está bem estabelecida na literatura (Bellinger et al, 2007; Gluckman et al, 2010; Hales; Barker, 2001; Patel; Srinivasan, 2011; Vieu, 2011). Um grande corpo de

evidências aponta a desnutrição, seja calórica ou proteica, como importante indutor de alterações morfofisiológicas e comportamentais que podem conduzir ao desenvolvimento destas desordens (Castro et al., 1998; Desai et al., 2005; Li et al., 2011).

Além de promover alterações no desenvolvimento sensório-motor, déficit de aprendizado e memória (Morgane et al., 2002), diminuição das medidas craniais e do encéfalo (Magalhães et al., 2006), anormalidades cardiovasculares (Toscano et al., 2008), entre outras desordens, a desnutrição nas fases iniciais da vida também está associada a modificações nas vias e estruturas que controlam o balanço energético e o comportamento alimentar (Lopes de Souza et al., 2008; Orozco-Sólis et al., 2009).

Modelos animais para desnutrição demonstram que a exposição precoce a dietas com baixo teor de proteínas ou calorias induz a hiperfagia, preferência por alimentos palatáveis, redução do peso corporal e retardo na saciedade acompanhada do aumento do tamanho das refeições (Bellinger et al., 2007; Desai et al., 2005; Lopes de Souza et al., 2008; Orozco-Sólis et al., 2009). Após a manipulação nutricional perinatal ainda são observadas alterações nos níveis de insulina, leptina e de neurotransmissores como dopamina, relacionados à motivação e recompensa e serotonina, cujos níveis hipotalâmicos se encontram elevados em organismos desnutridos (Orozco-Solís et al., 2009; 2011; Remmers; Delemarre-Vn de Waal, 2011). Além disto, também são observadas reduções no número de neurônios que expressam galanina, e o neuropeptídeo Y (NPY) no núcleo arqueado do hipotálamo, alterações nos níveis de vários peptídeos que modulam a alimentação como o NPY, POMC, CCK e alterações circadianas contribuindo para as alterações na alimentação e no metabolismo energético, o que pode favorecer ao desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta (Lopes de Souza et al., 2008; Orozco-Sólis et al., 2009; 2011).

Grande parte das pesquisas que estudam essa temática relacionam os efeitos adversos de ambientes nutricionalmente inadequados sobre estruturas como o hipotálamo, responsável pelo controle do balanço energético (Ahima; Hileman, 2000; Grove et al., 2001; Nowak; Gore, 1999; Ong et al., 2000; Orozco-Solís et al., 2009; 2011; Swithers, 2003).

Embora NTS desempenhe um papel fundamental no controle do balanço energético, as informações disponíveis sobre as consequências a longo prazo da ingestão nutricional inadequada nos primeiros estágios de desenvolvimento na capacidade desse núcleo em regular comportamento alimentar ainda é escassa. Rubio et al., (2004) utilizando o modelo de restrição alimentar perinatal através da redução da ingestão de alimentos durante a gravidez e o período de lactação, encontraram alterações na morfologia dos neurônios do NTS, que se tornam hipotróficas em comparação com os controles. Apesar do fato deste trabalho não ter

mostrado a relação direta entre a desnutrição e suas consequências sobre a capacidade de NTS em regular a ingestão de alimentos, ele é válido ao mostrar que NTS é uma estrutura suscetível a influências perinatais.

Além disto, Lira et al., (2014) investigando os efeitos da desnutrição perinatal sobre a capacidade do NTS em regular a ingestão alimentar observaram que esta manipulação precoce promove retardo na saciedade, aumento no tamanho e duração das refeições associados a hiperfagia e um consequente aumento do número de neurônios ativados nas porções rostral e medial do NTS, sugerindo que a restrição proteica nos estágios iniciais do desenvolvimento pode promover alterações nas vias de modulação do controle do comportamento alimentar mediado pelo NTS.

3. REVISÃO SISTEMÁTICA

Modulação anorética da serotonina no núcleo do trato solitário: uma revisão sistemática

Livia de Almeida Lira Falcão¹; Sandra Lopes de Souza²

1-Pos graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento-UFPE, Recife, PE

2-Departamento de Anatomia-UFPE, Recife-PE

RESUMO:

O núcleo do trato solitário (NTS) é uma importante região do tronco encefálico envolvida na recepção e no processamento de uma variedade de sinais provenientes tanto da cavidade oral quanto do trato gastrointestinal. Esse núcleo expressa receptores funcionais para vários peptídeo e hormônios indutores de saciedade, incluindo a serotonina. Especula-se que no NTS, a serotonina atue integrando os sinais periféricos de saciedade através da modulação dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT₃, porém a maneira pela qual a serotonina recruta tais neurônios para mediar suas respostas anorexígenas ainda não está bem estabelecida pela literatura. Assim, o objetivo desta revisão sistemática foi relacionar a função dos receptores serotoninérgicos no NTS sobre a modulação das respostas anoréticas do comportamento alimentar. A revisão consistiu de buscas nas bases de dados PUBMED, Isi Web of Science e Science Direct utilizando as palavras chaves nucleus of solitary tract, food intake, satiety, serotonin e caudal brainstem. Os artigos foram selecionados segundo critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos. Foram encontrados 1936 artigos, dos quais 12 foram selecionados para compor esta revisão. De forma geral, a análise dos estudos selecionados possibilitou observar que NTS é uma região importante para a sinalização anorexígena da serotonina que parece atuar na integração dos sinais periféricos de saciedade e exercer seus efeitos anoréticos pela ativação diferencial dos receptores 5-HT_{2C} e, particularmente 5-HT₃.

Palavras-chave: núcleo do trato solitário, serotonina, saciedade

INTRODUÇÃO

O núcleo do trato solitário (NTS) está localizado na porção dorsomedial da medula oblonga, exercendo importantes funções em diferentes níveis do controle do comportamento alimentar (Grill; Kaplan, 2001; Grill, 2006; Grill; Hayes, 2009; Grill, 2010). Este núcleo possui vasto conjunto de neurônios e circuitos que atuam diretamente no controle da ingestão e digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes (Berthoud, 2004). A primeira via de recepção e processamento de uma variedade de sinais provenientes da cavidade oral e do trato gastrointestinal é o NTS (Grill; Hayes, 2012; Kenny, 2011; Rinaman, 2010). Os sinais gerados em resposta a distensão gástrica e as propriedades químicas dos alimentos no trato gastrointestinal, são conduzidos através das aferências vagais até o NTS, onde estimulam populações específicas de neurônios capazes de modular determinados aspectos do comportamento alimentar que regulam a curto-prazo o início, o término, bem como o tamanho das refeições (Edmond et al, 2001; Huo et al, 2006; Schwartz, 2006; Li et al, 2007; Grill e Hayes, 2012).

Embora NTS contenha populações de neurônios que respondem a sinais de fome, a principal via de sinalização nesta região é de saciedade, sendo este núcleo responsável por responder apropriadamente aos sinais neuro-hormonais de feedback negativo originados na periferia do corpo (Menani et al, 1996; Koegler e Ritter, 1998; lutz et al, 1999; Berthoud, 2002; Grill e Kaplan, 2002; Grill e Hayes, 2009; Faipoux et al, 2008; Williams et al, 2009). Estudos demonstram que os neurônios do NTS expressam receptores funcionais para vários peptídeos e hormônios indutores de saciedade incluindo a colecistocinina (CCK) (Beinfeld e Palkovits, 1982), o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) (Gu et al, 2013), a leptina (Shioda et al, 1998) e a nefastina (Foo et al, 2008). Entre os neurotransmissores, foi evidenciada sítios pós-sinápticos para as ações da serotonina no NTS (Feldman, 1994), um importante neurotransmissor implicado no controle da saciedade (Voigt e Fink, 2014).

O NTS, particularmente os seus subnúcleos ventral, ventrolateral, intermediário e medial, são inervado por terminais serotoninérgicos originados, em sua grande maioria, nos núcleos da rafe. Muito embora, esses terminais também possam ser provenientes de neurônios próprios do NTS (Tekeanaka et al, 2011; Augsten et al, 2012). Diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos também já foram identificados nesta região incluindo: 5-HT1A/B (Manaker and Verderame, 1990;Thor et al., 1992), 5-HT2A/C (Pompeiano et al., 1994), 5-HT3 (Steward et al., 1993), 5-HT5A (Oliver et al., 2000), 5-HT6 (Garfield et al, 2014) e 5-HT7 (Gustafson et al., 1996).

Dentre os subtipos de receptores acima citados é possível observar que o NTS expressa receptores serotoninérgicos, particularmente, implicados no controle da saciedade como 5-HT1B e o 5-HT2C (Heisler et al, 2006). A maneira pela qual a serotonina atua nestes receptores para reduzir o consumo alimentar e promover a saciedade é bem compreendida no hipotálamo, onde os receptores 5-HT1B e 5-HT2C atuam de forma simultânea estimulando neurônios que co-expressam a proopiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), e inibindo neurônios que co-expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína agouti (AGRP). Parte do papel da serotonina sobre o comportamento alimentar vem da ação combinada nestas populações de neurônios promovendo a saciedade (Heisler et al, 2006; Magalhães et al 2010).

Porém, muito menos evidente é o entendimento da maneira pela qual a serotonina recruta os neurônios do NTS para mediar suas respostas anorexígenas. Apesar das evidências anatômicas indicarem a presença de terminais e receptores serotoninérgicos no NTS, o entendimento das contribuições deste neurotransmissor para o controle da saciedade nesta região ainda é incipiente (Feldman, 1994; Voigt e Fink, 2014). Especula-se que no NTS a serotonina atue integrando os sinais periféricos de saciedade através da modulação dos receptores 5-HT2C e 5-HT3 (Madza et al, 2004; Hayes e Covasa, 2006; Assarian, 2009; Voigt e Fink, 2014). Este último receptor encontra-se em abundância no NTS e está envolvido na regulação serotoninérgica da saciedade modulando sinais periféricos de distensão gástrica e da CCK (Madza et al, 2004; Hayes e Covasa et al, 2006; Voigt e Fink, 2014).

Devido ao fato do NTS ser a primeira via de recepção e integração da sinalização anorexígena e o sistema serotoninérgico ser um importante regulador do apetite e alvo farmacológico para o tratamento da obesidade, esta revisão sistemática buscou evidenciar a modulação dos receptores serotoninérgicos no NTS sobre as respostas anoréticas do comportamento alimentar.

MATERIAIS E MÉTODOS

A fim de se caracterizar a participação do NTS na promoção da saciedade mediada pela serotonina foi realizada uma revisão sistemática da literatura. Esse processo envolveu buscas eletrônicas nas bases de dados PubMed, Science Direct e ISI Web of Science, usando como descritores os termos em inglês food intake, satiety e serotonin e como termos livres, caudal brainstem e nucleus of solitary tract.

Essas palavras-chaves foram relacionadas entre si, formando 6 conjuntos de combinações a saber: “*Nucleus of the solitary tract*” AND “*Serotonin*”; “*Nucleus of solitary tract*” AND “*serotonin*” AND “*food intake*”; “*nucleus of solitary tract*” AND “*serotonin*” AND “*satiety*”; “*caudal brainstem*” AND “*Serotonin*”; “*caudal brainstem*” AND “*Serotonin*” AND “*food intake*”; “*caudal brainstem*” AND “*Serotonin*” AND “*satiety*”. Além disto, foram utilizadas ferramentas de refinamento em cada base de dados quando as mesmas estavam presentes.

As buscas foram realizadas no período de abril a maio de 2015 e os artigos foram selecionados segundo os seguintes critérios de inclusão previamente estabelecidos: (1) artigos originais, (2) publicados no idioma inglês, (3) e sem limite de tempo (4) metodologias envolvendo a experimentação em ratos e camundongos adultos e (5) estudos que correlacionem as respostas anoréticas da serotonina sobre a ingestão alimentar a ativação do NTS.

Foram excluídos desta revisão sistemática, estudos sem clareza metodológica, estudos puramente anatômicos, estudos envolvendo patologias associadas à disfunção do sistema serotoninérgico, estudos em animais jovens ou durante o período perinatal, estudos teóricos ou de revisão e cujo objetivo principal fosse outro que não a relação entre NTS, serotonina e comportamento alimentar.

Após as combinações dos termos em cada base de dado, foi realizada uma primeira avaliação dos artigos, de acordo com os títulos e resumos dos mesmos, sendo selecionados aqueles que preenchiam os critérios de inclusão acima citados. Posteriormente, esses artigos e àqueles que apresentaram dúvidas quanto o preenchimento de critérios, passaram por uma nova análise, agora tomando como base a leitura completa dos artigos, a fim de se confirmar a elegibilidade dos mesmos.

Os estudos selecionados nessa segunda triagem foram categorizados e analisados por dois pesquisadores independentes levando-se em consideração os parâmetros avaliados do trabalho, espécies e dietas utilizadas, os fármacos e peptídeos administrados, bem como suas respectivas doses, as principais técnicas usadas e os principais resultados obtidos.

RESULTADOS

Utilizando os seis cruzamentos acima citados, as buscas nas bases de dados resultaram em 1936 artigos potenciais, sendo deste total, 852 referências do PubMed, 345 do Isi Web of Science e 739 do Science Direct. Após a leitura dos títulos e resumos dos artigos foram

excluídos 1912 estudos, restando apenas 24 que passaram para a segunda etapa de avaliação (Figura 1). Nessa fase, a leitura completa dos estudos possibilitou a exclusão de 12 artigos por fuga do tema central desta revisão. A síntese das 12 referências selecionadas pode ser observada na tabela 1.

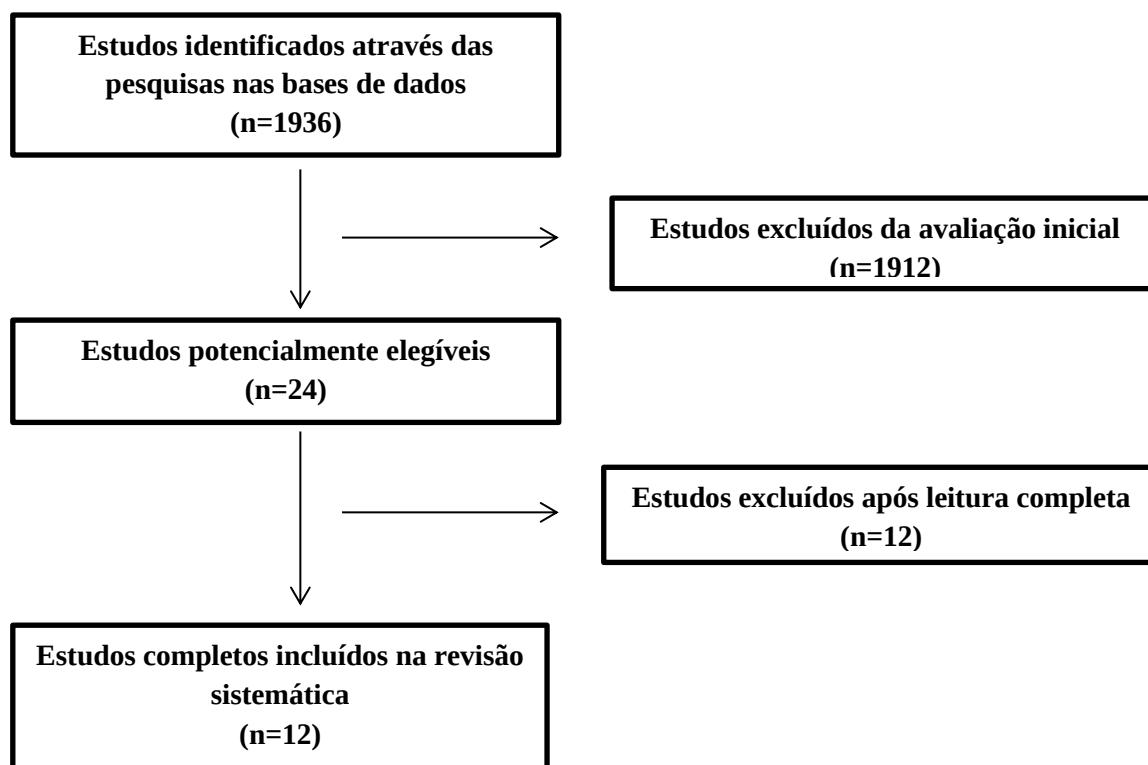


Figura 1- Representação esquemática do processo de seleção dos artigos.

Em geral, os artigos incluídos nesta revisão sistemática avaliaram as contribuições do NTS na mediação dos efeitos anorexígenos da serotonina. Quatro estudos avaliaram a participação dos receptores 5-HT₃ no controle da saciedade em resposta à distensão gástrica (Madza et al, 2004; Hayes e Covasa, 2006^a) e/ou à administração de CCK (Daughthers et al, 2001; Hayes e Covasa, 2006^b); três estudos avaliaram as respostas ingestivas de animais intactos e lesionados ou “cronicamente descerebrados” após administração de fenfluramina (Grill et al, 1997), do mCPP, um agonista do receptor 5-HT_{1B/2C} (Kaplan et al, 1998) ou do 8-OH-DPAT, um antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} (Edwards e Power, 1993); Quatro estudos avaliaram a modulação da concentração de serotonina e a ativação de discretas populações de neurônios no NTS em resposta a administração de CCK (Assarian, 2009; Engster et al, 2014), do mCPP (Lam et al, 2009) e do antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT₆ (Garfield, 2014) e um artigo analisou a participação do NTS na via de sinalização que resulta na excitação do PBN após ablação de neurônios que expressam AGRP.

Em relação às espécies animais, dez estudos utilizaram ratos, sendo nove da linhagem Sprague-Dawley (Edwards e Power, 1993; Grill et al, 1997; Kaplan et al, 1998; Daughters et al, 2001; Hayes e Covasa, 2006^a; Hayes e Covasa, 2006^b; Lam et al, 2009; Engster et al, 2014; Garfiel et al, 2014) e 1 da linhagem Wistar (Madza et al, 2004) e 2 estudos utilizaram camundongos como modelo animal (Assarian, 2009; Wu et al, 2012).

Quanto às drogas e vias de administração selecionadas pelos artigos incluídos, o antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT₃ foi o mais utilizado. Cinco estudos utilizaram este antagonista, sendo que 4 utilizaram a ondansetrona associada (Daughters et al, 2001; Hayes e Covasa, 2006^a; Hayes e Covasa, 2006^b) ou não (Wu et al, 2012) à CCK e 1 estudo administrou granisetrona. Também foram utilizadas: o mCPP associado (Kaplan et al, 1998) ou não (Lam et al, 2009) a mesulergina, um antagonista do receptor 5-HT_{1B/2C}; o 8-OH-DPAT, um antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} (Edwards e Power, 1993); a fenfluramina (Grill et al, 1997), o antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT₆ (Garfield et al, 2014) e a CCK-8S (Assarian, 2009; Engster et al, 2014)

Na maioria dos estudos a principal via de administração foi intraperitoneal, associada (Grill et al, 1997; Kaplan et al, 1998, Hayes e Covasa, 2006^b) ou não (Daughters et al, 2001; Hayes e Covasa, 2006^a; Assarian, 2009, Engster et al, 2014; Garfield et al, 2014) à administração no 4º ventrículo ou direto no NTS. Também foram empregadas administração subcutânea associada ou não a administração no 4º ventrículo (Edwards e Power, 1993; Wu et al, 2012), e a intravenosa (Madza et al, 2004/ Lam et al, 2009)

Em relação às análises e técnicas empregadas pelos estudos selecionados, o consumo alimentar correlacionado ou não com a ativação de populações específicas de neurônios no NTS através da técnica de imunohistoquímica foi o mais avaliado totalizando 9 estudos (Edwards e Power, 1993; Grill et al, 1997; Kaplan et al, 1998; Daughters et al, 2001; Hayes e Covasa, 2006^b; Assarian, 2009; Lam et al, 2009; Wu et al, 2012; Garfield et al, 2014). A Imunohistoquímica ainda foi utilizada por mais 3 estudos associada ou não a distensão gástrica (Madza et al, 2004; Hayes e Covasa, 2006^a; Engster et al, 2014).

Quanto aos principais resultados, quatro estudos selecionados demonstraram que a administração de agonistas serotoninérgicos sistêmica ou 4º ventrículo é capaz de reduzir o consumo alimentar (Edwards e Power, 1993; Grill et al, 1997; Kaplan et al, 1998) e ainda ativar de populações de neurônios catecolaminérgicos no NTS (Lam et al, 2009) Além disso, os estudos demonstraram que a serotonina está envolvida na mediação dos efeitos da CCK (Daughters et al, 2001; Hayes e Covasa, 2006^b; Assarian, 2009; Engster et al, 2014), e da distensão gástrica no NTS (Madza et al, 2004; Hayes e Covasa, 2006^a) e que o bloqueio dos

receptores 5-HT₃ presentes no NTS protege contra a severa inibição do consumo alimentar provocada pela ablação dos neurônios que expressam o AGRP (Wu et al, 2012). Também foi demonstrada a presença de receptores 5-HT₆ no NTS e seus efeitos hipofágicos (Garfield et al, 2014)

Tabela 1: Síntese dos estudos incluídos na revisão sistemática.

Referência	Parâmetro Avaliado	Espécie	Dieta	Droga	Dose	Via de administração	Técnicas/ Análises	Resultados
Edwards & Power, 1993	Respostas ingestivas de animais com lesões na AP/mNTS após tratamento com agonista 5-HT _{1A}	Macho Sprague-Dawley (N=5-10/grupo)	Padrão	8-OH-DAPT	50;100 e 200 ug/kg	Subcutânea	Consumo alimentar (6h)	Consumo alimentar inalterado após tratamento com 8-OH-DAPT em animais lesionados (AP/mNTS)
Grill <i>et al</i> , 1997	A contribuição do tronco encefálico caudal na ações anoréticas da d-Fenfluramina em ratos	Macho Sprague-Dawley (N=4-10/grupo)	Solução de glicose (12,5%)	Fenfluramina (FEN)	1,2,4,6,8mg/kg 60,120,240 e 480 ug	IP 4°ICV	Consumo alimentar (10min e 24 h)	Administração IP e 4° ICV de FEN suprime o consumo alimentar de animais intactos e descerebrados; Metergolina atenua o efeito da FEN sobre o consumo alimentar
				Metergolina	0,4mg/kg	IP		
Kaplan <i>et al</i> , 1998	Papel dos receptores serotoninérgicos do tranco encefálico caudal na mediação dos efeitos anorexígenos do agonista mCPP	Macho Sprague-Dawley (N=6-12/grupo)	Solução de glicose (12,5%)	mCPP	1;2;4;8mg/kg 10, 20 40, 80 ug/3ul	IP 4° ICV	Consumo alimentar (10min e 24 h)	mCPP IP ↓ consumo alimentar ar de animais intactos e descerebrados;mCPP 4°ICV ↓ consumo alimentar ar ; Mesulergina atenua efeito de mCPP
				Mesulergina	60ug/3ul	4° ICV		

Tabela 1: Síntese dos estudos incluídos na revisão sistemática (continuação).

