



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

RAFAEL DANYLLO DA SILVA MIGUEL

**EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL SOBRE
A DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES 5-HT_{1B} EM ÁREAS
DE CONTROLE DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE
RATOS**

RECIFE, 2016

RAFAEL DANYLLO DA SILVA MIGUEL



**EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL SOBRE
A DISTRIBUIÇÃO DOS RECEPTORES 5-HT_{1B} EM ÁREAS
DE CONTROLE DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR DE
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para fim de obtenção de título de Mestre.

Área de concentração: Neurociências

Orientadora: Prof^ª Dr^ª: Sandra Lopes de Souza
Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Lisiane dos Santos Oliveira

Recife, 2016

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

M636a Miguel, Rafael Danyllo da Silva.
Efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre a distribuição dos receptores 5-HT1B em áreas de controle do comportamento alimentar de ratos / Rafael Danyllo da Silva Miguel. – 2016.
57 f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Sandra Lopes de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, 2016.
Inclui Referências e apêndices.

1. Serotonina. 2. Hipotálamo. 3. Comportamento Alimentar. I. Souza, Sandra Lopes de. (Orientadora). II. Título.

612.665 CDD (22.ed.) UFPE (CCS2016-206)

RAFAEL DANYLLO DA SILVA MIGUEL

**EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL SOBRE A IMUNORREATIVIDADE
DOS RECEPTORES 5-HT1B EM ÁREAS DE CONTROLE DO COMPORTAMENTO
ALIMENTAR DE RATOS**

Dissertação aprovada em 04 de Março de 2016.

Profª DRª Lisiane dos Santos Oliveira. Universidade Federal de Pernambuco - Centro
Acadêmico de Vitória. Núcleo de Enfermagem.

Profª DRª Rosana Christine Cavalcante Ximenes. Universidade Federal de Pernambuco -
Centro Acadêmico de Vitória. Núcleo de Enfermagem.

Profª DRª Manuela Figueiroa Lyra de Freitas. Universidade Federal de Pernambuco - Centro
de Ciências Biológicas. Departamento de Anatomia.

RECIFE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profª. Drª. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernane Rodrigues de Carvalho Neto

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO COORDENADOR**

Profª. Drª Sandra Lopes de Souza

A Deus, a minha família e amigos, e a todos pesquisadores que me antecederam e que através de muitos esforços e sacrifícios conseguiram consolidar na literatura bases sólidas que firmaram este trabalho.

Agradecimentos

Muitos são os nomes que devo agradecer pela elaboração deste trabalho. Alguns destes nomes auxiliaram ativamente na execução de algumas etapas. Outros nomes participaram indiretamente me ajudando a relaxar e promovendo momentos de conforto que são necessários para melhor reflexão e maior aproveitamento no decorrer da pesquisa.

Como pessoa espiritualista que me considero, cabe a mim agradecer inicialmente a Deus, por ter me proporcionado saúde, criatividade e ter provido todos os meios para que eu desenvolvesse esta pesquisa com sucesso. Essa providência iniciou-se a muitos anos já em meu âmbito familiar, onde agradeço ao carinho, amor, dedicação e esforços do meu pai Josivaldo José da Silva Miguel (*in memoriam*), minha mãe Maria das Graças da Silva Miguel, minha irmã Rafaela Tamires, minha Avó Severina Maria, Minha tia Rosa Maria e meu tio José Nunes (*in memoriam*). Essas pessoas foram essenciais para minha educação e para minha vida, não medindo esforços para que eu me desenvolvesse em todos os aspectos humanos e ensinando com paciência e principalmente com exemplos. São de pessoas assim que o mundo precisa para se tornar um lugar melhor, por isso os agradeço.

Agradeço ainda a outros membros de minha família, uns que pertencem a minha família sanguínea e outro a minha família de melhores amigos. Dentre os quais destaco José Emerson Xavier, que vem caminhando comigo na minha vida acadêmica e pessoal a mais de cinco anos. A Edmar Bermudes pelos longos 13 anos de amizade e sua esposa Elaine Karine, cujo filho Erick Miguel tenho prazer de apadrinhar. Agradeço José Pacífico e Jéssica da Silva, membros da família que me acompanha desde a infância. A Paloma da Silva e Erivaldo Alves, que juntamente com Emerson Xavier me proporcionaram vários momentos de descontração, mostrando que os amigos se fazem presentes na alegria e na tristeza.