Referência	Parâmetro Avaliado	Espécie	Dieta	Droga	Dose	Via de administração	Técnicas/ Análises	Resultados
Daughters et al, 2001	Efeitos do bloqueio do receptor 5-HT ₃ nas respostas de saciedade mediada pela CCK e a indução de Fos no NTS e AP	Macho Sprague-Dawley (N= 8-12/grupo)	Dieta líquida palatável	CCK-8S	3ug/kg	IP	Consumo alimentar (120min)	CCK-8S ↓ consumo alimentar e ↑ ativação de Fos no NTS; ONDA atenua o efeito do CCK-8S e ↓ a ativação de Fos em sub-regiões do NTS
				ONDA	1mg/kg	IP	IHC FOS	
Madza et al, 2004	A expressão de c-Fos em regiões específicas do encéfalo em resposta a distensão gástrica e o envolvimento dos receptores 5-HT ₃ nestas respostas	Machos Wistar (N=3/grupo)	-----	Granisetrona	0.5mg/kg 0,05mg/kg	Intravenosa ICV	Distensão gástrica (DG)	DG libera 5-HT vascular, ↑ a expressão de Fos no NTS, AP, PVN e SON; VT e ganisetrona bloqueiam a expressão de Fos nestas regiões; neurônios do NTS ativados pela DG projetam-se para PVN
				Capsaicina	10mg/ml	Direta no nervo vago	Vagotomia troncular (VT) IHC- c-Fos Marcação retrograda-fluorogold/c-Fos	
Hayes & Covasa, 2006 ^a	Papel dos receptores 5-HT ₃ na indução de células CCK-FOS+ no tronco encefálico em resposta a distensão gástrica	Macho Sprague-Dawley (N=3-4/grupo)	-----	CCK-8S	1ug/kg	IP	Distensão gástrica	CCK, DG ou CCK+DG ↑ a expressão de Fos no NTS, AP; ONDA atenua os efeitos da CCK e DG na expressão de FOS no mNTS, iNTS e AP; CCK+DG ativa os receptores 5-HT ₃ no NTS e AP
				ONDA	1mg/kg	IP	IHC	

Tabela 1: Síntese dos estudos incluídos na revisão sistemática (continuação).

Referência	Parâmetro Avaliado	Espécie	Dieta	Droga	Dose	Via de administração	Técnicas/ Análises	Resultados
Hayes & Covasa, 2006 ^b	Participação dos receptores 5-HT ₃ do tronco encefálico caudal no controle do tamanho da refeição e na redução do consumo pelo CCK	Macho Sprague-Dawley (N=9/grupo)	Solução de sacarose (15%)	CCK-8S ONDA	1ug/kg 0.5;1 e 2 ug/ul 6,10,25ug/3ul	IP Direto no NTS 4 ^o ICV	Consumo alimentar (60 min)	1 e 2µg de ONDA direto mNTS ↑ o consumo de sacarose; 10 µg de ONDA no 4 ^o i.c.v e direto no mNTS atenua a supressão do consumo alimentar pelo CCK ; Somente ONDA não tem efeitos no consumo alimentar
Assarian, 2009	Participação dos receptores 5-HT ₂ na mediação dos efeitos anorexígenos da CCK e GLP-1 e a expressão de c-Fos no NTS, PVN e ARC	Camundongo WT (n=12-17) 5HT2R-KO (n=12-17)	Padrão	CCK-8S GLP-1	1;2;e 4ug/kg 33;66;132 ug/kg	IP IP	Consumo alimentar (30;60 e 120min) IHC (c-Fos)	CCK e GLP-1 ↓ consumo (30min) em animais WT e 5HT2R-KO; GLP-1 ↑ expressão de c-fos no ARC,PVN e cNTS em WT ; em animais 5HT2R-KO ocorre ↓ na expressão de c-fos no cNTS após CCK e ↑na expressão após GLP-1
Lam et al, 2009	Correlação entre a anorexia promovida pelo mCPP e ativação de discretas populações de neurônios no NTS	Macho Sprague-Dawley (n=4-5/grupo)	Padrão	mCPP	0.5;2.5 ou 5mg/kg	Intravenoso	Consumo alimentar (120min) IHC (c-fos, ;TH, CCK, CART, GLP-1 e neurotensina)	mCPP ↓ consumo, ↑ expressão de c-fos em sub populações de neurônios do NTS e ativa neurônios catecolaminérgicos da região

Tabela 1: Síntese dos estudos incluídos na revisão sistemática (continuação).

Referência	Parâmetro Avaliado	Espécie	Dieta	Droga	Dose	Via de administração	Técnicas/ Análises	Resultados
Wu et al, 2012	Participação dos receptores 5-HT ₃ do NTS na via de sinalização que resulta na excitação do PBN após ablação de neurônios que expressam AGRP.	Camundongo AGRP ^{DTR/+} ; Grin ^{lox/lox} ; Slc17a6 ^{lox/lox} ; Tph2 ^{lox/lox}	Baixo teor de lípidos	Toxina diftérica ONDA	50ug/kg ⁻¹ 6mg/ml ⁻¹ 0,6 mg/ml ⁻¹	Subcutânea Subcutânea 4 ^o ICV	Consumo alimentar (24h) IHC (Anti-AGRP, Fos e Tph)	Tratamento com ONDA aumenta o consumo alimentar e peso corporal ablação dos neurônios AGRP Bloqueio dos receptores 5-HT ₃ no NTS protege contra “fome” promovida pela ablação dos neurônios AGRP
Engster et al, 2014	Modulação da concentração de serotonina no NTS,DMV, PVN e ARC após administração periférica de CCK	Macho Sprague-Dawley (n=3-5/grupo)	----	CCK-8S	6 e 10ug/kg	IP	IHC (c-fos e serotonina)	CCK-8S ↑expressão de c-fos no NTS e PVN; CCK-8S ↓a imunorreatividade a serotonina no NTS e DMV
Garfield et al, 2014	Identificação das regiões encefálicas ativadas pelo antagonista do receptor 5-HT ₆	Macho Sprague-Dawley (n=7-8/grupo)	Padrão	SB-399885 (Antagonista do receptor 5-HT ₆)	1 ou 2 mg/kg	IP	Consumo alimentar (120min) IHC (c-fos)	2mg/kg de SB-399885 ↓ consumo alimentar; Antagonista do receptor 5-HT ₆ ↑expressão de c-fos no NTS e PVN

*AGRP: proteína relacionada ao agouti; AP: Área postrema; ARC: núcleo arqueado; CART: transcrito regulado pela cocaína e anfetamina; CCK- colecistocinina; cNTS- núcleo do trato solitário caudal; DG: distensão gástrica; DMD: núcleo dorsomedial hipotalâmico; FEN: fenfluramina; GLP-1: peptídeo semelhante ao glucagon -1; ICV:intracerebroventricular; IHC: imunohistoquímica; iNTS; núcleo do trato solitário intermediário; IP: intraperitoneal; mCPP: meta-clorofenilpiperazina; mNTS: núcleo do trato solitário medial; NTS; núcleo do trato solitário; ONDA: ondansetrona; PVN: núcleo hipotalâmico paraventricular; SON: núcleo supra-óptico; TH- tirosina hidroxilase; Tph: triptofano hidroxilase; VT: vagotomia troncular; WT: wild- type

DISCUSSÃO

Mediante as análises dos estudos selecionados nesta revisão sistemática foi possível observar que a serotonina mostrou-se necessária para mediar às respostas de saciedade no NTS. As primeiras evidências foram demonstradas por Grill e colaboradores (1997) que utilizaram duas estratégias complementares para argumentar a participação dos receptores serotoninérgicos do tronco encefálico caudal na mediação das respostas de saciedade. Primeiro, avaliaram os efeitos da fenfluramina sistêmica em animais cronicamente descerebrados, ou seja, sem conexão direta entre o rombencéfalo e prosencéfalo. Observaram supressão dose-dependente do consumo alimentar, o que atribuíram a ação da fenfluramina nos receptores serotoninérgicos do tronco encefálico caudal. Ainda segundo Grill e colaboradores (1997), como se é esperado uma depleção da serotonina do prosencéfalo após a transecção, uma ação direta da fenfluramina nos receptores desta região é pouco provável, confirmando a participação do tronco encefálico caudal na mediação dos efeitos da serotonina. Mediante a este fato, Grill e colaboradores aplicaram uma segunda estratégia que consistiu na infusão de fenfluramina no 4º ventrículo de animais intactos que também conduziu a uma supressão dose-dependente do consumo alimentar, corroborando com os achados encontrados no primeiro experimento e mostrando que as respostas à administração de fenfluramina em animais cronicamente descerebrados e intactos são qualitativamente semelhantes.

Estes resultados também foram corroborados pelos achados de Kaplan e colaboradores (1998) que utilizando o mesmo modelo experimental de Grill e colaboradores (1997), observaram que a administração de mCPP tanto sistêmica como central (4º ventrículo) promove uma supressão dose-dependente do consumo alimentar, legitimando a afirmativa de que os receptores serotoninérgicos presentes no tronco encefálico caudal são suficientes para mediar as respostas de saciedade induzidas pela serotonina. Esses autores observaram ainda que a infusão concomitante de mCPP e mesulergina, um antagonista dos receptores 5-HT_{2A/2C} promove uma atenuação dos efeitos supressores do mCPP. Como este agonista possui afinidades para os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}, esses achados indicam que os receptores para serotonina (mais provavelmente 5-HT_{2C}) não são apenas suficientes, como também requeridos para mediar os efeitos anoréticos do mCPP.

Lam e colaboradores (2009) correlacionaram a hipofagia associada à infusão do mCPP à ativação seletiva de discretas populações de neurônios catecolaminérgicos presentes no NTS. Esses neurônios representam a maior via ascendente através da qual a informação sensorial alcança o hipotálamo. Em particular, neurônios da região A2 do NTS constituem uma das principais entradas catecolaminérgicas no hipotálamo paraventricular e lateral (Sawchenko e Swanson, 1982; Lam et al, 2009). Para Lam e colaboradores (2009), a ativação dos neurônios catecolaminérgicos do NTS pelo mCPP, indica que estes neurônios desempenham uma função chave na integração entre sinais periféricos de saciedade e o hipotálamo. Além disto, a ativação destes neurônios induzida por este agonista assemelha a ativação promovida pela distensão gástrica. Embora o mCPP apresente afinidade para os receptores 5-HT1B e 5-HT2C, Lam et al (2009) destaca o fato deste agonista também ter afinidade pelos receptores serotoninérgicos 5-HT3 que são amplamente encontrados no NTS e ativados em resposta à distensão gástrica e CCK (Doughters et al, 2001, Madza et al, 2003; Hayes e Covasa, 2006^a; Hayes e Covasa, 2006^b; Engster et al, 2014). A propósito, a integração dos sinais periféricos de saciedade parece ser uma das principais funções da serotonina no NTS e essa integração é mediada, em maior grau pelos receptores 5-HT3 e em menor grau, pelo receptor 5-HT2C expressos nesta região (Doughters et al, 2001, Madza et al, 2003; Hayes e Covasa, 2006^a; Hayes e Covasa, 2006^b; Asarian, 2009; Engster et al, 2014).

Daughters e colaboradores (2001) e Hayes e Covasa (2006) observaram que não somente os receptores serotoninérgicos 5-HT3 localizados na periferia, como também aqueles localizados no NTS estão envolvidos na mediação da saciedade induzida pela CCK. Esses autores observaram que tanto a administração sistêmica como central de ondansetrona atenua a supressão do consumo alimentar induzida por CCK. Especificamente, Daughters e colaboradores (2001) reportaram que o bloqueio dos receptores 5-HT3 reduz a expressão de Fos induzida pelo CCK em subnúcleos específicos do NTS e área postrema. Já Hayes e Covasa (2006), observaram que os receptores 5-HT3 localizados neste núcleo além de participar do controle do tamanho da refeição, medeiam as resposta de saciedade induzida pelo CCK utilizando mecanismos diferentes dos receptores periféricos. Segundo esses autores a CCK atua primariamente nos terminais periféricos das aferências vagais e não ativa diretamente os receptores 5-HT3 do NTS, de forma que uma fonte central serotonina é responsável pela ativação destes receptores nesta região. Para Hayes e Covasa (2006) a ativação dos receptores 5-

HT3 em resposta a CCK sistêmica é presumivelmente dependente da liberação local de serotonina no NTS a partir dos terminais vagais ou qualquer outro elemento neural. Esse achado de Hayes e Covasa (2006) são corroborados por Engster e colaboradores (2014) que, apesar de não avaliarem o receptor 5-HT3 em si, reportaram que a sinalização serotoninérgica está envolvida na mediação dos efeitos da CCK no NTS. Esses autores sugerem que a CCK sistêmica atua via nervo vago para liberar serotonina neste núcleo e, conseqüentemente induzir a ativação de neurônios catecolaminérgicos nesta região que se projetam para o hipotálamo paraventricular.

Além da CCK, a distensão gástrica, outro sinal periférico que conduz a saciedade, parece recrutar os receptores 5-HT3 e estimular a expressão de Fos nos neurônios do NTS. Isto foi evidenciado por Madza e colaboradores (2004) e Hayes e Covasa (2006) que reportaram, respectivamente, que o bloqueio dos receptores 5-HT3 pelo antagonista granisetrona, atenua a expressão de Fos nesta região e que a ativação destes receptores não só medeia a expressão de Fos em resposta aos estímulos individuais da distensão gástrica e CCK, como também em resposta a ação combinada destes dois estímulos.

Hayes e Covasa (2006) reportaram que a ativação dos receptores 5-HT3 em resposta a distensão gástrica parecem ser os responsáveis por aproximadamente 50% da ativação de neurônios da porção medial do núcleo do trato solitário e sugerem que tanto os receptores 5-HT3 periférico quanto aqueles localizado no NTS estão envolvidos na indução de Fos observada nos neurônios desta região em resposta a distensão gástrica, ao CCK ou da ação conjunta destes dois estímulos. Além de mediar as respostas anorexígenas induzidas pela distensão gástrica e CCK, Os receptores 5-HT3 expressos no NTS também estão envolvidos na amplificação da sinalização anorexígena mediada núcleo parabraquial (PBN), como demonstrado por Wu e colaboradores (2012). Estes autores reportaram que neurônios serotoninérgicos provenientes dos núcleos da rafe participam da inibição do consumo alimentar através da excitação dos neurônios pós-sinápticos localizados na porção rostral do NTS que expressam receptores 5-HT3. Esta subpopulação de neurônios do NTS, através da integração dos sinais viscerais e gustatórios, emitem projeções glutamatérgicas excitatórias para neurônios localizados na porção lateral do PBN que expressam receptores NMDA e integram as informações nutricionais originadas do hipotálamo promovendo assim, as respostas anorexígenas mais apropriadas as necessidades do organismo.

Assim como os receptores 5-HT₃, os receptores 5-HT_{2C} expressos no NTS também parecem ser recrutados na integração dos sinais periféricos de saciedade. Isto foi observado por Asarian (2009) que utilizando animais nocaute para este receptor demonstrou que os receptores 5-HT_{2C} são necessários para o completo efeito do CCK na indução da saciedade.

No NTS ainda é possível identificar, a expressão de receptores serotoninérgicos 5-HT₆, como demonstrado por Garfield e colaboradores (2014). Ao contrário dos demais receptores serotoninérgicos envolvidos no controle do comportamento alimentar que necessitam da sua ativação para induzir a saciedade, é a inativação dos receptores 5-HT₆ que produzem essa resposta. Segundo Garfield e colaboradores (2014), o antagonismo dos receptores 5-HT₆ permitiria desinibir os sinais periféricos de saciedade que são recebidos e integrados pelo NTS. Embora estudos evidenciem a presença dos receptores 5-HT₆ no NTS, os mecanismos fisiológicos pelos quais esses receptores atuam sobre o consumo alimentar ainda necessitam ser esclarecidos (Garfield et al, 2014).

Com base nessas informações, o NTS mostra-se uma região crucial para a sinalização anorexígena da serotonina. Nesta região, a serotonina parece atuar na integração dos sinais periféricos de saciedade exercendo seus efeitos através dos receptores 5-HT_{2C} e, particularmente 5-HT₃ em resposta a distensão gástrica e ao CCK. A sinalização serotoninérgica no NTS requer mecanismos diferentes daqueles já observados no hipotálamo, cujos efeitos sobre a saciedade parecem ser mediados, em parte, pelos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} em neurônios melanocortinérgicos presentes nesta região. Embora os estudos selecionados nesta revisão sistemática tenham possibilitado melhor caracterização dos mecanismos serotoninérgicos envolvidos na saciedade no NTS, alguns aspectos desta sinalização ainda precisam ser esclarecidos. Entre estes, a melhor caracterização e diferenciação da participação dos receptores 5HT₃ periféricos e centrais na mediação dos efeitos anorexígenos da serotonina em resposta à distensão gástrica, e os mecanismos de ação dos receptores 5-HT₆ na promoção da saciedade. Além disso, é necessário mais evidências que suportem a hipótese de que a ativação, induzida pelo CCK, de neurônios catecolaminérgicos do NTS é mediada pela serotonina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSARIAN, L. Loss of cholecystokinin and glucagon-like peptide-1-induced satiation in mice lacking serotonin 2C receptors. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n.1, p.R51-6, 2009.
- AUSTGEN, J. R. et al. 5-Hydroxytryptamine 2C receptors tonically augment synaptic currents in the nucleus tractus solitarii. **Journal of Neurophysiology**, v. 108, p.2292–2305, 2012.
- BEINFELD, M.C.; PALKOVITS, M. Distribution of cholecystokinin (CCK) in the rat lower brain stem nuclei. **Brain Research**, v.238, n.1, p.260-5, 1982.
- BERTHOUD, H.-R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 26, n. 4, p. 393–428, jun. 2002.
- BERTHOUD, H.R. The Caudal Brainstem and the Control of Food Intake and Energy Balance. IN: Neurobiology of Food and Fluid Intake, v. 14, **Handbook of Behavioral Neurobiology**, p. 195-240, 2004,
- DAUGHTERS, R.S. et al. Ondansetron attenuates CCK induced satiety and c-fos labeling in the dorsal medulla. **Peptides**, v. 22, n.8, p.1331-8, 2001.
- EDWARD, G.L; POWER, J. D. Attenuation of 8-OH-DPAT induced feeding after lesions of the area postrema/immediately adjacent nucleus of the solitary tract. **Brain Research**, v. 628, p. 321-326, 1993.
- EMOND, M.; SCHWARTZ, G. J.; MORAN, T. H. Meal-related stimuli differentially induce c-Fos activation in the nucleus of the solitary tract. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 280, n. 5, p. R1315–21, maio 2001.
- ENGSTER, K.M. Peripheral injected cholecystokinin-8S modulates the concentration of serotonin in nerve fibers of the rat brainstem. **Peptides**, v.59, p.25-33, 2014.
- FAIPOUX, R. et al. Proteins activate satiety-related neuronal pathways in the brainstem and hypothalamus of rats. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 6, p. 1172–8, jun. 2008.
- FELDMAN, P.D. Electrophysiological effects of serotonin in the solitary tract nucleus of the rat. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 349, n.5, p. 447-454, 1994.
- FOO, K. S.; BRISMAR, H.; BROBERGER, C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. **Neuroscience**, v.156, p.563–579, 2008.
- GARFIELD, A.S. et al. Distribution of cells responsive to 5-HT₆ receptor antagonist-induced hypophagia. **Behavioral Brain Research**, v.266, p.201-206, 2014.
- GRILL, H.J. et al. Contribution of caudal brainstem to d-fenfluramine anorexia. **Psychopharmacology**, v. 130, p. 375–381, 1997..
- GRILL, H. J. Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 14 Suppl 5, n. August, p. 216S–221S, ago. 2006.

GRILL, H. J. Leptin and the systems neuroscience of meal size control. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 31, n. 1, p. 61–78, jan. 2010.

GRILL, H. J.; HAYES, M. R. The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. **International journal of obesity (2005)**, v. 33 Suppl 1, n. S1, p. S11–5, abr. 2009.

GRILL, H. J.; HAYES, M. R. Hindbrain neurons as an essential hub in the neuroanatomically distributed control of energy balance. **Cell metabolism**, v. 16, n. 3, p. 296–309, 5 set. 2012.

GRILL, H. J.; KAPLAN, J. M. The neuroanatomical axis for control of energy balance. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 23, n. 1, p. 2–40, jan. 2002.

GU, G. et al. Glucagon-Like peptide-1 in the rat brain: distribution of expression and functional implication. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 521, p. 2235–2261, 2013.

GUSTAFSON, E.L. et al. A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT₇ receptor in rat brain. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, p. 657–666, 1996.

HAYES, M. R.; COVASA, M. Gastric distension enhances CCK-induced Fos-like immunoreactivity in the dorsal hindbrain by activating 5-HT₃ receptors. **Brain Research**, v. 1088, p. 120–130, ^{2006a}.

HAYES, M. R.; COVASA, M. Dorsal hindbrain 5-HT₃ receptors participate in control of meal size and mediate CCK-induced satiation. **Brain Research**, v. 1103, p. 99–107, 2006^b

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

HUO, L.; GRILL, H. J.; BJØRBAEK, C. Divergent regulation of proopiomelanocortin neurons by leptin in the nucleus of the solitary tract and in the arcuate hypothalamic nucleus. **Diabetes**, v. 55, n. 3, p. 567–73, mar. 2006.

KAPLAN, J.M.; SONG, S.; GRILL, H.J. Serotonin receptors in the caudal brainstem are necessary and sufficient for the anorectic effect of peripherally administered MCPP. **Psychopharmacology**, v. 137, p. 43–49, 1998

KENNY, P. J. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 638–51, nov. 2011.

KOEGLER, F. H.; RITTER, S. Galanin injection into the nucleus of the solitary tract stimulates feeding in rats with lesions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Physiology & Behavior**, v. 63, n. 4, p. 521–7, 15 mar. 1998.

LAM, D.D. et al. Distribution and neurochemical characterization of neurons within the nucleus of the solitary tract responsive to serotonin agonist-induced hypophagia. **Behavioural Brain Research**, v. 196, p. 139–143, 2009.

LI, G. et al. Melanocortin activation of nucleus of the solitary tract avoids anorectic tachyphylaxis and induces prolonged weight loss. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 293, n. 1, p. E252–8, jul. 2007

LUTZ, T. A. et al. Lesion of the area postrema/nucleus of the solitary tract (AP/NTS) attenuates the anorectic effects of amylin and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in rats. **Peptides**, v. 19, n. 2, p. 309–17, jan. 1998.

MADZA, T. et al. Gastric distension-induced release of 5-HT stimulates c-fos expression in specific brain nuclei via 5-HT₃ receptors in conscious rats. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.287, p G228–G235, 2004

MAGALHÃES, C. P. et al. Modulatory role of serotonin on feeding behavior. **Nutritional neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 246–55, dez. 2010.

MANARKER, S; VERDERAME, H.M. Organization of serotonin 1A and 1B receptors in the nucleus of the solitary tract. **The Journal of Comparative Neurology**, v : 301, p. 535-553, 1990.

MENANI, J. V et al. Commissural nucleus of the solitary tract lesions reduce food intake and body weight gain in rats. **Brain research**, v. 740, n. 1-2, p. 102–8, 18 nov. 1996.

OLIVER, K.R. et al. Localization of 5-HT_{2A} receptor-like immunoreactivity in the rat brain. **Brain Research**, v 867, p.131–142, 2000.

POMPEIANO, M.; PALACIOS, J.M.; MENGOD, G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. **Molecular Brain Research**, v. 23, p. 163–178, 1994

RINAMAN, L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. **Brain research**, v. 1350, p. 18–34, 2 set. 2010.

SAWCHENKO, P.E.; SWANSON, L.W. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. **Brain Research**, v.257, p.275–325, 1982.

SCHWARTZ, G. J. Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 361, n. 1471, p. 1275–80, 29 jul. 2006.

SHIODA S. et al. Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. **Neuroscience Letters**, v.243, p. 41–44, 1998.

STEWART, L.J. et al. Labelling of 5-HT₃ receptor recognition sites in the rat brain using the agonist radioligand [3H]meta-chlorophenylbiguanide. **European Journal Pharmacology**, v. 243, p.13–18, 1993

TAKENAKA, R.; OHI, Y.; HA, A. Distinct modulatory effects of 5-HT on excitatory synaptic transmissions in the nucleus tractus solitarius of the rat. **Neuropharmacology and Analgesia**, v. 671, p.45–52, 2011.

THOR, K.B.; BLITZ-SIEBERT, A.;HELKE, C.J. Autoradiographic localization of 5HT₁ binding sites in autonomic areas of the rat dorsomedial medulla oblongata. **Synapse**, v. 10, p. 217–227, 1992

VOIGT, J.P; FINK, H. Serotonin controlling feeding and satiety. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 14-31, 2015.

WILLIAMS, D. L.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Hindbrain leptin receptor stimulation enhances the anorexic response to cholecystokinin. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 297, n. 5, p. R1238–46, nov. 2009.

WU, Q.; CLARK, M.S.; PALMITER, R.D. Deciphering a neuronal circuit that mediates appetite. **Nature**, v.483, n.7391, p. 594-7, 2012.

4. HIPÓTESE

A desnutrição perinatal promove redução da atividade neural no núcleo do trato solitário após estímulo alimentar, bem como na densidade de terminais serotoninérgicos e do receptor 5-HT1B.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre aspectos morfofuncionais do NTS relacionados ao controle do comportamento alimentar.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nos diferentes grupos experimentais:

- O peso corporal;
- O consumo alimentar aos 35 e 180 dias de vida;
- As características intrínsecas do comportamento alimentar de cada grupo experimental no que se refere a saciedade e parâmetros microestruturais da alimentação;
- A ativação de neurônios no NTS, através da expressão da proteína Fos, em resposta à estimulação alimentar;
- A densidade terminais serotoninérgicos e distribuição dos receptores 5-HT1B nos subnúcleos ventrolateral, medial, intermediário e comissural do NTS.

6.MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Fêmeas de 120 dias de idade foram transportadas para o biotério de experimentação do Departamento de Anatomia onde passaram por um período de adaptação de quinze dias sob condições padrão de biotério: temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1$, ciclo claro-escuro invertido de 12/12 horas (luz acesa às 18h) e livre acesso à água e à alimentação (dieta Labina – Purina S/A).

Após a adaptação, as ratas em período estral foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho, sendo a prenhez diagnosticada pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. Confirmada a prenhez, as fêmeas foram alocadas em gaiolas individuais, e observadas rotineiramente para registro do dia de nascimento dos filhotes. Vinte e quatro horas após o nascimento dos mesmos foi realizado o procedimento de sexagem, sendo a ninhada ajustada por 8 filhotes (proporção de 4 machos: 4 fêmeas) escolhidos aleatoriamente, considerando o peso entre 6 a 8g. As fêmeas foram utilizadas apenas para compor as ninhadas. Este dia foi considerado como o primeiro dia de vida dos filhotes. Os filhotes permaneceram com as mães até completarem 21 dias de idade, período no qual ocorreu o desmame. Após o desmame os animais foram submetidos à dieta padrão de laboratório. Durante todo o experimento os animais foram mantidos em condições padrão de biotério seguindo recomendação ética do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Todos os procedimentos foram aprovados de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UFPE (nº 23076.0374092011-64) (Anexo A).

6.2 Grupos Experimentais

A obtenção dos grupos experimentais foi realizada de acordo com o tipo de dieta ofertada durante o período de gestação e lactação. Fêmeas prenhas receberam aleatoriamente ou uma dieta normoprotéica contendo caseína a 17% ou uma dieta hipoprotéica contendo caseína a 8% (tabela 1) durante todo o período da gestação,

perdurando a oferta dessa dieta na lactação. Da ninhada de cada fêmea foram retirados 2 animais (machos) para compor os seguintes grupos experimentais:

- **Grupo Controle (C):** composto de animais cujas mães foram submetidas durante a gestação e lactação a dieta normoprotéica contendo 17% de caseína (n=10);
- **Grupo Desnutrido (D):** composto de animais cujas mães foram submetidas durante a gestação e lactação a dieta hipoprotéica contendo 8% caseína (n=10).

Posteriormente, para algumas análises experimentais abaixo discriminadas, esses grupos experimentais foram subdivididos de acordo com a idade dos animais se 35 ou 180 dias de vida. Estas idades foram escolhidas por representar indivíduos jovens (35 dias) e adultos (180 dias). Os estudos de densidade de terminais serotoninérgicos e de receptores 5HT-1B no NTS, foram realizados apenas na idade de 35 dias de vida.

Tabela 1: Composição das dietas experimentais ofertadas durante o período perinatal (g/100g dieta)

Macronutrientes	Controle (17% proteína)	Hipoproteica (8% proteína)
Proteína		
Caseína*	21,3	10,0
Carboidratos		
Amido de milho	51,0	63,0
Sacarose	10,0	10,0
Lipídios		
Óleo Vegetal	7,0	7,0
Celulose	5,0	5,0
Mix Vitamina	1,0	1,0
Mix Minerais	0,3	0,3
Metionina	0,3	0,3
Densidade Energética (Kcal/g)	3,58	3,59
% Macronutrientes Kcal /g		
Proteína	19,7	9,3
Carboidratos	61,6	72,0
Gordura	17,9	17,5

As dietas foram formuladas de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ciências Nutricionais (American Society for Nutritional Sciences (AIN 93).

*Caseína com 80% de biodisponibilidade.

6.3 Procedimentos Experimentais

6.3.1 Acompanhamento do peso corporal

O peso corporal foi avaliado em cada grupo experimental no 1º, 6º, 11º, 16º, 21º, 26º e 31º dias de vida. Essa avaliação também foi realizada pontualmente aos 35 e 180 dias de vida. Em todos os grupos o peso corporal foi registrado utilizando balança digital (Marte, modelo S-100/ sensibilidade de 0,01g)

6.3.2 Consumo Alimentar

Em todos os grupos experimentais o registro da ingestão alimentar foi realizado aos 35 e 180 dias de idade. Os animais foram alojados em gaiolas individuais para adaptação (7 dias) e posterior quantificação da ingestão alimentar. Após quatro horas de privação alimentar, foi disponibilizada uma quantidade conhecida de dieta padrão de biotério (Labina – Purina) por noventa minutos. O consumo alimentar (g) foi obtido pela diferença entre a quantidade de alimento oferecido e o rejeitado utilizando balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000). Na descrição dos resultados, o consumo alimentar está representado por quilocalorias relativas ao peso corporal de cada animal (Kcal/g peso corporal).

6.3.3 Sequência Comportamental de Saciedade (SCS)

A sequência comportamental de saciedade (SCS) é um método não invasivo que consiste em avaliar, durante um intervalo de tempo, comportamentos alimentares e não alimentares com a finalidade de se determinar a saciedade. Este procedimento foi realizado segundo protocolo adaptado de Halford e colaboradores (Halford et al,1998). Aos 150 dias, os animais de cada grupo experimental (controle (n=6) e Desnutrido (n=9)) foram, inicialmente, submetidos a uma breve privação alimentar por quatro horas para estimular a busca pelo alimento. Em seguida foi ofertada uma quantidade conhecida de dieta padrão de biotério (30g), e durante 60 minutos foi registrada a duração (em segundos) dos comportamentos de:

- **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 é 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 apresentou-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 alimento ofertado e rejeitado durante a SCS foi pesado e protocolado e o ponto de saciedade determinado pelo ponto de cruzamento dos comportamentos que determinam o final da alimentação e início do descanso.

Durante a SCS serão avaliados ainda parâmetros microestruturais da alimentação como: **latência** (tempo que o animal leva para iniciar a refeição após a apresentação do alimento), **duração da refeição** (tempo durante todo o período de monitoramento em que o animal está de fato se alimentando), **tamanho da refeição** e **taxa de alimentação** (quantidade de alimento consumido por duração de refeição (Kcal/min)). Toda avaliação da SCS foi realizada por um avaliador cego à manipulação nutricional do animal.

6.3.4 Estímulo alimentar para expressão da proteína FOS

Aos 35 ou 180 dias de vida, os animais pertencentes cada grupo experimental foram submetidos a estímulos específicos para estudo da expressão da proteína FOS. Assim, estes animais foram privados de alimentos por quatro horas seguida da exposição a um estímulo alimentar (dieta padrão) por 90 minutos. Após esse período, os animais foram anestesiados e perfundidos para obtenção dos encéfalos. A utilização da técnica de marcação da proteína FOS é uma das mais utilizadas para avaliação dos efeitos de estímulos ambientais, mapeamento da atividade celular e identificação de áreas

encefálicas determinadas, uma vez que essa proteína participa no armazenamento de informações, na percepção e mudanças exteriores, no processo adaptativo, além de influenciar as atividades neuronais que podem resultar em mudanças duradouras no sistema nervoso (Hoffman et al, 1993; Hoffman; Lyo, 2002).

6.3.5 Perfusão Transcardíaca

Os animais submetidos à estimulação alimentar foram anestesiados profundamente com uma combinação de cetamina (50mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) e em seguida fixados em superfície apropriada para o procedimento de abertura da cavidade torácica. Para acesso ao ventrículo esquerdo, onde foi introduzida cânula para perfusão, foi realizado inicialmente um corte na parede do abdome expondo-se o processo xifóide. Este corte realizado em forma de “V” na musculatura e costelas, permitiu a exposição do coração na cavidade torácica. Para impedir que a perfusão alcance a aorta descendente, e como consequência toda sua área de irrigação, o pulmão esquerdo foi afastado e a aorta descendente pinçada. Em seguida, uma cânula acoplada a uma bomba peristáltica foi introduzida no ventrículo esquerdo do coração e presa na área por uma pinça hemostática. A bomba foi acionada em velocidade compatível com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Inicialmente foi infundido 150ml de solução salina (NaCl, 0,9%) a temperatura ambiente para remoção do sangue dos vasos. Este procedimento previne a formação de coágulos e propicia a correta penetração do fixador nos tecidos. A perfusão com salina foi seguida da infusão de 400 mL solução fixadora (4% de paraformaldeído, pH 7,4, em 4° C). Quando foi observada a contração dos membros superiores, indicando a chegada do fixador nesta região, foi adicionado gelo sobre a cabeça do animal, para minimizar a degradação protéica no encéfalo. Ao final da passagem do fixador, os encéfalos foram retirados do crânio e pós-fixados na mesma solução fixadora acrescida de sacarose (20%) durante 4 horas. Após esse período, foram armazenados em solução crioprotetora (Tampão fosfato de sódio PBS - mais sacarose 20%) por 6-24 h..

6.3.6 Procedimentos Imunohistoquímicos

Os encéfalos foram crio-seccionados em cortes coronais de 40µm de espessura utilizando-se criomicrotomo de congelamento. Cinco séries de cortes foram coletadas, para cada animal, em placa de acrílico (25 cavidades) com solução anticongelante e armazenadas a -20°C. Para imunohistoquímica contra a proteína Fos foram analisados encéfalos de animais com 35 e 180 dias, para as demais reações apenas animais com idade de 35 dias. Três séries de cortes foram submetidas a reações de imunohistoquímica contra proteína FOS, serotonina e receptor serotoninérgico 5-HT1B.

6.3.6.1. Imunohistoquímica contra a Proteína FOS

Uma série de cortes foi submetida a reações de imunohistoquímica contra proteína FOS. Nesse procedimento os cortes coronais da série foram removidos da solução anti-congelante e submetidos a três séries de lavagens. Na primeira foram lavados em PBS (3 x 10 min), na segunda com água oxigenada 30% (1 x 5 min) (para bloquear a atividade da peroxidase endógena e de alguns sítios inespecíficos de união ao anticorpo) e na terceira novamente em PBS (3 x 10 min) para remover os resíduos do pós fixador. Em seguida foram incubados em solução com anticorpos primários anti-FOS (feito em coelho) por 48 h. Esta solução é composta por PBS, Triton (0,3 %), soro normal de cabra (NGS 5 %) e anticorpo contra a proteína FOS (1:10.000) (Calbiochem, Bad Soden, Alemanha). Durante a incubação os cortes permaneceram em recipientes de 1,5 ml posicionados em uma incubadora agitadora refrigerada (Marconi- MA83) protegido da luz. Após a incubação os cortes foram submetidos a lavagens em PBS (3 x 10 min) e posteriormente incubados em solução com anticorpo secundário por 90 min. Esta solução é composta por Triton (0,3%), PBS e anticorpo secundário biotilado feito em cabra contra coelho (1:200) (Sigma- B8895). Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens com KPBS (3 x 10 min) e outra incubação (90 min) com complexo avidina-biotina-peroxidase 1 % (Vectastain, Camon, Wiesbaden, Alemanha). Após esse período de incubação, os cortes foram lavados em PBS (2 x 10 min) e acetato de sódio (2X 10 min) sendo em seguida realizada, durante 5 minutos, a reação de revelação imunoperoxidase com 3,3-diaminobenzidina (DAB/Sigma D5637)

diluído em solução de água destilada, níquel sulfato amônio (NAS), acetato de sódio (0.2 M), cloreto de amônio e β -D-Glucose. Após esta reação foi acrescentada na solução anterior a Glucose oxidase até os cortes obterem a cor marrom claro/púrpura. Para neutralizar esta reação, os cortes foram submetidos a lavagens com acetato de sódio (2 x 10 min) e PBS (3 x 10 min).

Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas, passaram por processos de desidratação e diafanização e foram, por fim, cobertos com lamínulas e DPX. No processo de desidratação ocorre imersão dos cortes em uma sequência crescente de concentrações de álcoois (50%, 70%, 95 %-I, 95 %-II - 3 min em cada, 100 %-I, 100 %-II, 100 %-III - 5 min cada) seguido de diafanização em xilol (Xilo-I, 5 min, Xilol-II, 10 min).

6.3.6.2 Imunohistoquímica contra serotonina

Para o procedimento de imunohistoquímica contra serotonina, os cortes coronais de uma série, foram lavados em KPBS (3 x 10 min). Em seguida foram incubados em solução com anticorpo primário contra serotonina (por 48h. Esta solução foi formada por KPBS, Triton (0,3 %), soro normal de cabra (NGS 5%) e anticorpo primário anti-5-HT feito em coelho (Diluição 1:5000) (Protos Biotech Corporation, New York, NY, EUA). Durante a incubação os cortes permaneceram em recipientes de 1,5 mL posicionados em agitador protegido da luz. Após a incubação os cortes foram submetidos a lavagens em KPBS (3 x 10 min) e posteriormente incubados em solução com anticorpo secundário, feito em cabra contra coelho, por 90 min. Esta solução foi composta por Triton (0,3%), KPBS e anticorpo secundário biotilado (diluição 1:200). Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens com KPBS (3 x 10 min) e outra incubação (90 min) com complexo avidina-biotina-peroxidase 1 % (Vectastain, Camon, Wiesbaden, Alemanha). Esta solução foi composta por KPBS, triton (0,3 %) e cloreto de sódio (NaCl). Os cortes foram submetidos a lavagens com KPBS (2 x 10 min) e acetato de sódio (2X 10 min). Em seguida foi realizada, por 5 minutos, a reação de imunoperoxidase com 3,3-diaminobenzidina (DAB/Sigma D5637) diluído em solução de água destilada, níquel sulfato amônio (NAS), acetato de sódio (0.2 M), cloreto de amônio e β -D-Glucose. Após esta reação foi acrescentada a solução anterior Glucose oxidase e incubação dos cortes até obterem cor marrom claro/púrpura. Para

neutralizar esta reação, os cortes foram submetidos a lavagens com acetato de sódio (2 x 10 min) e, em seguida, com KPBS (3 x 10 min). Os cortes foram montados de forma semelhante aos submetidos ao processo de imunohistoquímica contra a proteína FOS.

6.3.6.3. Imunohistoquímica contra receptor serotoninérgico 5-HT1B

Assim como no procedimento de imunohistoquímica contra proteína FOS, na imunohistoquímica contra o receptor serotoninérgico 5-HT1B, os cortes coronais de uma série foram removidos da solução anti-congelante e submetidos a três séries de lavagens. Na primeira foram lavados em PBS (3 x 10 min), na segunda com água oxigenada 30% (1 x 5 min) e na terceira novamente em PBS (3 x 10 min)

Em seguida foram incubados em solução contendo PBS, soro normal de cabra (NGS 5%) e anticorpo primário feito em coelho contra o receptor 5-HT1B (diluição 1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Texas EUA) por 24 horas. Durante a incubação os cortes permaneceram em recipientes de 1,5 mL posicionados em agitador refrigerado (4°C) protegido da luz. Após a incubação os cortes foram submetidos a lavagens em PBS (3 x 10 min) e posteriormente incubados em solução de PBS e anticorpo secundário (diluição 1:200), feito em cabra contra coelho, por 45 min. Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens com PBS (3 x 10 min) e outra incubação (450 min) com complexo avidina-biotina-peroxidase 1 % (Vectastain, Camon, Wiesbaden, Alemanha). Posteriormente, os cortes foram submetidos a lavagens com PBS (2 x 10 min) e acetato de sódio (2X 10 min). Em seguida foi realizada, por 5 minutos, a reação de imunoperoxidase com 3,3-diaminobenzidina (DAB/Sigma D5637) diluído em solução de água destilada, níquel sulfato amônio (NAS), acetato de sódio (0.2 M), cloreto de amônio e β -d-Glucose. Após esta reação foi acrescentada a solução anterior Glucose oxidase e incubação dos cortes até obterem cor marrom claro/púrpura. Para neutralizar esta reação, os cortes foram submetidos a lavagens com acetato de sódio (2 x 10 min) e, em seguida, com PBS (3 x 10 min). Os cortes foram montados de forma semelhante aos submetidos ao processo de imunohistoquímica contra a proteína FOS.

6.3.7 Análise quantitativa de neurônios Fos-IR e 5-HT1B-IR no NTS

A identificação, delimitação e quantificação de neurônios Fos-IR e 5-HT1B-IR no NTS foram realizadas a partir de fotomicrografias adquiridas por meio de uma câmara digital (Samsung SHC-410NAD) adaptada a um microscópio (Olympus BX50), e um computador (Funtech). A aquisição das imagens foi realizada utilizando a objetiva 10X e com o auxílio do software TV Turner Application e Motic Image Plus 2.0.

Para a identificação e delimitação das áreas estudadas foi utilizada como referência o Atlas Estereotático de Rato (Paxinos; Watson, 2005). Para análise a de neurônios Fos-IR, o núcleo do trato solitário foi dividido nas porções rostral e medial. Foram consideradas para a porção rostral do NTS as marcações evidentes nos níveis -12,72 e -12,96 a partir do bregma (Figura 2). Para a porção medial do NTS foram considerados os níveis -13,92 e -14,16 a partir do bregma (Figura 2).

A análise dos neurônios 5-HT1B-IR foi realizada a partir de marcações evidentes nos níveis de bregma -12,96 e -13,92. Em cada nível de bregma optou-se por realizar a análise quantitativa por subnúcleo do NTS, levando-se em consideração os seguintes subnúcleos: ventrolateral (SOLIM), intermediário (SOLIM), medial (SOLM) e o comissural (SOLC) (Figura 3). Também foi avaliado o NTS como um todo. A escolha desses subnúcleos específicos foi baseada no trabalho de Manaker e Verderame (1990).

A análise quantitativa dos neurônios Fos-IR e 5-HT1B nestas faixas de Bregma foi realizada a partir do programa ImageJ versão 1.45, sendo quantificados em cada área apenas as marcações evidentes.