Merece destaque ainda aqueles que sem o apoio intelectual jamais poderia ter chegado onde cheguei. Dentre estas pessoas agradeço a Prf^a Lisiane dos Santos que me orienta desde meu ingresso no UFPE. Ela juntamente com Prf^a Rosana Ximenes mostraram que as relações docente-aluno vão bem mais além das fronteiras da universidade. Esses dois exemplos de professoras me ensinaram que um pesquisador é antes de tudo um ser humano com virtudes e defeitos que merecem ser respeitadas e se mostraram verdadeira amigas. Agradeço ainda a todos que fazem parte do laboratório de anatomia do CAV, Prf^a Carolina Peixoto, Ana Elisa Toscano, André Pukey, Rosane Galvão, Ewerton Felipe, Taciana Rocha e Manuela Figueiroa – que trabalha atualmente no campus Recife. A esses excelentes profissionais agradeço pelo apoio prestado e por mostrar que a docência é um excelente caminho a ser trilhado. Além de todos que já mencionei, agradeço ainda a minha orientadora Sandra Lopes de Souza que com toda paciência me ensinou

Resumo

Diversos estudos evidenciaram os efeitos da desnutrição perinatal sobre alterações morfofisiológicas no organismo adulto. No presente estudo, foi verificado os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre a expressão de receptores 5-HT_{1B} nos núcleos paraventricular (PVN) e arqueado do hipotálamo, e no Caudado-Putamem (CPu) e Amígdala Basolateral (ABL). Além disso, foi analisado ainda os efeitos que essa desnutrição promoveu sobre a ativação neural no CPu, ABL e na Amígdala Central (AC). Foram utilizados dois principais grupos de ratos da linhagem Wistar: um grupo submetido a desnutrição proteica (8% caseína) durante o período da gestação e lactação; e o outro com dieta padrão (17% caseína). No 35º dia de vida os animais foram subdivididos em quatro grupos: Desnutrido que recebeu solução salina (D), Desnutrido que recebeu d-fenfluramina (DF), Controle que recebeu solução salina (C) e Controle que recebeu d-fenfluramina (CF), nas proporções de 3mg/kg p.c para fenfluramina e 1ml/kg para solução salina. Observou-se maior número de células imunorreativas ($p < 0,01$) ao 5-HT_{1B} na ABL no grupo desnutrido ($33,8 \pm 10,05$, $n=4$) comparado ao controle ($5,3 \pm 1,53$, $n=3$), enquanto que no CPu não houve modificação. No hipotálamo, foi verificado aumento de células 5-HT_{1B} no grupo desnutrido comparado ao controle nos núcleos ARC (C= $14,3 \pm 6,66$, $n=3$ versus D= $26,8 \pm 4,19$, $n=4$, $p < 0,01$) e PVN (C= $30 \pm 8,19$, $n=3$ versus D= $58,3 \pm 16,66$, $n=4$, $p < 0,05$). Após a administração de fenfluramina, houve aumento no número de neurônios imunorreativos a proteína FOS no grupo desnutrido fenfluramina comparado ao desnutrido salina no CPu (D= $26,5 \pm 21,56$, $n=4$ versus DF= $106,5 \pm 40,45$, $n=4$, $p < 0,05$) e AC (D= $13,6 \pm 8,17$, $n=5$ versus DF= $64 \pm 31,48$, $n=3$, $p < 0,05$). No grupo controle, a fenfluramina não alterou o número de células ativadas no CPu (C= $16,5 \pm 7,78$, $n=2$ versus CF= $63 \pm 39,28$, $n=3$, $p > 0,05$) e AC (C= $6,3 \pm 4,93$, $n=3$ versus CF= $44 \pm 26,33$, $n=5$, $p > 0,05$). Não houve alteração no número de células imunorreativas a proteína FOS na ABL no grupo controle (C= $5 \pm 3,37$, $n=4$ versus CF= $21,3 \pm 11,35$, $n=4$, $p > 0,05$) ou desnutrido (D= $20 \pm 13,64$, $n=4$ versus DF= $14,4 \pm 3,13$, $n=5$, $p > 0,05$) quando comparados aos seus respectivos grupos salina. Este estudo evidenciou que a desnutrição proteica no período perinatal acarreta aumento na expressão de células imunorreativas contra o receptores 5-HT_{1B} nos núcleos ARC, PVN e ABL tal como aumenta a ativação de neurônios no CPu e na AC em resposta a fenfluramina.