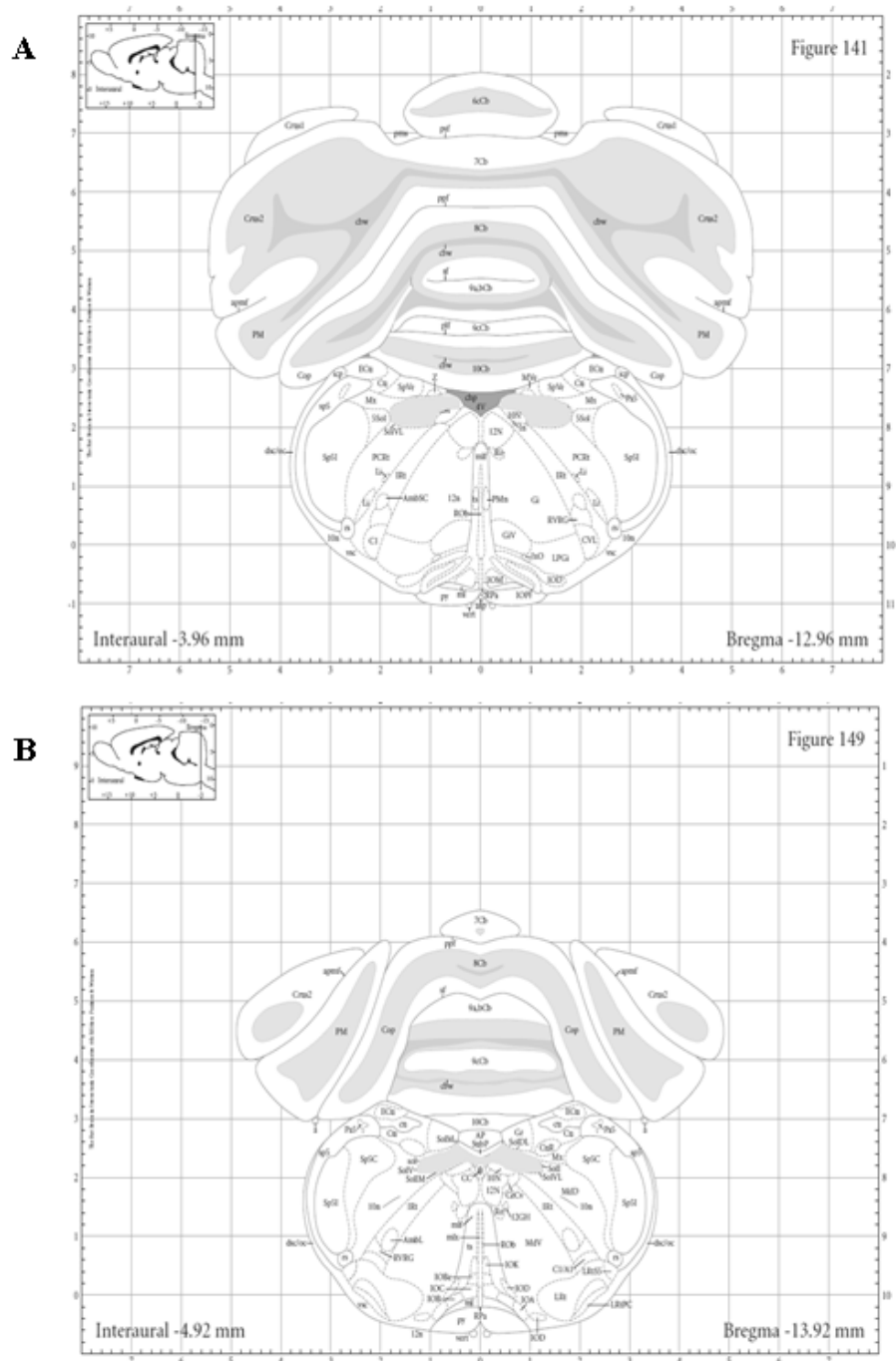


Figura 2- Representação esquemática das porções rostral (A) e medial (B) do NTS. Esquemas foram retirados do Atlas Paxinos; Watson 2005.

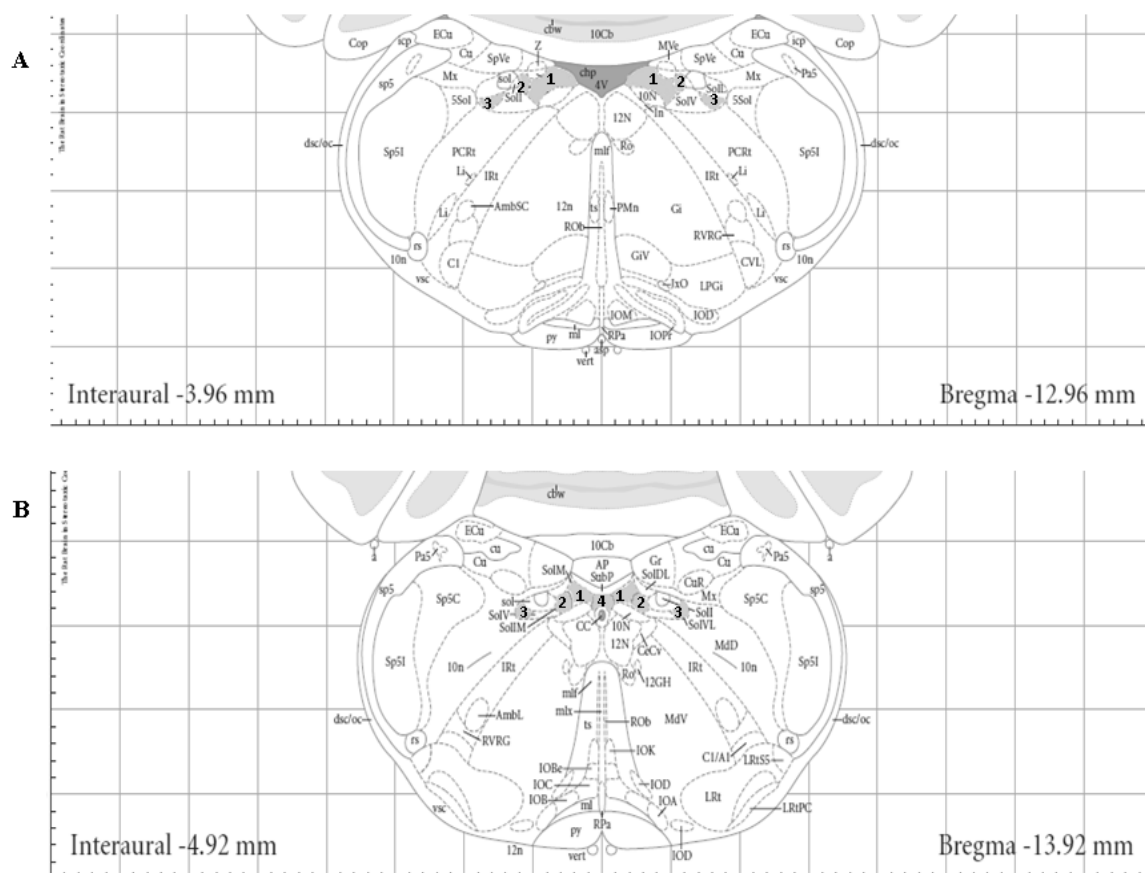


Figura 3- Representação esquemática do NTS evidenciando seus subnúcleos estudados a partir dos níveis de bregma -12,96 (A) e -13,92 (B) (Paxinos; Watson 2005). (1) SolM- subnúcleo Medial; (2) SolIM Subnúcleo Intermediário; (3) SolVL Subnúcleo Ventrolateral e (4) SolC- Subnúcleo Comissural;

6.3.8 Análise da densidade de terminais serotoninérgicos no NTS

A densidade de terminais serotoninérgicos foi analisada levando-se em consideração o NTS como um todo, assim como os seus subnúcleos: ventrolateral (SOLIM), intermediário (SOLIM), medial (SOLM) e o comissural (SOLC) (Menaker e Verderame, 1990). As imagens destes núcleos foram capturadas por meio de uma câmara digital (Samsung SHC-410NAD) adaptada a um microscópio (Olympus BX50), e um computador (Funtech). A aquisição das imagens foi realizada utilizando a objetiva 40X e com o auxílio do software Motic Image Plus 2.0. Foram obtidas as densidades dos terminais serotoninérgicos a partir dos níveis de bregma -12,96 e -13,96 e em cada nível, os dados foram obtidos levando-se em consideração apenas um hemisfério

cerebral (Figura 3). As imagens foram analisadas pelo programa Image Pro Plus (versão 6.0). Este programa identifica as fibras serotoninérgicas dentro de cada amostra e fornece a sua densidade em relação à área, representado na unidade de índice de densidade óptica (IOD). Os resultados descritos neste estudo representam o valor médio da densidade de todas as amostras de apenas um hemisfério dos cortes situados nos níveis de bregma -12,96 e -13,96 nos quais se encontram os subnúcleos analisados.

Para delimitação das regiões analisadas foi utilizado como referência o Atlas Estereotático de Rato (Paxinos; Watson, 2005).

6.4 Análises Estatísticas

Os valores referentes ao peso corporal, consumo alimentar e análise quantitativa dos neurônios imunorreativos a proteína FOS, ao receptor 5HT-1B ou a densidade de terminais serotoninérgicos no NTS foram avaliados pelo Teste t para comparação de cada grupo com o seu controle. Todos os dados foram apresentados em média e erro padrão. Em todas as avaliações o nível de significância foi considerado $p \leq 0.05$. Todos os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism 5, versão 7.

7. RESULTADOS

7.1- Análise da ativação neuronal do NTS em resposta ao estímulo alimentar

As análises referentes ao peso corporal, consumo alimentar, sequência comportamental de saciedade e imunohistoquímica contra a proteína Fos, foram compiladas no artigo “Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats” publicado na revista International Journal of Developmental Neuroscience (Fator de impacto: 2,580/Qualis B1). Este artigo buscou avaliar a responsividade do NTS em processar os estímulos alimentares em resposta à manipulação nutricional perinatal e observou que animais submetidos a este tipo de manipulação apresentaram: (1) redução do peso corporal, (2) hiperfagia aos 35 e 180 dias, (3) retardo na saciedade, (4) aumento no tamanho e duração das refeições e (5) ativação neuronal aumentada nas porções rostral e medial do NTS em animais de 35 e 180 dias. Esses resultados nos mostram que o NTS é uma estrutura particularmente vulnerável as influências da manipulação nutricional perinatal, podendo alterar as vias de modulação de controle central de comportamento alimentar. Este artigo encontra-se disponível na íntegra no anexo B.

7.2 Análise da densidade de terminais serotoninérgicos no NTS

Comparado ao grupo controle, o grupo desnutrido apresentou maior densidade (IOD) de terminais serotoninérgicos no NTS quando avaliamos esta região como um todo ($C = 34,4 \pm 1,5$ $n = 5$; $D = 48 \pm 3,6$ $n = 4$). Analisando a distribuição dessa densidade de terminais ao longo dos subnúcleos específicos do NTS selecionados para este estudo (ventrolateral, intermediário, medial e comissural), observamos que apenas o SOLIM de animais do grupo desnutrido apresentou maior densidade de terminais quando comparado ao grupo controle ($C = 28,3 \pm 2$ $n = 5$; $D = 43 \pm 1,5$ $n = 4$) (Figura 4).

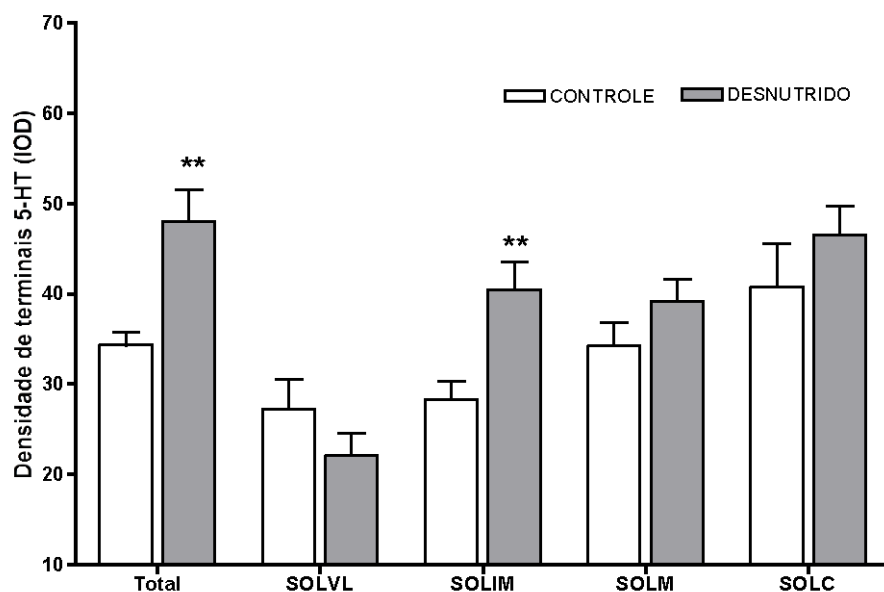


Figura 4- Efeito da desnutrição perinatal sobre a densidade de terminais serotoninérgicos no NTS e em subnúcleos específicos. Os ratos desnutridos consumiram dieta hipoproteica (caseína 8%) e os controles dieta normoproteica (17% caseína) durante a gestação e lactação. Solvl: subnúcleo ventrolateral; SOLIM: subnúcleo intermediário; SOLM- subnúcleo medial e SOLC- subnúcleo comissural. Os dados estão representados em média $\pm$ erro padrão. Foi utilizado o test t para a comparação entre os grupos, ** $p < 0,01$.

Avaliando o NTS em seu eixo ântero-posterior, (a partir dos níveis de bregma -12,96 e -13,92), observamos que esta maior densidade de terminais 5HT de animais desnutridos, quando comparado ao grupo controle, se distribui tanto entre os níveis de bregma -12,96 (C= $42,3 \pm 3$ n= 5; D= $58,6 \pm 3,5$ n=4) quanto -13,96 (C= $26,3 \pm 2,3$ n= 5; D= $37,4 \pm 4$ n=4) (Figura 5).

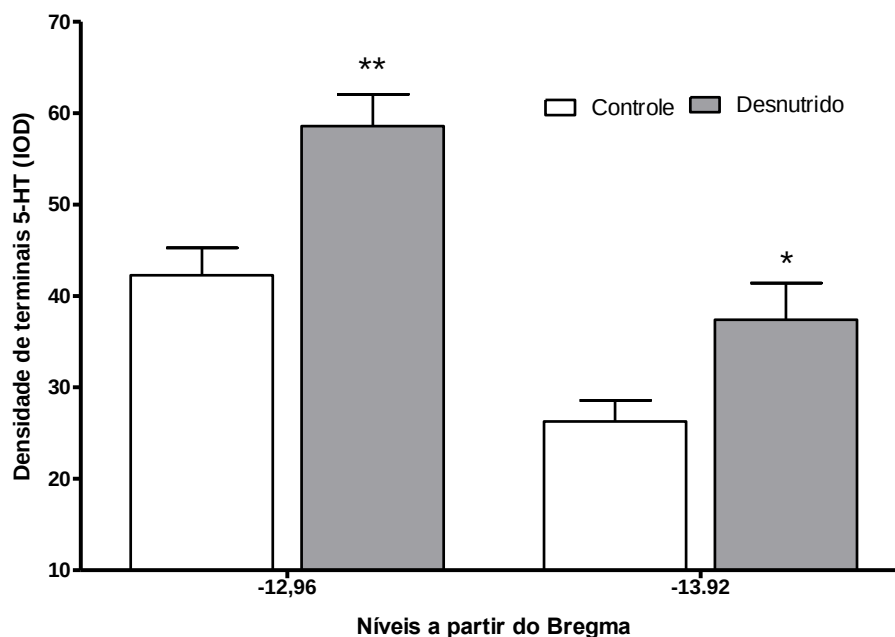


Figura 5- Efeito da desnutrição perinatal sobre a densidade de terminais serotoninérgicos no NTS a partir de seu eixo ântero-posterior. Os ratos desnutridos consumiram dieta hipoproteica (caseína 8%) e os controles dieta normoproteica (17% caseína) durante a gestação e lactação. Os dados estão representados em média $\pm$ erro padrão. Foi utilizado o teste t para a comparação entre os grupos, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Por outro lado, para o subnúcleo intermediário, a análise ântero-posterior revelou que a maior densidade de terminais serotoninérgicos observada está distribuída apenas no nível de bregma -13,96 (C= $21,8 \pm 3,8$ n= 5; D= $67,9 \pm 2,8$ n=4), uma vez que no nível -12,96 a mesma se mostra reduzida no grupo experimental quando comparado ao controle (C= $34,7 \pm 3,2$ n= 5; D= $18,5 \pm 0,6$ n=4). (Figura 6B).

Para os demais subnúcleos analisados (SOLVL, SOLM e SOLC) não houve diferença nas densidades entre os grupos analisados bem como entre os níveis de bregma observados, conforme pode ser visto na Figura 6

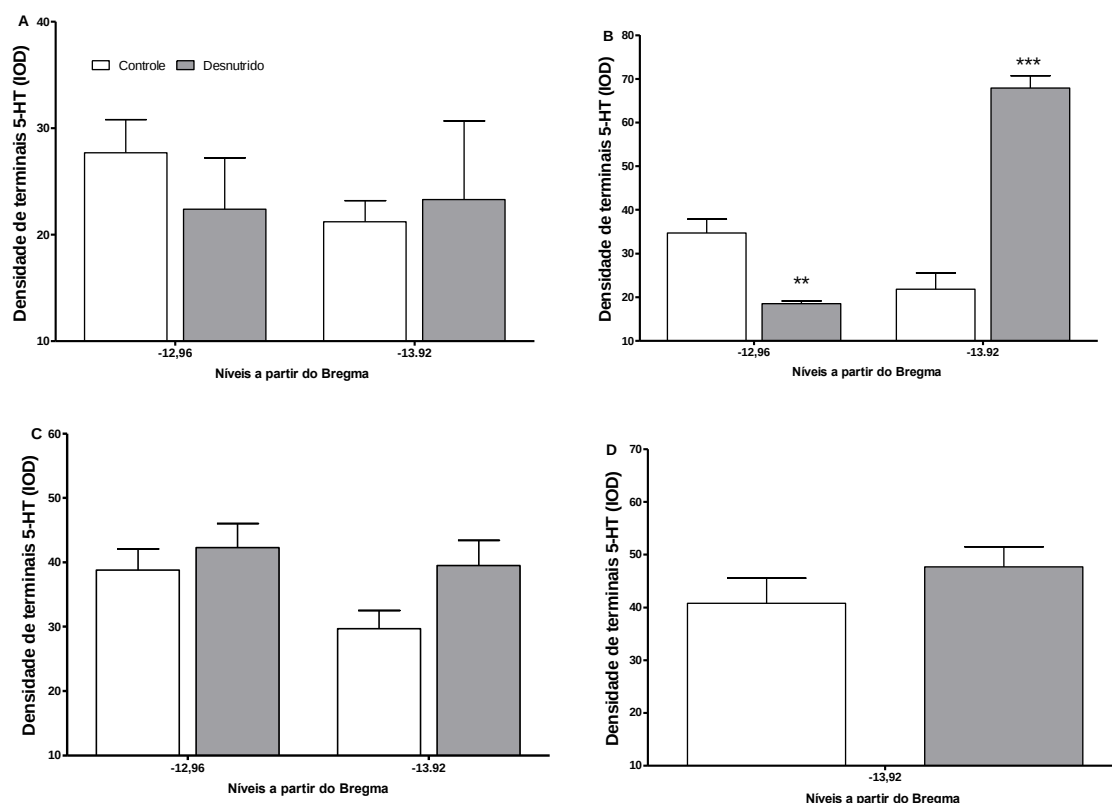


Figura 6- Efeito da manipulação nutricional perinatal sobre a densidade de terminais serotoninérgicos em subnúcleos específicos do NTS a partir de seu eixo ântero-posterior. A) subnúcleo ventrolateral, b) subnúcleo intermediário, c) subnúcleo medial, d) subnúcleo comissural. Os ratos desnutridos consumiram dieta hipoproteica (caseína 8%) e os controles dieta normoproteica (17% caseína) durante a gestação e lactação. Os dados estão representados em média $\pm$ erro padrão. Foi test t para a comparação entre os grupos, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

7.3 Análise quantitativa de neurônios 5-HT1B-IR no NTS.

Comparado ao grupo controle, o desnutrido apresentou maior quantidade de neurônios 5-HT1B-IR ($C = 159,6 \pm 18,2/N=5$; $D = 317,1 \pm 18,6/N=5$) no NTS como um todo. De forma semelhante, a análise quantitativa de neurônios 5-HT1B-IR a partir dos subnúcleos específicos do NTS revelou que estes neurônios se encontram em maior quantidade nos subnúcleos ventrolateral ($C = 20,1 \pm 2,7/N=5$; $D = 34,4 \pm 3,5/N=5$, intermediário ($C = 20,9 \pm 2,8/N=5$; $D = 49,3 \pm 3/N=5$ e medial ($C = 45,6 \pm 6/N=5$; $D = 95,4 \pm 6/N=5$) de animais do grupo desnutrido quando comparado ao controle (Figura 7). Nenhuma diferença entre os grupos foi observada para o subnúcleo comissural ($C = 16,8 \pm 2,2/N=5$; $D = 19,4 \pm 2,6/N=5$).

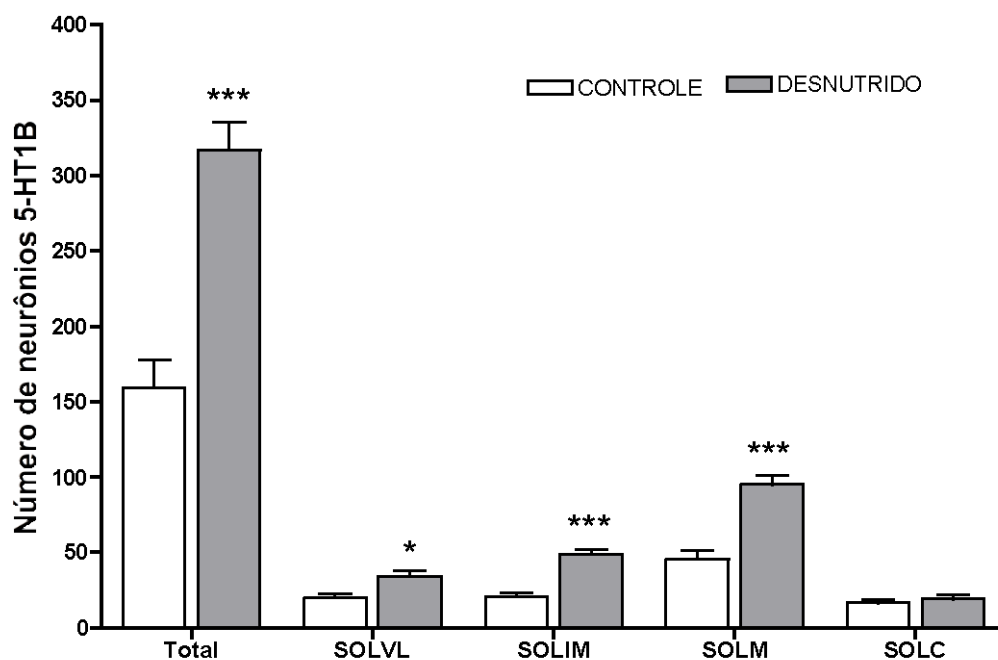


Figura 7- Análise quantitativa de neurônios imunorreativos ao receptor 5-HT1B no NTS e seus subnúcleos específicos de animais desnutridos. Solvl: subnúcleo ventrolateral; SOLIM: subnúcleo intermediário; SOLM- subnúcleo medial e SOLC- subnúcleo comissural. Os ratos desnutridos consumiram dieta hipoproteica (caseína 8%) e os controles dieta normoproteica (17% caseína) durante a gestação e lactação. Os dados estão representados em média $\pm$ erro padrão. Foi utilizado teste t para a comparação entre os grupos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Avaliando o NTS em seu eixo ântero-posterior observamos que esta maior quantidade de neurônios 5-HT1B-IR está distribuída nos níveis de bregma -12,96 (C= $194 \pm 25,9/n=5$; D= $331,2 \pm 28,3/n=5$) e -13,96 (C= $125,2 \pm 24,2/n=5$; D= $303 \pm 17,2/n=5$). (Figura 8)

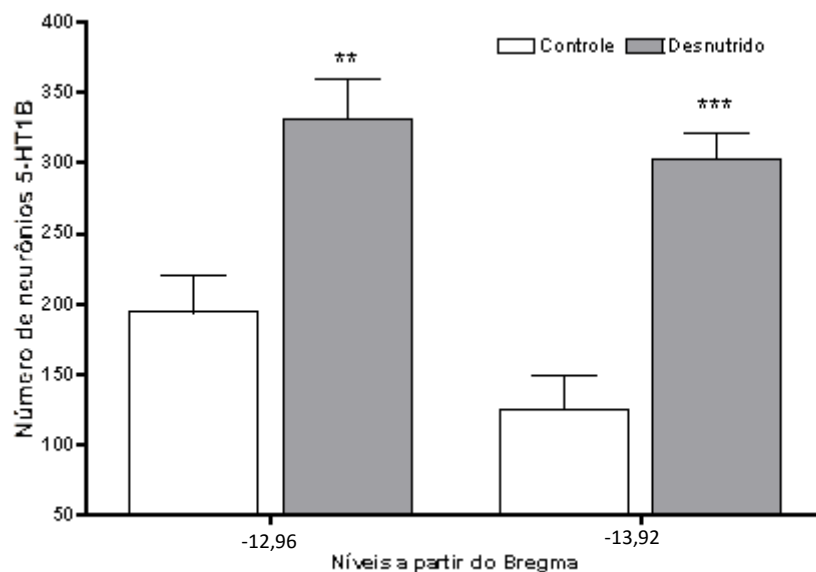


Figura 8- Efeito da desnutrição perinatal sobre a densidade de neurônios imunorreativos ao receptor 5-HT1B no NTS a partir de seu eixo ântero-posterior. Os ratos desnutridos consumiram dieta hipoproteica (caseína 8%) e os controles dieta normoproteica (17% caseína) durante a gestação e lactação. Os dados estão representados em média $\pm$ erro padrão. Foi utilizado teste t para a comparação entre os grupos, * $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A análise ântero- posterior dos subnúcleos do NTS revelou uma distribuição por níveis de bregma diferenciada, apesar dos subnúcleos SOLVL, SOLIM e SOLC apresentarem uma maior quantidade de neurônios 5-HT1B-IR no grupo desnutrido quando comparado ao controle, apenas nos subnúcleos intermediário e medial estes neurônios se distribuem em ambos níveis de bregma -12,96 (*SOLIM*: C= 20,4 $\pm$ 1,1/n=5; D= 34,8 $\pm$ 4,2/n=5; *SOLM*: C= 61,2 $\pm$ 9,8/n=5; D=126,4 $\pm$ 14,4/n=5) e -13,92 (*SOLIM*: C=21,4 $\pm$ 5,0/n=5; D=63,8 $\pm$ 2,27/n=5; *SOLM*: C=30 $\pm$ 4,8/ n=5; D=64,4 $\pm$ 5,5/n=5). No subnúcleo ventrolateral, a maior quantidade de neurônios 5-HT1B-IR está distribuída apenas no nível de bregma -13,96 (C=15,6 $\pm$ 3,4/n=5; D=33,8 $\pm$ 4,7/n=5). Nenhuma diferença foi observada para o subnúcleo comissural (C= 16,8 $\pm$ 2,2/ n=5; D=19,4 $\pm$ 2,6/ n=5) (Figura 9).

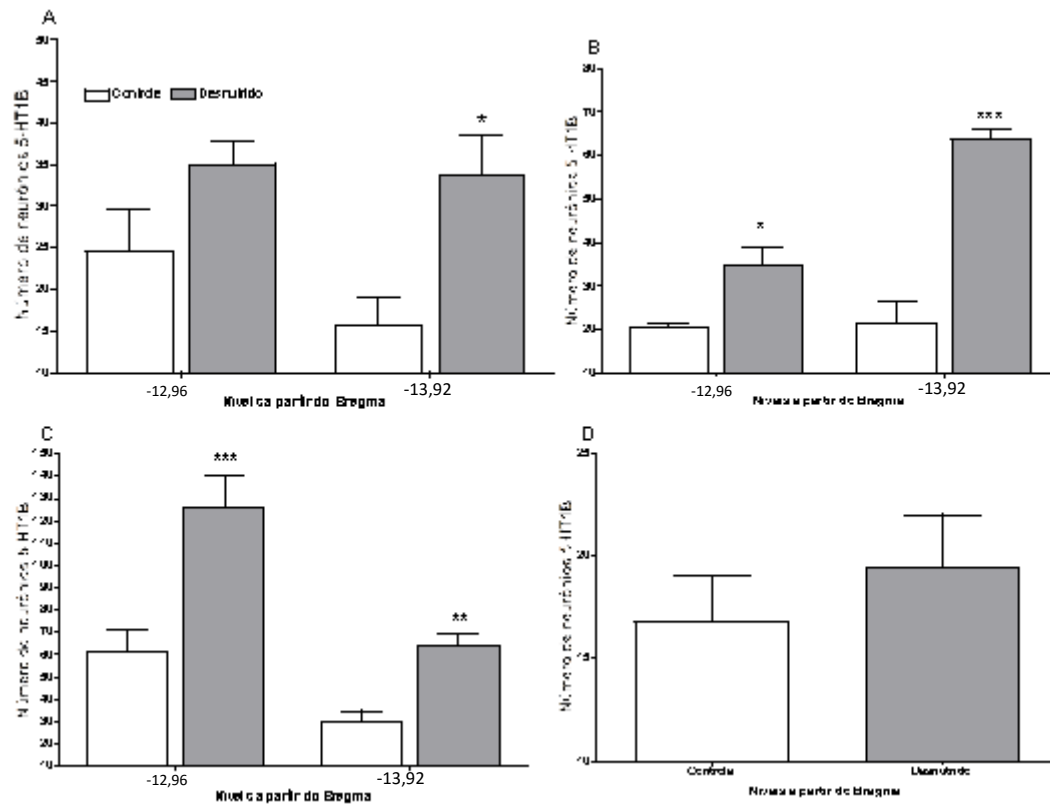


Figura 9- Efeito da desnutrição perinatal sobre a densidade neurônios imunorreativos ao receptor 5-HT1B em subnúcleos específicos do NTS a partir de seu eixo ântero-posterior. A) subnúcleo ventrolateral, b) subnúcleo intermediário, c) subnúcleo medial, d) subnúcleo comissural. Os ratos desnutridos consumiram dieta hipoproteica (caseína 8%) e os controles dieta normoproteica (17% caseína) durante a gestação e lactação. Os dados estão representados em média $\pm$ erro padrão. Foi test t para a comparação entre os grupos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

8. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo indicam que a desnutrição perinatal promove aumento na densidade de terminais 5-HT, bem como do número de receptores 5-HT_{1B} no NTS. Evidenciamos que esses resultados se diferenciam a depender do subnúcleo analisado no NTS. Maior densidade de terminais 5-HT foram observados no núcleo intermediário, enquanto houve aumento no número de neurônios imunorreativos ao receptor 5-HT_{1B} nos subnúcleos ventro-lateral, medial e intermediário. Além disso, a desnutrição perinatal promoveu hiperfagia, retardo de saciedade e maior ativação neuronal no NTS em resposta a estímulo alimentar, resultados discutidos no artigo original publicado.

Relevantes investigações epidemiológicas e experimentais têm demonstrado que a desnutrição durante o período perinatal (Hales; Barker, 1992; Langley-Evans, 2001) está associada a ajustes em diferentes estruturas encefálicas e vias de sinalização de controle do comportamento alimentar, se configurando como um importante fator de risco para o desenvolvimento de obesidade e outras desordens metabólicas na vida adulta (Morgane et al, 2002; Armitage et al, 2004; Bellinger; Langley-Evans, 2005; Lopes de Souza et al, 2008; Breton et al, 2009; Orozco-Solis et al, 2010, 2011; Silva et al, 2016). De modo particular, as repercussões deste tipo de manipulação podem ser observadas em diferentes sistemas de neurotransmissão, principalmente o serotoninérgico (Fletcher; Burton, 1984; Manjarréz et al, 1988; 2003; Chen et al, 1992; Alfaro-Rodrigues et al, 2006; Lopes de Souza et al, 2008). Estudos envolvendo modelos animais para a desnutrição pré e/ou pós-natal apontam que roedores desnutridos exibem, na vida adulta, altos níveis de serotonina encefálica (Kalyanasundaram; Ramanamurthy, 1981; Resnick; Morgane, 1984; Manjarrez et al, 2003; Alfaro-Rodrigues et al, 2006), aumento da fração livre de triptofano encefálico e plasmático, bem como aumento da atividade da triptofano hidroxilase, a enzima limitante na síntese deste neurotransmissor (Manjarrez et al, 1996).

No presente estudo, observamos que a desnutrição perinatal atuou sobre o sistema serotoninérgico no NTS aumentando a densidade de terminais. Embora estudos que investiguem as repercussões da desnutrição perinatal sobre o controle do comportamento alimentar pelo NTS, sejam escassos, nosso estudo vem apontar uma relação com a via de neurotransmissão serotoninérgica. Este resultado pode ser de certa forma, corroborado por repercussões promovidas por manipulação farmacológica com

inibidores seletivos da receptação da serotonina (ISRS) nos períodos pré e/ou pós- natal (Norrholm; Ouimet, 2000; Maciag et al, 2006; Borue et al, 2007; Mendes da Silva et al, 2010), que possivelmente aumenta os níveis de serotonina encefálica como a desnutrição (Pinheiro, 2013). Nestes estudos são observadas alterações na morfologia e densidade de terminais serotoninérgicos, bem como no conteúdo encefálico de serotonina (Cabrera-Vera et al, 1997; Mendes da Silva et al, 2010). O tratamento neonatal com a fluoxetina reduz o número de neurônios 5-HT no núcleo Dorsal da Rafe, a densidade de terminais no giro dentado do hipocampo em ratos adultos (Mendes da Silva et al., 2010). Este tratamento reduziu o diâmetro, a área e o perímetro de neurônios serotoninérgicos nos núcleos Dorsal e Mediano da rafe (Mendes da Silva et al., 2010). Muito embora o tipo de manipulação e as áreas estudadas difiram da utilizada neste trabalho, em ambos os casos, o possível aumento de serotonina encefálica durante o desenvolvimento promove modulação morfofuncional de componentes do sistema serotoninérgico. Em outro estudo, foi verificado em animais tratados com fluoxetina no período da lactação, aumento na densidade de terminais serotoninérgicos em núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle do comportamento alimentar (Lopes de Souza, 2005). Estas alterações na densidade dos terminais serotoninérgicos no NTS podem estar relacionadas às adaptações funcionais envolvendo a modulação serotoninérgica nesta região. Isto ocorre provavelmente porque o período pré e pós-natal representam a fase crítica onde o NTS se torna mais suscetível às influências ambientais que podem alterar os padrões de maturação de seus circuitos neuronais, inclusive os relacionados ao comportamento alimentar (Dufour et al., 2010).

No presente estudo, a desnutrição promoveu aumento da densidade de terminais serotoninérgicos de forma seletiva para os subnúcleos do NTS, apenas no núcleo intermediário. Além disso, ao longo de sua extensão rostrocaudal, a distribuição dos terminais não se mostrou uniforme. O NTS é descrito na literatura como sendo uma região densamente innervada por terminais serotoninérgicos, particularmente em seus subnúcleos medial, comissural, ventrolateral e intermediário (Pickel et al, 1984; Calza et al, 1985; Manaker & Verderame, 1990). O aumento na densidade destes terminais, no presente estudo, apenas no intermediário pode estar associado ao fato dessa região apresentar maior sensibilidade às adaptações em resposta a desnutrição perinatal. Isto pode estar relacionado não ao fato deste subnúcleo apresentar algum padrão diferenciado de maturação que o torne mais suscetível às influências perinatais, uma vez que a diferenciação do NTS em suas sub-regiões ocorre de forma simultânea o longo de

toda a sua extensão rostrocaudal (Zhang; Ashwell, 2001), mas porque este subnúcleo possivelmente esteja relacionado a alguma função específica associada à regulação/sinalização serotoninérgica do comportamento alimentar. O subnúcleo intermediário em conjunto com o central estão envolvidos na modulação da atividade reflexa do trato alimentar superior, principalmente nos mecanismos de deglutição e motilidade esofágica (Manaker; Verderame, 1990; Ciriello et al, 1994).

Além disso, a implicação funcional da densidade de terminais no subnúcleo intermediário em decorrência da desnutrição perinatal deve ser observada com cautela, uma vez que a distribuição rostrocaudal dos terminais serotoninérgicos neste subnúcleo não se mostrou uniforme. As porções rostral e medial apresentaram respectivamente redução e aumento na densidade de terminais. Essa diferença pode ser decorrente da organização geral das aferências no NTS. A porção rostral é quase que inteiramente voltada para recepção gustatória, enquanto que a porção medial está envolvida na recepção das informações gastrointestinais (Barraco et al., 1992; King, 2007; Rubio-Navarro et al, 2011; Young, 2012).. Apesar de estarem relacionadas a informações distintas é necessário que, no NTS, ambas sejam integradas de forma a influenciar apropriadamente as respostas autonômicas gerais, modulando assim o gasto energético e o consumo alimentar (Streefland; Jansen, 1999).

Outros estudos também observaram as repercussões regionais da desnutrição perinatal sobre o NTS. Rubio e colaboradores (2004) avaliando as consequências da desnutrição precoce sobre população de neurônios envolvidos na recepção gustatória na porção rostral do NTS, observaram que animais desnutridos apresentavam redução no número e tamanho das extensões dendríticas, região mais relacionada na recepção gustatória. Em nosso estudo também observamos que a desnutrição perinatal significativamente aumenta a expressão de neurônios imunorreativos à proteína Fos tanto na porção medial quanto rostral do NTS de animais de 35 e 180 dias de vida em resposta ao estímulo alimentar. Possivelmente este aumento é uma tentativa do NTS em reduzir o consumo alimentar e promover a saciedade. Embora estes estudos corroborem nossos achados no que diz respeito a vulnerabilidade de regiões específicas do NTS à desnutrição perinatal, ainda são necessárias investigações para se caracterizar suas consequências funcionais, particularmente o papel da serotonina no controle do comportamento alimentar mediado pelo NTS.

Neste estudo, além do aumento da densidade de terminais serotoninérgicos no NTS, observamos que a desnutrição perinatal aumentou a expressão de neurônios

imunorreativos ao receptor 5-HT1B. Considerando a orientação rostrocaudal do NTS, a expressão destes neurônios foi maior nos subnúcleos medial, intermediário e ventrolateral. Estudos anteriores apontam que os receptores 5-HT1B são suscetíveis às influências da desnutrição pré e/ou pós-natal (Manjarrez et al, 2003; Porto et al, 2008; Lopes de Souza et al, 2008). A desnutrição pré-natal aumentou os níveis hipotalâmicos de receptor 5-HT1B, porém reduziu de 5HT2C (Porto et al., 2008). Segundo esses autores, é possível que a interação prejudicada de serotonina com seus receptores e problemas nas vias de estimulação após ligação ao receptor estejam envolvidas na capacidade alterada deste neurotransmissor em reduzir a ingestão de alimentos (Porto et al., 2008). Lopes de Souza et al (2008), a partir de análises farmacológicas com agonista seletivo CP-94253 para o receptor 5-HT1B, observaram que a desnutrição perinatal reduz a ação inibitória da serotonina sobre o consumo alimentar via dessensibilização dos receptores 5-HT1B. Esta alteração pode estar associada com a hiperfagia observada na vida adulta (Lopes de Souza et al, 2008). Neste mesmo estudo, verificou-se que o receptor 5HT2C, que também atua no hipotálamo induzindo saciedade, não foi alterado pela desnutrição (Lopes de Souza et al, 2008). Isto aponta para uma maior sensibilidade do receptor 5-HT1B a agressão ambiental perinatal. Essa dessensibilização parece ter impacto sobre o tamanho de refeições individuais, visto que a estimulação seletiva do receptor 5-HT1B com o agonista CP-94 253 reduz a duração e o tamanho de refeições individuais sem alterar a taxa de alimentação (Lee et al., 2002).

Evidências sugerem que os receptores 5-HT1B atuam em cooperação com os receptores 5HT2C para mediar os efeitos da serotonina na alimentação (Lucas et al., 1998; Simansky; Nicklous, 2002; Lee et al., 2004). Os efeitos inibitórios da serotonina sobre o tamanho da refeição são predominantemente mediados pelos receptores 5-HT1B, enquanto que a redução na taxa de alimentação resulta principalmente a estimulação seletiva de receptores 5-HT2C (Simansky; Vaidya, 1990; Grignaschi; Samanin, 1992). Em animais desnutridos pré e/ou pós natal, a redução da ação anorética da serotonina e a hiperfagia apresentada parecem estar mais associados a redução da ação dos receptores 5-H1B (Porto et al, 2008; Lopes de Souza et al, 2008). Em nosso estudo observamos que animais submetidos à desnutrição perinatal apresentam hiperfagia, retardo na saciedade bem como aumento no tamanho e duração de refeições (Lira et al, 2014). Além disto, no presente estudo, observamos aumento na expressão de neurônios imunorreativo ao receptor 5-HT1B no NTS, indicando que a desnutrição

perinatal também possa promover a dessensibilização dos receptores 5-HT1B à semelhança do que ocorre no hipotálamo.

No presente estudo, a desnutrição perinatal promoveu aumento no número de neurônios imunorreativos ao receptor 5-HT1B nos subnúcleos ventro-lateral, medial e intermediário. Este resultado, pode estar relacionado a maior sensibilidade destas regiões às modificações do sistema serotoninérgico em resposta á desnutrição perinatal, possivelmente devido ao fato destes subnúcleos exercerem funções específicas no controle da saciedade mediada pela serotonina. Em estudo morfológico da organização dos receptores 5-HT1A e 5-HT1B no NTS, foi observada maior densidade do 5-HT1B no subnúcleo ventro-lateral, uma região implicada diretamente na função respiratória, e em menor concentração nos subnúcleos central, medial, intermediário e dorsolateral (Manaker; Verderame, 1990). O subnúcleo intermediário está envolvidos na modulação da atividade do trato alimentar superior (Manaker; Verderame, 1990; Ciriello et al, 1994), enquanto que no subnúcleo medial são expressos alguns peptídeos relacionados ao controle do comportamento alimentar como NPY, CART e CKK (Herbert et al, 1990; Mercer et al, 2000; Berthoud, 2000; Migita et al, 2001; Blevins; Baskin, 2010; Armbruszt et al, 2013). Além disso, essa região contém neurônios catecolaminérgicos que são ativados pela serotonina, modulando assim, o consumo alimentar (Cui et al, 2012)

Diante dos resultados obtidos, podemos observar que o NTS é uma região suscetível as influências da desnutrição perinatal. Igualmente, a repercussão da desnutrição sobre o sistema de neurotransmissão serotoninérgico neste núcleo é evidente. Entretanto, apesar deste ser o primeiro relato acerca dos efeitos desta manipulação precoce sobre o sistema serotoninérgico no NTS, mais investigações necessitam ser realizadas para esclarecer os mecanismos alterados. Este estudo é um dos primeiros a mostrar as influências da desnutrição perinatal sobre a capacidade do NTS em regular o comportamento alimentar.

9. CONCLUSÃO

A desnutrição perinatal aumenta a responsividade do NTS a estímulo alimentar, bem como a densidade de terminais serotoninérgicos e o número de neurônios imunorreativos ao receptor 5-HT1B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAN, R. A. H. et al. The MC4 receptor and control of appetite. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, n. 7, p. 815–27, dez. 2006.

AHIMA, R. S.; HILEMAN, S. M. Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation. **Regulatory Peptides**, v. 92, n. 1-3, p. 1–7, 25 ago. 2000.

AJA, S. Serotonin-3 receptors in gastric mechanisms of cholecystokinin-induced satiety. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and cComparative Physiology**, v. 291, n. 1, p. R112–4, jul. 2006.

ALFÁRO-RODRÍGUES, A. et al. Serotonin and 5-hydroxy-indole-acetic acid contents in dorsal raphe and suprachiasmatic nuclei in normal, malnourished and rehabilitated rats under 24h of sleep deprivation. **Brain Research**, v.1110, p. 95-101, 2006.

ALTSCHULER, S. M. et al.. Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: Sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts. **Journal of Comparative Neurology**, v. 283, p.248-268, 1989.

ARMBRUSZT, S et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in feeding- and reward-related brain areas of young OLETF rats. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v.0, p.75-84, 2013.

ARMITAGE, J. A. et al. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutrition imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals. **Journal of Physiology**, v. 561, n. 2, p.355-377. 2004.

ASSARIAN, L. Loss of cholecystokinin and glucagon-like peptide-1-induced satiation in mice lacking serotonin 2C receptors. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n.1, p.R51-6, 2009.

AUSTGEN, J. R. et al. 5-Hydroxytryptamine 2C receptors tonically augment synaptic currents in the nucleus tractus solitarii. **Journal of Neurophysiology**, v. 108, p.2292–2305, 2012.

AZMITIA, E.C. Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity and homeostasis. **International Review of Neurobiology**, v.77, p. 31-56, 2007.

BAPTISTA, V. et al. Characterization of neurons of the nucleus tractus solitarius pars centralis. **Brain Research**, v. 1052, n.2, p. 139-146, 2005.

BARBANO, M. F.; CADOR, M. Various aspects of feeding behavior can be partially dissociated in the rat by the incentive properties of food and the physiological state. **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 5, p. 1244–53, out. 2005.

BARRACO, R. et al. An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. **Brain Research Bulletin**, v. 29, n. 6, p. 703–65, dez. 1992.

BELLINGER, L. et al. Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. **British Journal of Nutrition**, v.92, n.3, p.513-20, 2004.

BELLINGER, L et al. Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. **International Journal of Obesity**, v.30, n.5, p.729-38, 2006.

BELLINGER, L.; LILLEY, C.; LANGLEY-EVANS, S. C. Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 03, p. 513, 9 mar. 2007.

BERTHOUD, H.-R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 26, n. 4, p. 393–428, jun. 2002.

BERTHOUD, H.R. The Caudal Brainstem and the Control of Food Intake and Energy Balance. IN: Neurobiology of Food and Fluid Intake, v. 14, **Handbook of Behavioral Neurobiology**, p. 195-240, 2004,

BERTHOUD, H.-R. Vagal and hormonal gut-brain communication: from satiation to satisfaction. **Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 20 Suppl 1, p. 64–72, maio 2008.

BERTHOUD, H.-R. Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? **Current opinion in neurobiology**, v. 21, n. 6, p. 888–96, dez. 2011.

BERTHOUD, H.-R.; MORRISON, C. The brain, appetite, and obesity. **Annual review of psychology**, v. 59, p. 55–92, jan. 2008.

BLEVINS, J. E.; BASKIN, D. G. Hypothalamic-brainstem circuits controlling eating. **Forum of nutrition**, v. 63, p. 133–40, jan. 2010.

BORUE, X.; CHEN, J.; CONDRON, B.G. Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, p.341–347, 2007

BRETON, C. et al, Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 296, p.E462–E472, 2009.

CABRERA-VERA, T.M. et al. Effect of prenatal fluoxetine (Prozac) exposure on brain serotonin neurons in prepubescent and adult male rat offspring, **Journal of Pharmacology Experimental Theory**, v. 280, n.1, p. 138–145, 1997.

CALZA L et al. Presence of 5-HT-positive neurons in the medial nuclei of the solitary tract. **Brain Research**, v. 347, p.135-139,1985.

CASTRO, R. M. DE et al. Tratamento com inibidor de recaptura de serotonina, no período neonatal, reduz agressividade intraespecífica em ratos adultos. **Neurobiologia**, v. 61, n. 2, p. 61–9, 1998.

CHEN, J.C. et al. Prenatal protein malnutrition in rats enhances serotonin release from hippocampus. **Journal of Nutrition**, v.122, p. 2138-2143, 1992.

CIRIELLO, J.; HOCHSTENBACH, S.L.; RODER, S. Central projection of baroreceptor and chemoreceptor afferent fibers in the rats. IN:BARRACO, R.A. Nucleus of the solitary tract, **CRC**, 1994.

- CUI, R.J. et al. Serotonin activates catecholamine neurons in the solitary tract nucleus by increasing spontaneous glutamate inputs. **The Journal of Neuroscience**, v.32, n. 46, p.16530 – 16538, 2012.
- DALTON, G.L. et al. Serotonin 1B and 2C receptor interactions in the modulation of feeding behaviour in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 185, p.45–57, 2006.
- DE VRY J.; SCHREIBER, R. Effects of selected serotonin 5-HT1 and 5-HT2 receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.24, p.341–53, 2000.
- DESAI, M. et al. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 288, n. 1, p. R91–6, jan. 2005.
- DIROCCO, R. J.; GRILL, H. J. The forebrain is not essential for sympathoadrenal hyperglycemic response to glucoprivation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 204, n. 4397, p. 1112–4, 8 jun. 1979.
- DUFOUR, A. et al. Perinatal development of inhibitory synapses in the nucleus tractus solitarii of the rat. **European Journal of Neuroscience**, v.32, n.4, p. 538-49, 2010.
- ELLACOTT, K. L. J.; CONE, R. D. The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. **Recent progress in hormone research**, v. 59, p. 395–408, jan. 2004.
- ELLACOTT, K. L. J.; HALATCHEV, I. G.; CONE, R. D. Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem. **Endocrinology**, v. 147, n. 7, p. 3190–5, jul. 2006.
- EMOND, M.; SCHWARTZ, G. J.; MORAN, T. H. Meal-related stimuli differentially induce c-Fos activation in the nucleus of the solitary tract. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 280, n. 5, p. R1315–21, maio 2001.
- FAIPOUX, R. et al. Proteins activate satiety-related neuronal pathways in the brainstem and hypothalamus of rats. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 6, p. 1172–8, jun. 2008.
- FAN, W. et al. Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 335–6, abr. 2004.
- FELDMAN, P.D. Electrophysiological effects of serotonin in the solitary tract nucleus of the rat. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 349, n.5, p. 447-454, 1994.
- FLETCHER, P.J; BURTON, M.J. Effectos of manipulations of peripheral serotonin on feeding and drinking in the rat. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 20, p. 835-840, 1984.
- FLYNN, F. W.; GRILL, H. J. Insulin elicits ingestion in decerebrate rats. **Science (New York, N.Y.)**, v. 221, n. 4606, p. 188–90, 8 jul. 1983.
- GAHAGAN, S. Development of eating behavior: biology and context. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics : JDBP**, v. 33, n. 3, p. 261–71, abr. 2012.
- GARFIELD, A.S. et al. Distribution of cells responsive to 5-HT₆ receptor antagonist-induced hypophagia. **Behavioral Brain Research**, v.266, p.201-206, 2014.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; MITCHELL, M. D. Developmental origins of health and disease: reducing the burden of chronic disease in the next generation. **Genome Medicine**, v. 2, n. 2, p. 14, jan. 2010.

GRIGNASCHI, G.; SAMANIN, R. Role of 5-HT receptors in the effect of d-fenfluramine on feeding patterns in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 212, p. 287–289, 1992.

GRIGSON, P. S. et al. Reward comparison in chronic decerebrate rats. **The American Journal of Physiology**, v. 273, n. 2 Pt 2, p. R479–86, ago. 1997.

GRILL, H. J. et al. Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting effects on feeding and body weight. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 23, p. 10128–35, 1 dez. 1998.

GRILL, H. J. Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 14 Suppl 5, n. August, p. 216S–221S, ago. 2006.

GRILL, H. J. Leptin and the systems neuroscience of meal size control. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 31, n. 1, p. 61–78, jan. 2010.

GRILL, H. J.; HAYES, M. R. The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. **International journal of obesity (2005)**, v. 33 Suppl 1, n. S1, p. S11–5, abr. 2009.

GRILL, H. J.; HAYES, M. R. Hindbrain neurons as an essential hub in the neuroanatomically distributed control of energy balance. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 3, p. 296–309, 5 set. 2012.

GRILL, H. J.; KAPLAN, J. M. The neuroanatomical axis for control of energy balance. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 23, n. 1, p. 2–40, jan. 2002.

GRILL, H. J.; NORGREN, R. The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. **Brain Research**, v. 143, n. 2, p. 281–97, 24 mar. 1978.

GRILL, H. J.; SMITH, G. P. Cholecystokinin decreases sucrose intake in chronic decerebrate rats. **The American Journal of Physiology**, v. 254, n. 6 Pt 2, p. R853–6, jun. 1988.

GROVE, K. L.; BROGAN, R. S.; SMITH, M. S. Novel expression of neuropeptide Y (NPY) mRNA in hypothalamic regions during development: region-specific effects of maternal deprivation on NPY and Agouti-related protein mRNA. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4771–6, nov. 2001.

GUSTAFSON, E.L. et al. A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT₇ receptor in rat brain. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, p. 657–666, 1996.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia [S.I.]**, v. 35, n. 7, p. 595–601, Jul 1992.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. **British Medical Bulletin**, v. 60, p. 5–20, jan. 2001.

HALFORD, J.C., et al. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.61, n.2, p.159–168, 1998.

HAYES, M. R. et al. Endogenous leptin signaling in the caudal nucleus tractus solitarius and area postrema is required for energy balance regulation. **Cell Metabolism**, v. 11, n. 1, p. 77–83, jan. 2010.

HAYES, M. R.; COVASA, M. CCK and 5-HT act synergistically to suppress food intake through simultaneous activation of CCK-1 and 5-HT₃ receptors. **Peptides**, v. 26, n. 11, p. 2322–30, nov. 2005.

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

HEN R. Of mice and flies: commonalities among 5-HT receptors. **Trends Pharmacology Science**, v. 13, p.160–5, 1992.

HERBERT, H.; MOGA, M. M.; SAPER, C. B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 293, p. 540–580, 1990.

HOFFMAN, G. E.; LYO, E D. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? **Journal Neuroendocrinology**, v.14, n.4, p.259–68, 2002.

HOFFMAN, G. E. et al. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. **Frontiers Neuroendocrinology**, v.14, n.3, p.173–213, 1993.

HUO, L. et al. Divergent leptin signaling in proglucagon neurons of the nucleus of the solitary tract in mice and rats. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 492–7, mar. 2008.

HUO, L.; GRILL, H. J.; BJØRBAEK, C. Divergent regulation of proopiomelanocortin neurons by leptin in the nucleus of the solitary tract and in the arcuate hypothalamic nucleus. **Diabetes**, v. 55, n. 3, p. 567–73, mar. 2006.

JIANG, C.; FOGEL, R.; ZHANG, X. Lateral hypothalamus modulates gut-sensitive neurons in the dorsal vagal complex. **Brain Research**, v. 980, n. 1, p. 31–47, 1 ago. 2003.

KALYANASUNDARAM, S; RAMANAMURTHY, P.S.V. Effect of undernutrition on tryptophan and tyrosine hydroxylase in the developing rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v.36,n.4,p.1580-1582,1981.

KAPCKZINSKY, F. et al. Aspectos da fisiologia do triptofano. **Revista de Psiquiatria**, v. 25, n. 4, p.158-165, 1998.

KENNY, P. J. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 12, n. 11, p. 638–51, nov. 2011.

KING, M. Anatomy of the Rostral Nucleus of the Solitary Tract **CRC Press**, , 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2541/>>. Acesso em: 30 jul. 2014

KOEGLER, F. H.; RITTER, S. Galanin injection into the nucleus of the solitary tract stimulates feeding in rats with lesions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Physiology & Behavior**, v. 63, n. 4, p. 521–7, 15 mar. 1998.

KRINGELBACH, M. L.; STEIN, A.; VAN HARTEVELT, T. J. The functional human neuroanatomy of food pleasure cycles. **Physiology & Behavior**, v. 106, n. 3, p. 307–16, 6 jun. 2012.

LANGLEY-EVANS, S. C. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.60, n.4, p.505-13. 2001.

LEE, M.D. et al. 5-HT_{1B} receptors modulate components of satiety in the rat: behavioural and pharmacological analyses of the selective serotonin_{1B} agonist CP-94,253. **Psychopharmacology**, v.164, p 49–60, 2002.

LEE, M. D. et al. Reduced hypophagic effects of d-fenfluramine and the 5-HT_{2C} receptor agonist mCPP in 5-HT_{1B} receptor knockout mice. **Psychopharmacology** (Berl.), v.176, p. 39–49, 2004.

LESLIE R. A. Neuroactive substances in the dorsal vagal complex of the medulla oblongata: nucleus tractus solitarius, area postrema and dorsal motor nucleus of the vagus. **Neurochemistry International**, v.7, p.191—211, 1985.

LI, G. et al. Melanocortin activation of nucleus of the solitary tract avoids anorectic tachyphylaxis and induces prolonged weight loss. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 1, p. E252–8, jul. 2007.

LI, M.; SLOBODA, D. M.; VICKERS, M. H. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. **Experimental Diabetes Research**, v. 2011, p. 592408, jan. 2011.

LIRA, L. A. et al. Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 38, p.23-29, 2014.

LIU, Z.; CHEN, C.; BONHAM, A.C. Frequency limits on aortic baroreceptor input to nucleus tractus solitarius. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 278 n. 2, p.H577-H585, 2000.

LIU, H. et al. Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 18, p. 7143–54, 6 ago. 2003.

LOPES DE SOUZA, S. et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **The European journal of neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1400–8, mar. 2008.

LOPES DE SOUZA, S. Sistema serotoninérgico: Estudo comportamental e neuroanatômico por manipulação farmacológica e nutricional em ratos neonatos. Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

LOEWY AD. Central autonomic pathways. In: Loewy AD, Speyer KM, editors. Central Regulation of Autonomic Functions. **Oxford: Oxford University Press**; 1990.

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

LUCAS, J. J. et al. Absence of fenfluramine-induced anorexia and reduced c-Fos induction in the hypothalamus and central amygdaloid complex of serotonin 1B receptor knock-out mice. **Journal of Neuroscience**, v. 18, p.5537–5544, 1998

LUTZ, T. A. et al. Lesion of the area postrema/nucleus of the solitary tract (AP/NTS) attenuates the anorectic effects of amylin and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in rats. **Peptides**, v. 19, n. 2, p. 309–17, jan. 1998.

MADZA, T. et al. Gastric distension-induced release of 5-HT stimulates c-fos expression in specific brain nuclei via 5-HT₃ receptors in conscious rats. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.287, p G228–G235, 2004.

MAGALHÃES, C. P. et al. Efeitos do tratamento neonatal com inibidor seletivo de recaptura da 5-HT sobre o desenvolvimento anatômico crânio-encefálico. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 64, n. 4, p. 990–993, dez. 2006.

MAGALHÃES, C. P. et al. Modulatory role of serotonin on feeding behavior. **Nutritional neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 246–55, dez. 2010.

MANARKER, S; VERDERAME, H.M. Organization of serotonin 1A and 1B receptors in the nucleus of the solitary tract. **The Journal of Comparative Neurology**, v : 301, p. 535-553, 1990.

MANJARREZ, G. et al. Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in utero. **Biology Neonate**, v.54, n.4, p.232-40. 1988.

MANJARREZ, G. G. et al. Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. **International Journal Development Neuroscience**, v.12, n.8, p.695-702, 1994.

MANJARREZ, G. G. et al. Nutritional recovery does not reverse the activation of brain serotonin synthesis in the ontogenetically malnourished rat. **International Journal of developmental Neuroscience**, v.14, n.5, p. 641-648, 1996

MANJARREZ, G. et al. Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.21, n.5,p.283-9, 2003.

MANOEL-APOLINAR, L. et al. Role of prenatal undernutrition in the expression of serotonin, dopamine and leptin receptors in adult mice: Implications of food intake. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, p. 407-412, 2014

MAZDA, T. et al. Gastric distension-induced release of 5-HT stimulates c-fos expression in specific brain nuclei via 5-HT₃ receptors in conscious rats. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 287, n. 1, p. G228–35, jul. 2004.

MENDES DA SILVA, C. et al. Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. **Neuroscience Letters**, v.483, p.179–183, 2010.

MENANI, J. V et al. Commissural nucleus of the solitary tract lesions reduce food intake and body weight gain in rats. **Brain research**, v. 740, n. 1-2, p. 102–8, 18 nov. 1996.

MERCER, L.D et al. Direct visualization of cholecystokinin subtype2 receptors in rat central nervous system using anti-peptide antibodies. **Neuroscience Letters**, v. 293, p. 167-170, 2000.

MIGITA, K et al. Immunohistochemical localization of the neuropeptide Y Y1 receptor in rat central nervous system. **Brain Research**, v. 889, p. 23-37, 2001.

MORAN, T. H. Gut peptide signaling in the controls of food intake. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 14 Suppl 5, p. 250S-253S, ago. 2006.

MORAN, T. H.; LADENHEIM, E. E.; SCHWARTZ, G. J. Within-meal gut feedback signaling. **International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 25 Suppl 5, p. S39-41, dez. 2001.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 26, n. 4, p. 471-83, jun. 2002.

MORTON, G. J.; MEEK, T. H.; SCHWARTZ, M. W. Neurobiology of food intake in health and disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 367-78, jun. 2014.

NORRHOLM, S.D.; OUIMET, C.C. Chronic fluoxetine administration to juvenile rats prevents age associated dendritic spine proliferation in hippocampus, **Brain Research**, v. 883, p. 205-215, 2000.

NOWAK, F. V; GORE, A. C. Perinatal developmental changes in expression of the neuropeptide genes preoptic regulatory factor-1 and factor-2, neuropeptide Y and GnRH in rat hypothalamus. **Journal of neuroendocrinology**, v. 11, n. 12, p. 951-8, dez. 1999.

OLIVER, K.R. et al. Localization of 5-HT(5A) receptor-like immunoreactivity in the rat brain. **Brain Research**, v. 867, p. 131-142, 2000.

ONG, K. K. et al. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 320, n. 7240, p. 967-71, 8 abr. 2000.

OROZCO-SOLÍS, R. et al. Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. **International journal of obesity (2005)**, v. 35, n. 7, p. 990-1000, jul. 2011.

OROZCO-SÓLIS, R. et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. **Physiology & behavior**, v. 96, n. 3, p. 481-92, 2 mar. 2009.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 58 Suppl 2, p. 18-28, jan. 2011.

PATON, J.F.R. Nucleus tractus solitarius: integrating structures. **Experimental Physiology**, v. 84, p. 815-833, 1999.

PAXINOS, G.; WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: **Academic Press**, 2005.

PICKEL, V.M. et al. Serotonergic terminals: ultrastructure and synaptic interaction with catecholamine- containing neurons in the medial nuclei of the solitary tract. **Journal of Comparative Neurology**, v. 225, p. 291-301, 1984.

PINHEIRO, I.L. Expressão gênica do transportador de serotonina e concentração de serotonina no hipotálamo de ratos jovens manipulados com fluoxetina durante a lactação. 2013. 57f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Experimental). Program de Pós Graduação em Nutrição- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

POMPEIANO, M.; PALACIOS, J.M.; MENGOD, G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. **Molecular Brain Research**, v. 23, p. 163–178, 1994

PÔRTO, L.C. et al. Impairment of the serotonergic control of feeding in adult female rats exposed to intra-uterine malnutrition. **British Journal of Nutrition**, p.1-7, 2008.

PUSKÁS, N. et al. Interactions between orexin-immunoreactive fibers and adrenaline or noradrenaline-expressing neurons of the lower brainstem in rats and mice. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1589–97, ago. 2010.

RAPPORT, M.M. Serum vasoconstrictor (serotonin). V. The presence of creatinine in the complex: A proposed structure of the vasoconstrictor principle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 180, p. 961 -969, 1949.

REMMERS, F.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. **Endocrine reviews**, v. 32, n. 2, p. 272–311, abr. 2011.

RESNICK, O; MORGANE, E. P. J. Ontogeny of the levels of serotonin in various parts of the brain in severely protein malnourished rats. **Brain Research**, v.303, n.1, p.163-70, 1984.

RINAMAN, L. Oxytocinergic inputs to the nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the vagus in neonatal rats. **The Journal of comparative neurology**, v. 399, n. 1, p. 101–9, 14 set. 1998.

RINAMAN, L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. **Brain research**, v. 1350, p. 18–34, 2 set. 2010.

RITTER, R. C. Gastrointestinal mechanisms of satiation for food. **Physiology & behavior**, v. 81, n. 2, p. 249–73, abr. 2004.

RUBIO, L. et al. Alterations in the solitary tract nucleus of the rat following perinatal food restriction and subsequent nutritional rehabilitation. **Nutritional neuroscience**, v. 7, n. 5-6, p. 291–300, 2004.

RUBIO-NAVARRO, L.; TORRERO, C.; SALAS, M. Basic brainstem taste responsivity: effects of perinatal influences Respuestas gustativas del tallo cerebral: efectos de influencias perinatales. **Neurobiologia**, v. 2, n. 3, 2011.

RUI, L. Brain regulation of energy balance and body weight. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 14, n. 4, p. 387–407, dez. 2013.

SÁNCHEZ-LASHERAS, C.; KÖNNER, A. C.; BRÜNING, J. C. Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 31, n. 1, p. 4–15, jan. 2010.

SCHAFFAR, N. et al. Central serotonergic projections to the nucleus tractus solitarii: evidence from a double labeling study in the rat. **Neuroscience**, v.26, n.3, p.951-958, 1988.

SCHWARTZ, G. J. Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 361, n. 1471, p. 1275–80, 29 jul. 2006.

SCHWARTZ, G. J.; MORAN, T. H. Sub-diaphragmatic vagal afferent integration of meal-related gastrointestinal signals. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 20, n. 1, p. 47–56, jan. 1996.

SCHWARTZ, G. J.; ZELTSER, L. M. Functional organization of neuronal and humoral signals regulating feeding behavior. **Annual review of nutrition**, v. 33, p. 1–21, jan. 2013.

SCHWEITZER, L. et al. Cell types in the rostral nucleus of the solitary tract. **Brain Research Reviews**, v. 20, p.185-195, 1995

SEELEY, R. J.; GRILL, H. J.; KAPLAN, J. M. Neurological dissociation of gastrointestinal and metabolic contributions to meal size control. **Behavioral neuroscience**, v. 108, n. 2, p. 347–52, abr. 1994.

SILVA, A.A.M, et al. Low protein diet during gestation and lactation increases food reward seeking but does not modify sucrose taste reactivity in adult female rats. **International Journal of Development Neuroscience**, v. 49, p.50-59, 2016.

SIMANSKY, K. J.;VAIDYA, A. H. Behavioral mechanisms for the anorectic action of the serotonin (5-HT) uptake inhibitor sertraline in rats: comparison with directly acting 5-HT agonists. **Brain Research Bulletin**, v. 25, p. 953–960, 1990.

SIMANSKY, K.J.Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. **Behavioural Brain Research**, v. 73, p.37–42, 1996.

SIMANSKY, K. J.; NICKLOUS, D. M. Parabrachial infusion of D-fenfluramine reduces foodintake. Blockade by the 5-HT(1B) antagonist SB-216641. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.71, p. 681–690, 2002.

SMITH, G. P. The direct and indirect controls of meal size. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 20, n. 1, p. 41–6, jan. 1996.

STEWART, L.J. et al. Labelling of 5-HT₃ receptor recognition sites in the rat brain using the agonist radioligand [3H]meta-chlorophenylbiguanide. **European Journal Pharmacology**, v. 243, p.13–18, 1993

STREEFLAND, C.; JANSEN, K. Intramedullary projections of the rostral nucleus of the solitary tract in the rat: gustatory influences on autonomic output. **Chemical Senses**, v. 24, p. 655–664, 1999.

SWITHERS, S. E. Do metabolic signals stimulate intake in rat pups? **Physiology & behavior**, v. 79, n. 1, p. 71–8, jun. 2003.

THOR, K.B.; BLITZ-SIEBERT, A.;HELKE, C.J. Autoradiographic localization of 5HT1 binding sites in autonomic areas of the rat dorsomedial medulla oblongata. **Synapse**, v. 10, p. 217–227, 1992.

TOSCANO, A. E. et al. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? **Life sciences**, v. 82, n. 21-22, p. 1131–6, 23 maio 2008.

TWAROG, B.M. Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 44, p.141–163, 1954

VAN DE WALL, E. H. E. M.; DUFFY, P.; RITTER, R. C. CCK enhances response to gastric distension by acting on capsaicin-insensitive vagal afferents. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 289, n. 3, p. R695–703, out. 2005.

VENTER, J.C et al. Evolution of neurotransmitter receptor systems. **Progress in Neurobiology** v.30, p.105–69, 1988.

VERGÉ, D; CALAS, A. Serotonergic neuron and serotonin receptors: gains from cytochemical approaches. **Journal of Chemical Neuroanatomy** , v.18, p. 41-56, 2000.

VIEAU, D. Perinatal nutritional programming of health and metabolic adult disease. **World Journal of Diabetes**, v. 2, n. 9, p. 133–136, 2011.

VILLALÓN, C.M.; VRIES, P; SAXENA, P. R. Serotonin receptors as cardiovascular targets. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v.2, n. 7, p.294-300, 1997.

VOIGT, J.P; FINK, H. Serotonin controlling feeding and satiety. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 14-31, 2015.

WHITAKER-AZMITIA, P.M. The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2S, p. 2S-8S, 1999.

WILLIAMS, D. L.; BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W. Hindbrain leptin receptor stimulation enhances the anorexic response to cholecystokinin. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 297, n. 5, p. R1238–46, nov. 2009.

WOOLLEY, D.W; SHAW, E. A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.40, p. 228–231, 1954.

YAMAMOTO, T. Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. **Archives Of Histology And Cytology** [S.I.], v. 69, n. 4, p. 243-55, Dec 2006.

YOSHIDA-YONEDA, E. et al. Peripheral bombesin induces gastric vagal afferent activation in rats. **The American journal of physiology**, v. 271, n. 6 Pt 2, p. R1584–93, dez. 1996.

YOUNG, A. A. Brainstem sensing of meal-related signals in energy homeostasis. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 1, p. 31–45, jul. 2012.

ZAMBRANO, E.; NATHANIELSZ, P. W. Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. **Nutrition reviews**, v. 71 Suppl 1, p. S42–54, out. 2013.

ZANGH, L.L.; ASHWELL, K.W.S. Development of the cyto- and chemoarchitectural organization of the rat nucleus of the solitary tract. **Anatomy and Embriology**, v. 203, p. 265–282, 2001.

ZHENG, H. et al. A potential role for hypothalamomedullary POMC projections in leptin-induced suppression of food intake. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 298, n. 3, p. R720–8, mar. 2010.

ZHENG, H.; PATTERSON, L. M.; BERTHOUD, H.-R. Orexin-A projections to the caudal medulla and orexin-induced c-Fos expression, food intake, and autonomic function. **The Journal of comparative neurology**, v. 485, n. 2, p. 127–42, 2 maio 2005.

ANEXOS

ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

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, 26 de outubro de 2011.

Ofício nº 416/11

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof.ª Sandra Lopes de Souza
Departamento de Anatomia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.037409/2011-64

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 nutricional do controle herdônico do comportamento alimentar: Um estudo de mecanismos comportamentais e celulares regulados pelo sistema serotoninérgico"**.

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

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

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

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição-UFPE; Animais: Ratos Wistar; Sexo: Machos e Fêmeas; Idade: ratas adultas e seus filhotes; Peso: entre 240-260 gramas; Número de animais previsto no protocolo: 160 animais.

Atenciosamente,

Maria Teresa Jansen
Prof.ª Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA



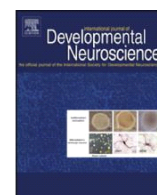
CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO B: ARTIGO ORIGINAL



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Developmental Neuroscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijdevneu

Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats



Lívia A. Lira^b, Larissa C.A. Almeida^b, Amanda A.M. da Silva^b, Taisy C.F. Cavalcante^c,
 Diogo D.C.B. de Melo^b, Juliet A. de Souza^c, Renata C.F. Campina^{a,b},
 Sandra L. de Souza^{a,b,c,?}

^a Department of Anatomy, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil

^b Postgraduate Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Universidade Federal Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil^c

Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil

article info

Article history:

Received 26 April 2014

Received in revised form 27 July 2014

Accepted 27 July 2014

Available online 4 August 2014

Keywords:

Perinatal undernutrition

Feeding behaviour

Nucleus of the solitary tract

Rats

Fos protein

abstract

During the early periods of development, i.e., gestation and lactation, the influences of stimulus such as undernutrition can lead to several behavioural and morphofunctional damages to organs and systems in general, including pathways and structures that control energy balance and feeding behaviour. Although a large body of evidences have shown the effects of this stimulus on structures such as hypothalamus, only few studies have directed their attention to the long-term effects of undernutrition on the nucleus of the solitary tract (NTS). The aim of this study was to investigate the effects of early undernutrition on the NTS and control of food intake in adulthood. Male Wistar rats were divided into two groups according to the diet offered to the dams during gestation and lactation: control group (C, diet containing 17% casein) or isocaloric low-protein group (LP, diet containing 8% casein). On 35 or 180 days, we evaluated the rats' body weight, food intake, behavioural satiety sequence and c-Fos protein expression in the NTS in response to food stimulus. Based on these assessments, it was found that perinatal undernutrition promoted an increase in food intake and the number of activated cells in rostral and, mainly, medial NTS in response to food stimulation in adulthood. These results indicated that the NTS is a structure particularly vulnerable to the influences of nutritional manipulation in the early stages of development with effects on food control in adulthood.

© 2014 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nutritional deficiencies during perinatal period, such as under-nutrition, may promote the development of chronic diseases in adulthood (Horton, 2008). Diet consumption is one of the major environmental factors that affects some aspects of health and is involved in the risks of several diseases (Jimenez-Chillaron et al.,

2012). The association between undernutrition and late disease has been well described in the Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis (DOHaD). This theory suggests that environmental stimuli, such as nutrition, act during critical period of development and can produce permanent changes in the cell structures, tissues and functions through long-lasting modifications of the expression of target genes (Gluckman and Hanson, 2004).

Modifications in the regulatory systems of feeding behaviour may be the key points for understanding the actions of neonatal events that generate metabolic diseases in adulthood. The intake of low-protein diets during perinatal period could produce hyperphagia in the later life (Orozco-Solis et al., 2009). There are several changes in the gene expression of hypothalamic orexi-genic and anorexigenic peptides (Bouret and Simerly, 2006). It has been observed in animal models of undernutrition that expression of orexi-genic peptide neuropeptide Y (NPY) is increased in

[?] Corresponding author at: Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Anatomia, Centro de Ciências Biológicas – CCB/UFPE Av. Prof Moraes Rêgo, 1235 Recife, PE 50670-420, Brazil. Tel.: +55 81 21268555; fax: +55 08121268567.

E-mail addresses: ila_lira@yahoo.com.br (L.A. Lira), flarissaalmeida@gmail.com (L.C.A. Almeida), amandabiomedica10@gmail.com (A.A.M. da Silva), taisferro@yahoo.com.br (T.C.F. Cavalcante), diogo.brasileiro.melo@hotmail.com (D.D.C.B. de Melo), julijesus@hotmail.com (J.A. de Souza), renatacampina82@gmail.com (R.C.F. Campina), sanlupesufpe@gmail.com, ilalira@hotmail.com (S.L. de Souza).

contrast to the expression of anorexigenic peptide proopiomelanocortin (POMC) that decreased. Besides, the rhythmicity of feeding behaviour also appears to be modified (Stevens et al., 2011).

The nucleus of the solitary tract (NTS) in the dorsal medulla are important mediators with integrative and interoceptive functions, and are involved in the modulation of some aspects of feeding behaviour, such as initiation, termination, duration as well as meal size (Grill and Kaplan, 2001; Grill, 2006, 2010; Grill and Hayes, 2009). This nucleus has an array of neurons and circuits directly involved in the ingestion, digestion and absorption of food (Zheng et al., 2005).

Besides, NTS integrates peripheral information from the gas-trointestinal tract, pancreas and adipose tissue, and is also responsive to gustatory stimuli and information related to motivation and food reward (Grill, 2006; Appleyard et al., 2007; Grill and Hayes, 2009). Moreover, the NTS maintains direct and reciprocal connexions with other brain structures involved in food intake control and energy balance, such as hypothalamus, nucleus accumbens, amygdala, ventral tegmental area, dorsal raphe nucleus and area postrema (Rinaman, 2010).

Although NTS plays a fundamental role in the control of energy balance, the available information about the long-term consequences of inadequate nutritional intake in the early stages of development on the ability of this nucleus in regulating feeding behaviour is scarce. Rubio et al. (2004), using the model of perinatal food restriction by reducing the food intake during pregnancy and lactating period, found changes in morphology of the NTS neurons, which become hypotrophic compared to the controls. Furthermore, interneurons showed fewer and shorter dendritic prolongations. In a rehabilitated group with restricted food before birth but normal food intake during the lactating period, the neuronal morphology was similar to that of controls. In spite of the fact that this work did not show the direct relationship between undernutrition and its consequences on ability of NTS in regulating food intake, it shows that NTS is a structure vulnerable to perinatal influences. Therefore, this study evaluated the effects of perinatal undernutrition on neuronal activation in response to food stimulation in the NTS.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All the experiments were performed in accordance with the recommendations of the Ethic Committee for use of animals (CEUA, Comissão de ética no uso de animais/Ethics number 23076.024837/2009-11). Virgin female Wistar rats weighing 200–250 g were obtained from facilities of Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco and placed under a 12-h light/dark cycle with food and water ad libitum.

The rats were mated at a ratio of one male to two females. After confirmation of mating by the visualisation of spermatozoa through vaginal smear and body weight, the rats were housed individually and fed with either a control diet (17% of casein) or an isocaloric low-protein (LP) diet (8% of casein) during the entire gestation and lactation periods (Table 1). Birth was recorded as postnatal day zero (P0) for the pups. Sexing was performed at 24 h after birth, and the numbers of pups were adjusted to give 8 pups per mother with an equal ratio (4:4) of males and females. In this paper, female pups were used only to complete the litters maintaining the same male: female ratio. The experimental groups consisted of two male rats from each litter and, at the end, a total of 10 animals of each control and low-protein restrict groups were used. After weaning (21 days), all the male pups from the control and LP groups were fed with standard laboratory chow diet.

The analyses were performed by using 35- and 180-day-old rat. It is known that full maturation of the central nervous system occurs in rodents after 35 days (Rice and Barone, 2000; Semple et al., 2013). Accordingly, the present study aimed to analyse the effect of short- and long-term perinatal undernutrition on neuronal activation of the NTS in response to food intake.

2.2. Measurement of body weight and food intake

The body weight was recorded on days 1, 6, 11, 16, 21, 26 and 31 of life. On days 35 and 180, each animal of the C or LP groups was housed in individual cages, and its body weight and food intake were determined. To measure the food intake, each animal was deprived of food for 4 h. The food intake was measured during 90 min

Table 1

Composition of the experimental diets offered during perinatal period (g/100 g diet).

Macronutrient	Control (17% protein)	Hypoproteic (8% protein)
Protein		
Casein ^a	21.3	10.0
Carbohydrate		
Cornstarch	51.0	63.0
Sucrose	10.0	10.0
Fat		
Vegetable oil	7.0	7.0
Cellulose	5.0	5.0
Vitamin mix	1.0	1.0
Mineral mix	0.3	0.3
Methionine	0.3	0.3
Energy density (Kcal/g)	3.58	3.59
% Macronutrient (Kcal/g)		
Protein	19.7	9.3
Carbohydrate	61.6	72.0
Fat	17.9	17.5

The diets were formulated according to the guidelines of the American Society for Nutritional Sciences (AIN 93).

^a Casein with 80% of bioavailability.

and determined by the difference between the food provided and the amount of food rejected. Body and food weights were recorded to 0.01 g.

2.3. Behavioural sequence satiety

Behavioural sequence satiety (BSS) is considered as a reflex of physiological operational process, which occurs during post-ingestive period. BSS was analysed in accordance with adaptation of Halford's protocol (Halford et al., 1998). The 150-day-old animals of each experimental group were fasted for 4 h. After this period, it was offered a diet, and during a 60 min, feeding and non-feeding behaviours were continuously scored using a video system coupled to a computer in a nearby room by a highly trained experimenter blind to the nutritional status of the animals. Behaviours were categorised as: eating (ingesting food, gnawing, chewing or holding food in paws), drinking, active (exploring movements around the cage, rearing), grooming (body care movements with the mouth or forelimbs), and resting (sit-ting or lying in a resting position, sleeping animal). Other measures scored from the behavioural observation of feeding were: latency to eat (time to begin eating after the presentation of chow), meal duration (time over the entire monitoring period the animal is actually eating food), and feeding rate (amount of food consumed/meal duration). Food was weighed at the beginning and at the end of each session.

2.4. c-Fos immunohistochemistry

On days 35 and 180, the animals were fasted for 4 h and were given standard diet 90 min before transcardiac perfusion to stimulate c-Fos expression in both C (n = 5) and LP (n = 5) groups. After 90 min, the animals were deeply anaesthetised with a combination of ketamine and xylazine (50 mg/kg), followed by transcardiac perfusion, first with saline (0.9% NaCl) and then with 4% paraformaldehyde (PFA). The brains were removed and post-fixed in 4% PFA plus 20% sucrose for 4 h, and then transferred to 0.1 mol/l phosphate buffer plus 20% sucrose for 48 h at 4 °C. Subsequently, coronal sections of 40-μm thickness were cut on a cryostat. Five series of sections were collected for each animal in 25-well acrylic plates containing ethylene glycol and sucrose in phosphate-buffered saline (PBS) and stored at -20 °C. One group of the sections was used for c-Fos immunohistochemistry. The sections were removed from the storage solution and washed thrice with PBS (10 min for each wash). Subsequently, the sections were washed for 5 min with 0.6% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase activity and some nonspecific antibody binding sites, and were washed again for three times with PBS (10 min each) to remove any fixative residue. Then, the sections were incubated in PBS containing 0.3% Triton X-100, 5% normal goat serum and Fos protein antibody (1:10,000 dilution; Calbiochem, CAT#PC38, Bad Soden, Germany) for 48 h. After that, the sections were washed thrice with PBS (10 min each) and incubated in PBS containing 0.3% Triton X-100 and a 1:200 dilution of the biotinylated secondary antibody (Catalogue No. B8895; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 90 min and then incubated with 1% avidin-biotin peroxidase (Vectastain; Camon, Wiesbaden, Germany) for 90 min. The reaction was visualised with 3,3'-diaminobenzidine (D5637; Sigma-Aldrich) diluted in distilled water with nickel ammonium sulfate, 0.2 mol/l sodium acetate ammonium chloride and -d-glucose. Subsequently, the sections were mounted on gelatinised slides, dehydrated in 100% ethanol, cleared using xylene, covered with a cover slip and viewed under a light microscope. Photomicrographs were taken by using a digital camera connected to a microscope and a computer, and identification and quantification of the neurons located in the rostral NTS (bregma - 12.72 to - 12.96) and medial NTS (bregma - 13.96 to - 14.16) were performed by using these

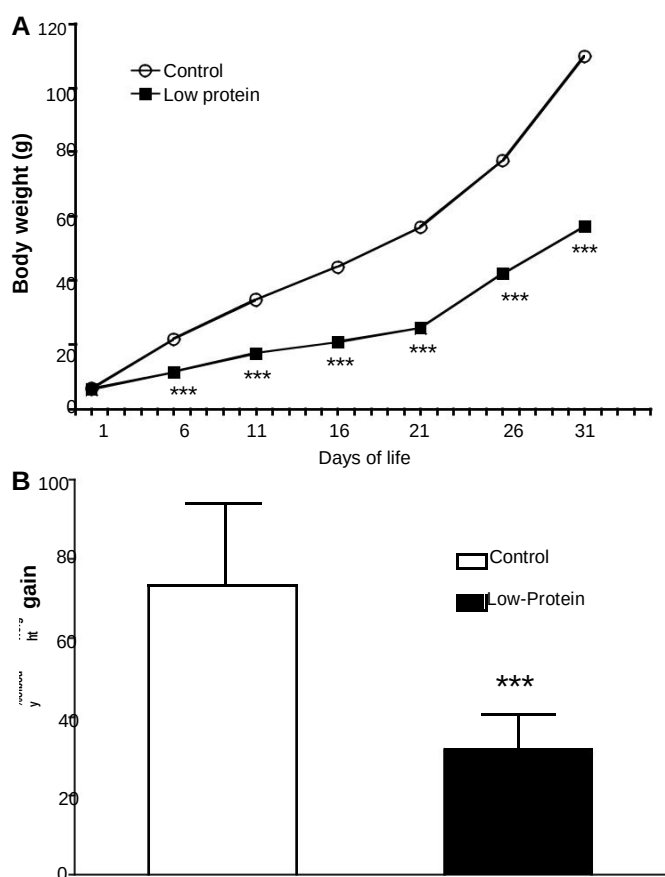


Fig. 1. Body weight of animals subjected to perinatal undernutrition. (A) Body weight from postnatal day 1 to 31 days of age; (B) Body weight gain (%) of animals from day 1 to day 31 of animals subject to control and low protein diet during pregnancy and lactation period. The offspring were subjected to normal protein or hypoproteic diet (17 or 8% casein, respectively) throughout gestation and lactation. The data are expressed as mean $\pm$ SEM, and were analysed by using Student's t-test
*** $p < 0.001$.

photographs with the aid of a Stereotaxic Rat Atlas – Paxinos and Watson (2005). Quantitative analysis of the Fos-immunoreactive neurons was performed by using ImageJ software (version 1.45; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) for each region of interest on both the right and left sides of the brain, with dark-brown or black staining considered as positive.

2.5. Statistical analysis

The experimental results of body weight, food intake and quantitative analysis of Fos-immunoreactive neurons in the rostral and medial NTS are expressed as means $\pm$ standard error (SEM). Student's t-test was used to compare the under-nourished LP group with the C group (animals fed normal protein diet during the perinatal period), and the values were considered significant if $p = 0.05$. All the data were analysed by using GraphPad Prism 5 (version 7; <http://www.graphpad.com>).

3. Results

3.1. Effects of perinatal protein restriction on body weight and food intake

The reduction in the body weight was observed from day 6 ($C = 21.56 \pm 0.17$, $n = 10$; $LP = 11.32 \pm 0.15$, $n = 10$; $p < 0.001$) to day 31 ($C = 109.76 \pm 0.21$, $n = 10$; $LP = 56.76 \pm 0.32$, $n = 10$) (Fig. 1). Furthermore, the LP group showed a reduction in weight gain from day 1 to 31 compared to control. The reduction in the body weight persisted from days 35 ($C = 129.06 \pm 0.20$; $LP = 68.10 \pm 0.35$) and 180 ($C = 435.70 \pm 0.70$; $LP = 370.30 \pm 0.70$) in LP malnourished animals (Table 2). Regarding food consumption, the undernourished

LP group exhibited a higher food intake on days 35 ($C = 6.8 \pm 0.6$; $LP = 11.9 \pm 0.9$) and 180 ($C = 6.6 \pm 0.4$; $LP = 10 \pm 0.8$), when compared with the C group (Table 2).

3.2. Effects of perinatal protein restriction on BSS

The maternal diet promoted a delay on satiety point (Orozco-Solis et al., 2009) (Fig. 2). The BSS (feeding, grooming, exploration and resting) was found to be different between the two groups. The LP animals showed two peaks above 70% during feeding in the first and third periods ($F_{1,216} = 7.636$, $p < 0.001$), whereas the C animals showed distribution over the remaining periods. The proportions of resting ($F_{1,216} = 145.6$, $p < 0.001$) and grooming ($F_{1,216} = 22.06$, $p < 0.001$) were higher in the LP animals, when compared with those in the C animals, although these parameters showed no significant difference. The microstructural parameters of sequence such as meal size and meal duration were significantly different between the two groups, whereas the global eating rate did not differ (Table 3).

3.3. Effects of perinatal undernutrition on c-Fos immunoreactivity in NTS after food stimulation

In rats, the maternal diet influenced neuronal activation in the NTS in response to feeding stimuli at all the ages tested. In 35-day-old LP animals, higher neuronal activation was observed in the rostral NTS ($C = 134.5 \pm 22.23$, $n = 4$; $LP = 366.8 \pm 58.02$, $n = 5$; $p < 0.0117$; bregma -12.72 to -12.96) and medial NTS ($C = 172.8 \pm 26.28$, $n = 4$; $LP = 435.2 \pm 72.69$, $n = 5$; $p < 0.0182$; bregma -13.96 to -14.16). Similarly, in 180-day-old LP animals, both the rostral NTS ($C = 240.6 \pm 38.10$, $n = 5$; $LP = 444.2 \pm 57.05$, $n = 5$; $p < 0.0179$; bregma -12.72 to -12.96) and medial NTS ($C = 224.4 \pm 33.10$, $n = 5$; $LP = 434.0 \pm 45.31$, $n = 5$; $p < 0.0057$; bregma -13.96 to -14.16) showed higher activation (Fig. 3). Photomicrographs showing Fos positive cells in the rNTS and mNTS of 35 and 180 days-old animals subjected to perinatal undernutrition is shown in Fig. 4.

4. Discussion

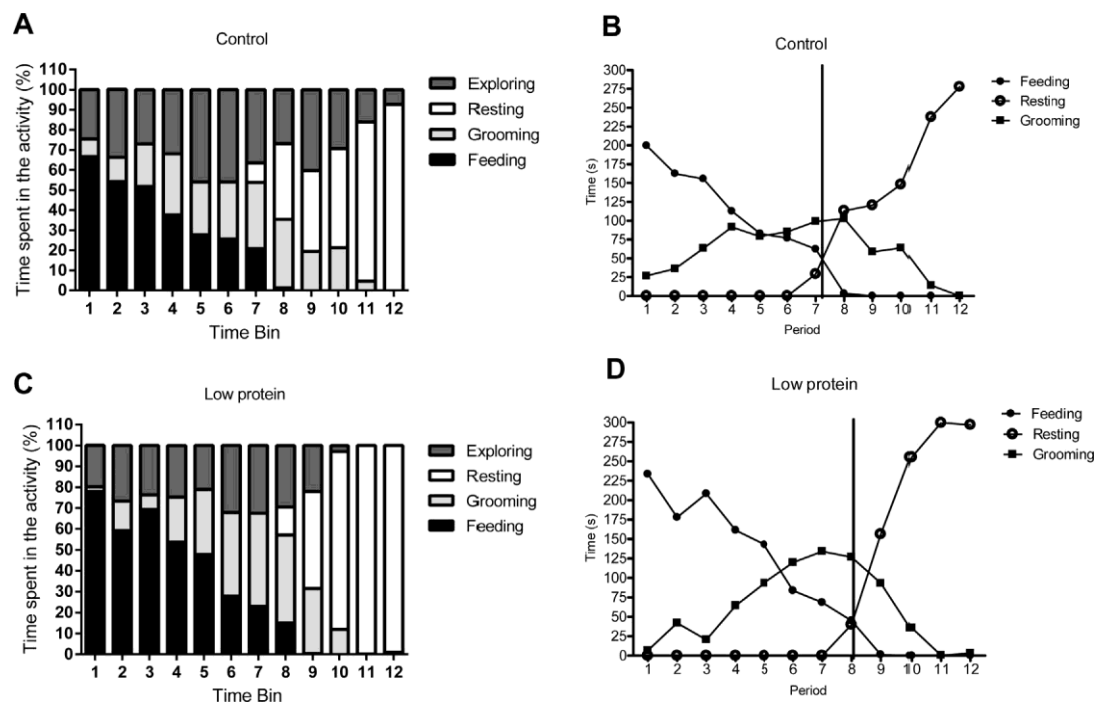
Perinatal undernutrition promoted a higher neuronal activation of NTS in response to meal stimulus. The present study showed that meal duration, meal size and satiety point were affected by perinatal maternal diet. Moreover, BSS patterns (feeding, grooming and resting) were different in animals submitted to perinatal undernutrition. Furthermore, the maternal nutritional manipulation permanently compromised the body weight gain. These results are consistent with previous studies indicating that exposure to low-protein diets during pregnancy and/or lactation leads to considerable reductions in body weight without necessarily affecting birth weight (Remmers et al., 2008; da Silva et al., 2013). It has been reported that during this period adaptive processes may occur leading to a reduction in the number of pups born to ensure preservation of the offspring (Langley-Evans, 2001; Bieswal et al., 2006). Furthermore, the poor nutritional intake during lactation has also been noted to promote changes in the quality and quantity of milk produced by the lactating animals, reflecting in the body weight gain of the pups (Patel and Srinivasan, 2011).

Perinatal undernutrition was found to be capable of changing the brain control of feeding behaviour and promote increased intake in adulthood. Previous studies have been shown that the expression of peptides that control the food intake and energy balance is altered especially in the hypothalamus, the central area of the control of energy homeostasis (McMillen et al., 2005). A higher expression of orexigenic peptides (NPY and Agouti-related peptide (AgRP)) was found, in contrast to the decrease in anorexigenic

Table 2

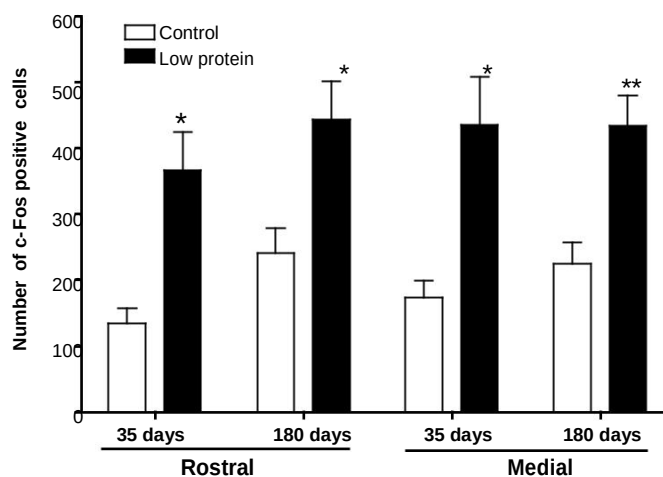
Body weight and food intake of 35 and 180 days old animals subjected to perinatal undernutrition.

Experimental Groups	Body weight (g)		Food intake (kcal/kg of body weight) $\times 10^2$	
	35 days	180 days	35 days	180 days
Control	129.06 $\pm$ 0.20	435.70 $\pm$ 0.70	6.8 $\pm$ 0.6	6.6 $\pm$ 0.4
Low-protein	68.10 $\pm$ 0.35***	370.30 $\pm$ 0.70***	11.9 $\pm$ 0.9***	10 $\pm$ 0.8*

The data are expressed as means $\pm$ SEM, and were analysed by using Student's t-test.* $p < 0.05$.*** $p < 0.001$ **Fig. 2.** BSS in 150-day-old animals subjected to perinatal undernutrition. (A) and (C) Frequency of feeding and no-feeding behaviours in each period (5 min/period). (B) and (D) Graphs depicting the crossing point between feeding behaviour and rest. The perpendicular line indicates satiety point.**Table 3**

Meal microstructure parameters in 180 days old animals subjected to perinatal undernutrition.

	Meal size (kcal/kg of body weight) $\times 10^2$	Meal duration (min)	Feeding rate (kcal/min)
Control group	5.50 $\pm$ 0.43	14.3 $\pm$ 1.84	1.90 $\pm$ 0.22
Low-protein group	7.80 $\pm$ 0.57	20.4 $\pm$ 1.76	1.40 $\pm$ 0.14
Significance	*	*	NS

Data expressed as means $\pm$ SEM (Student's t-test). * $p < 0.05$.**Fig. 3.** c-Fos-positive cells in the rostral and medial NTS in animals subjected to perinatal undernutrition. The values are expressed as mean $\pm$ SEM. Student's t-test was used for comparison between the groups, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

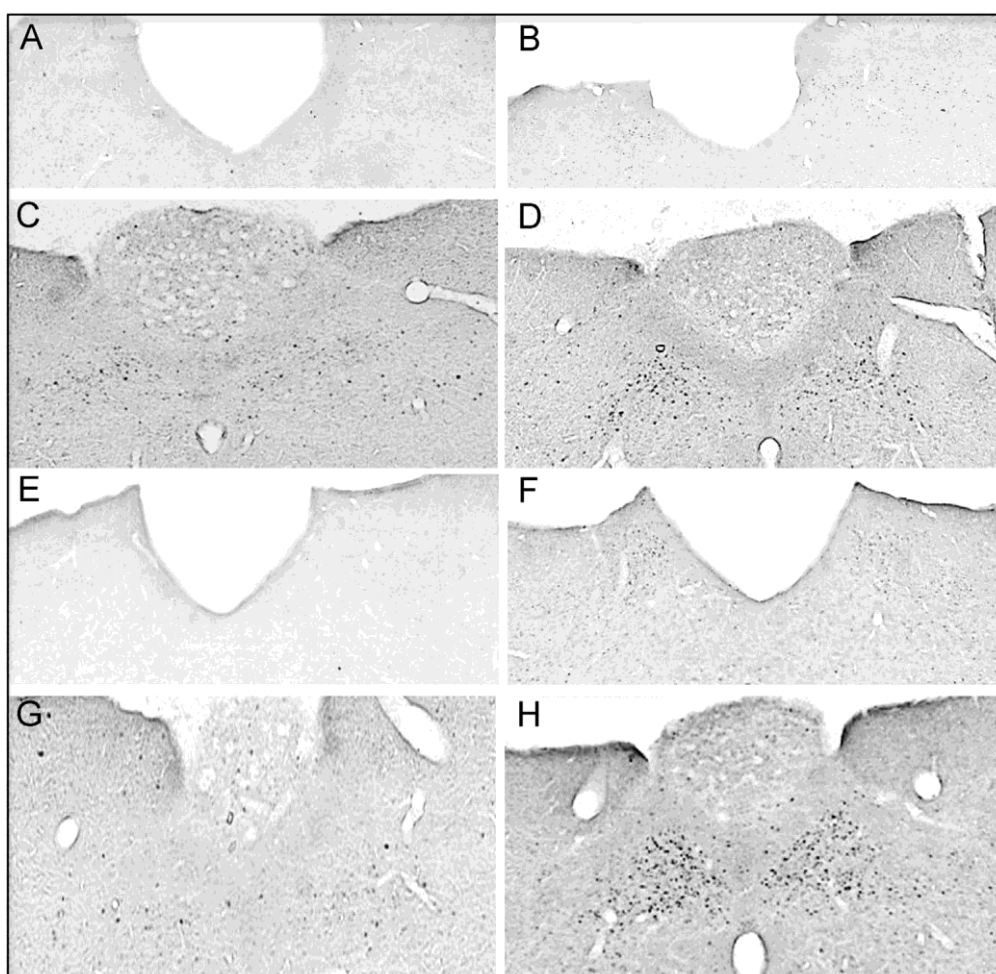


Fig. 4. photomicrographs showing Fos positive cells in the rNTS and mNTS of 35 and 180 days-old animals subjected to perinatal undernutrition. (A) and (B) rNTS of control and LP animals (35 days), respectively; (C) and (D) mNTS of control and LP animals (35 days), respectively; (E) and (F) rNTS of control and LP animals (180 days), respectively; (G) and (H) mNTS of control and LP animals (180 days), respectively.

peptides (POMC and cocaine- and amphetamine-related transcript (CART) (Cripps et al., 2005), with consequent hyperphagia in animal submitted to perinatal undernutrition (Vickers et al., 2000). This hyperphagia may be related to the delay of satiety point in BSS (Orozco-Solis et al., 2009), as observed in the present study. Furthermore, the existence of two peaks of feeding in LP rats suggests that the hyperphagia induced by early nutrient restriction results from an enhance meal size (Orozco-Solis et al., 2009). Moreover, in the current study, the maternal diet was found to be capable of changing the appearance of the feeding behaviours, resting and grooming, the characteristics of the BSS. The BSS describes the process of satiation (meal termination) and satiety development (post-ingestive feeding inhibition) (Halford et al., 1998). The proportion of grooming behaviour, which is usually stimulated after stressful situations, was reported to be accentuated in undernourished animals (Calvez et al., 2011). Some studies have shown that undernutrition increased reactivity to stress (Trzctnska et al., 1999). During the action of stressors, the body stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and paraventricular hypothalamic nucleus to release corticotropin-releasing factor (CRF) or corticotropin-releasing hormone (CRH), which act on the pituitary gland, promoting the release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) (Spencer, 2013). The ACTH, when released, stimulates the grooming behaviour without changing the frequency of the other elements, and its acts on the melanocortinergic receptors MC4R, which increases the appearance of such behaviour (Mul et al., 2013).

Perinatal undernutrition was found to affect meal size and duration. During a meal, multiple signals are generated within the oral cavity and the gastrointestinal tract, which act as important mediators in controlling the meal size (Badman and Flier, 2005; Naslund and Hellstrom, 2007; Chaudhri et al., 2008). These signals – mostly originated from the gustatory stimulation, gastric distension or presence of peptides and peripheral hormones such as cholecystokinin (CCK), glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and leptin – are transmitted to the NTS through vagal afferents and other cranial nerves, such as glossopharyngeal, facial and trigeminal, which activate the neurons in this region (Berthoud, 2006; Grill, 2006; Rinaman, 2010). The neurons in the NTS activated by these stimuli reduce the meal size and thus inhibit food intake promoting satiety (Grill, 2010). However, analysis of decerebrate rats revealed that these neurons do not adjust the meal size in response to reduction in the meal frequency (Grill and Norgren, 1978), revealing that the loss or impairment of the connection between these areas may cause impairment in the meal size.

Perinatal undernutrition was noted to influence neuronal activation in the NTS. Emond et al. (2001), who evaluated different patterns of neuronal activation in the NTS in response to different dietary stimuli, observed that the activation of this nucleus is closely related to meal size (Emond et al., 2001). These authors observed that large meals increased the number of activated cells in the NTS promoting satiety (Emond et al., 2001). Furthermore, the

NTS increased its activation in an attempt to reduce food intake, leading to satiety. Studies have shown that neurons destined for the NST originate from embryogenic day E11 to E14, with peak neurogenesis occurring on E12. Between E17 and E19, rapid changes have been noted to occur in this nucleus, which is more heterogeneous and divided into discernible subnuclei (Lasiter and Kachele, 1988; Zhang and Ashwell, 2001; Dufour et al., 2010). Although some synapses may arise during this phase of rapid differentiation, evidences have shown that intense synaptogenesis, changes in neurotransmitter systems, maturation of neurons and autonomic functions still occur in the NTS after birth and can last for up to 6 weeks (May et al., 2008; Dufour et al., 2010). Thus, this period of great plasticity is a critical stage, when the NTS becomes more susceptible to environmental influences that can alter the patterns of maturation of their neuronal circuits, including those related to feeding behaviour (Dufour et al., 2010).

Perinatal undernutrition was observed to significantly affect the neuronal activation in adulthood, especially the medial NTS. This region receives signals of energy balance, including glucose, ghrelin and particularly leptin, and processes sensory signals from the gastrointestinal tract via the vagus nerve and afferents originating from the hypothalamic nuclei (PVN, LH and ARC) (Grill and Hayes, 2012).

Previous studies have revealed an increase in the activation of Fos immunoreactive neurons in response to leptin in the medial NTS (Huo et al., 2007). The reduced expression of the leptin receptor in this area promoted hyperphagia in animals fed either a standard or palatable diet (Hayes et al., 2010). Moreover, they did not respond to the obese and anorectic effects of CCK (Hayes et al., 2010). Electrophysiological studies have shown depolarisation of medial NTS both by leptin or gastrointestinal tract impulse (Hisadome et al., 2010). These results suggest that leptin signalling in the NTS is necessary to control the body weight and promote inhibition of food intake by amplifying satiety signals arising from the gastrointestinal tract.

Berthoud (2008) revealed that MC4R receptor receives approximately 70% of -melanocyte stimulating hormone (-MSH) impulses arising from the POMC neurons within arcuate nucleus, while 30% of the -MSH impulses is expressed in a small population of neurons in the NTS (Berthoud, 2008), suggesting that NTS, as well as hypothalamus, present population of melanocortin neurons (Ellacott and Cone, 2004) and express MC4R receptors; this system is responsible for stimulating the satiety and meal termination (Kishi et al., 2003). Another possible way of regulation of food intake could be the modulation of NPY within NTS. Previous studies have demonstrated that injection of NPY into the NTS increases food intake (Moran et al., 2006), suggesting that the NTS exerts both negative and positive modulation on the dietary control of the meal.

5. Conclusion

The present study is one of the first to demonstrate the possible changes in the activation of the NTS in response to food intake in animals submitted to perinatal undernutrition. Early under-nutrition promoted delay at the satiety point, increased in food intake and consequent increased in neuronal activation in the NTS as an attempt to compensate the increase in consumption and consequent delay at the satiety point. Furthermore, undernutrition could enhance neuronal activation of the medial NTS promoting increase in meal size. Therefore, we suggest that protein restriction during the early life may alter the pathways of modulation of central control of feeding behaviour mediated by the NTS.

Acknowledgements

This research was supported by Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE/ APQ 782.405/10).

References

- Appleyard, S.M., Marks, D., et al., 2007. Visceral afferents directly activate catecholamine neurons in the solitary tract nucleus. *J. Neurosci.* 27 (48), 13292–13302.
- Badman, M.K., Flier, J.S., 2005. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science* 307 (5717), 1909–1914.
- Berthoud, H.R., 2006. Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring)* 14 (August (Suppl. 5)), 197S–200S.
- Berthoud, H.R., 2008. The vagus nerve, food intake and obesity. *Regul. Pept.* 149 (1–3), 15–25.
- Bieswal, F., Ahn, M.T., et al., 2006. The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. *Obesity (Silver Spring)* 14 (8), 1330–1343.
- Bouret, S.G., Simerly, R.B., 2006. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clin. Genet.* 70 (4), 295–301.
- Calvez, J., Fromentin, G., et al., 2011. Inhibition of food intake induced by acute stress in rats is due to satiety effects. *Physiol. Behav.* 104 (5), 675–683.
- Chaudhri, O.B., Salem, V., et al., 2008. Gastrointestinal satiety signals. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 239–255.
- Cripps, R.L., Martin-Gronert, M.S., et al., 2005. Fetal and perinatal programming of appetite. *Clin. Sci. (Lond.)* 109 (1), 1–11.
- da Silva, A.A., Borba, T.K., et al., 2013. Perinatal undernutrition stimulates seeking food reward. *Int. J. Dev. Neurosci.* 31 (5), 334–341.
- Dufour, A., Tell, F., et al., 2010. Perinatal development of inhibitory synapses in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Eur. J. Neurosci.* 32 (4), 538–549.
- Ellacott, K.L., Cone, R.D., 2004. The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent Prog. Horm. Res.* 59, 395–408.
- Emond, M., Schwartz, G.J., et al., 2001. Meal-related stimuli differentially induce c-Fos activation in the nucleus of the solitary tract. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280 (5), R1315–R1321.
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., 2004. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 305 (5691), 1733–1736.
- Grill, H.J., 2006. Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl. 5, 216S–221S.
- Grill, H.J., 2010. Leptin and the systems neuroscience of meal size control. *Front. Neuroendocrinol.* 31 (1), 61–78.
- Grill, H.J., Hayes, M.R., 2009. The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. *Int. J. Obes. (Lond.)* 33 Suppl. 1, S11–S15.
- Grill, H.J., Hayes, M.R., 2012. Hindbrain neurons as an essential hub in the neuroanatomically distributed control of energy balance. *Cell Metab.* 16 (3), 296–309.
- Grill, H.J., Kaplan, J.M., 2001. Interoceptive and integrative contributions of forebrain and brainstem to energy balance control. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25 Suppl. 5, S73–S77.
- Grill, H.J., Norgren, R., 1978. Chronically decerebrate rats demonstrate satiety but not bait shyness. *Science* 201 (4352), 267–269.
- Halford, J.C., Wanninayake, S.C., et al., 1998. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 61 (2), 159–168.
- Hayes, M.R., Skibicka, K.P., et al., 2010. Endogenous leptin signaling in the caudal nucleus tractus solitarius and area postrema is required for energy balance regulation. *Cell Metab.* 11 (1), 77–83.
- Hisadome, K., Reimann, F., et al., 2010. Leptin directly depolarizes preproglucagon neurons in the nucleus tractus solitarius: electrical properties of glucagon-like Peptide 1 neurons. *Diabetes* 59 (8), 1890–1898.
- Horton, R., 2008. Maternal and child undernutrition: an urgent opportunity. *Lancet* 371 (9608), 179.
- Huo, L., Maeng, L., et al., 2007. Leptin and the control of food intake: neurons in the nucleus of the solitary tract are activated by both gastric distension and leptin. *Endocrinology* 148 (5), 2189–2197.
- Jimenez-Chillaron, J.C., Diaz, R., et al., 2012. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie* 94 (11), 2242–2263.
- Kishi, T., Aschkenasi, C.J., et al., 2003. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 457 (3), 213–235.
- Langley-Evans, S.C., 2001. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc. Nutr. Soc.* 60 (4), 505–513.
- Lasiter, P.S., Kachele, D.L., 1988. Postnatal development of the parabrachial gustatory zone in rat: dendritic morphology and mitochondrial enzyme activity. *Brain Res. Bull.* 21 (1), 79–94.

- Millen, I.C., Adam, C.L., et al., 2005. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *J. Physiol.* 565 (Pt 1), 9–17.
- Nathan, T.H., Aja, S., et al., 2006. Leptin modulation of peripheral controls of meal size. *Physiol. Behav.* 89 (4), 511–516.
- Olthoff, J.D., Spruijt, B.M., et al., 2013. Melanocortin MC4 receptor-mediated feeding and grooming in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 719 (1–3), 192–201.
- Quirion, E., Hellstrom, P.M., 2007. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol. Behav.* 92 (1–2), 256–262.
- Reco-Solis, R., Lopes de Souza, S., et al., 2009. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol. Behav.* 96 (3), 481–492.
- Reichman, M.S., Srinivasan, M., 2011. Metabolic programming in the immediate postnatal life. *Ann. Nutr. Metab.* 58 Suppl. 2, 18–28.
- Rodriguez, G., Watson, C., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney.
- Schneiders, F., Fodor, M., et al., 2008. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake. *Physiol. Behav.* 95 (1–2), 208–215.
- Shen, B., Barone Jr., S., 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Perspect* 108 (Suppl. 3), 511–533.
- Shen, L., 2010. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Res.* 1350, 18–34.
- Rubio, L., Torrero, C., et al., 2004. Alterations in the solitary tract nucleus of the rat following perinatal food restriction and subsequent nutritional rehabilitation. *Nutr. Neurosci.* 7 (5/6), 291–300.
- Seiple, B.D., Blomgren, K., et al., 2013. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.* 106–107, 1–16.
- Spencer, S.J., 2013. Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress. *Front. Neurosci.* 7, 109.
- Stevens, A., Begum, G., et al., 2011. Epigenetic changes in the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene: a mechanism linking maternal undernutrition to obesity in the offspring? *Eur. J. Pharmacol.* 660 (1), 194–201.
- Trzcińska, M., Tonkiss, J., et al., 1999. Influence of prenatal protein malnutrition on behavioral reactivity to stress in adult rats. *Stress* 3 (1), 71–83.
- Vickers, M.H., Breier, B.H., et al., 2000. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279 (1), E83–E87.
- Zhang, L.L., Ashwell, K.W., 2001. Development of the cyto- and chemoarchitectural organization of the rat nucleus of the solitary tract. *Anat. Embryol. (Berl.)* 203 (4), 265–282.
- Zheng, H., Patterson, L.M., et al., 2005. Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289 (1), R247–R258.