Palavras-chave: Serotonina. Hipotálamo. Comportamento alimentar. 5-HT_{1B}.

Abstract

Several studies have shown the effects of perinatal malnutrition on morphological and physiological changes in the adult organism. In the present study was investigated the effects of perinatal protein malnutrition on the expression of 5-HT_{1B} receptors in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus, arcuate, caudate-putamen (CPu) and basolateral amygdala (GLA). In addition, it was analyzed the effects that malnutrition promoted on the neural activation of the CPu, Central GLA and the amygdala (AC). Two main groups of rats Wistar were used: A group subjected to protein malnutrition (8% casein) during the period of pregnancy and lactation and the other with standard diet (17% casein). On the 35th day of life the animals were divided into four groups: Malnourished received saline (D) Malnourished that received d-fenfluramine (DF), control which received saline (C) and control that received d-fenfluramine (CF) in the proportions of 3 mg/kg of BW fenfluramine and 1 ml/kg for saline. There were a higher number of immunoreactive cells ($p < 0.01$) to the 5-HT_{1B} in the ABL in the undernourished group (33.8 ± 10.05 , $n = 4$) compared to the control (5.3 ± 1.53 , $n = 3$), whereas in the CPu no change was observed. In the hypothalamus, it was observed increase of 5-HT_{1B} cells in the undernourished group compared to the control in ARC cores ($C = 14.3 \pm 6.66$, $n = 3$ and $D = 26.8 \pm 4.19$, $n = 4$, $p < 0.01$) and the PVN ($C = 30 \pm 8.19$, $n = 3$ and $D = 58.3 \pm 16.66$, $n = 4$, $p < 0.05$). After administration of fenfluramine, there was an increase in the number of immunoreactive neurons FOS protein in malnourished group fenfluramine compared to saline undernourished in CPu ($D = 26.5 \pm 21.56$, $n = 4$ and $DF = 106.5 \pm 40.45$, $n = 4$, $p < 0.05$) and AC ($D = 13.6 \pm 8.17$, $n = 5$ and $31.48 \pm DF = 64$, $n = 3$, $p < 0.05$). In the control group, fenfluramine did not change the number of activated cells in CPu ($C = 16.5 \pm 7.78$, $n = 2$ and $CF = 63 \pm 39.28$, $n = 3$, $p > 0.05$) and AC ($C = 6.3 \pm 4.93$, $n = 3$ and $CF = 44 \pm 26.33$, $n = 5$, $p > 0.05$). There was no change in the number of immunoreactive cells FOS protein in the ABL in the control group ($C = 5 \pm 3.37$, $n = 4$ and $CF = 21.3 \pm 11.35$, $n = 4$, $p > 0.05$) or malnourished ($D = 20 \pm 13.64$, $n = 4$ versus $DF = 14.4 \pm 3.13$, $n = 5$, $p > 0.05$) when compared to their saline groups. This study showed that the protein malnutrition in the perinatal period causes an increase in the expression of immunoreactive cells against the 5-HT_{1B} receptors in the ARC cores, PVN and ABL as well as increases the activation of neurons in the CPu and AC in response to fenfluramine.

Key-words: Serotonin. Hypothalamic. Feeding behavior. 5-HT_{1B}

Lista de Figuras

Figura 1: Projeções de fibras serotoninérgicas	18
Figura 2: Biossíntese da serotonina.	19
Figura 3: Esquema proposto para ação de drogas serotoninérgicas envolvidas no recrutamento de vias centrais de melanocortina. (Heisler et al., 2003)	20
Figura 4: Diagrama esquemático proposto para os sítios de atuação da serotonina nos circuitos que envolvem a melanocortina. (Heisler et al., 2006)	21
Figura 5: Diagrama dos experimentos farmacológicos realizados por Arosen e colaboradores (2014)	22
Figura 6: Ilustração dos bregmas analisados.	31
Figura 7: Efeito da desnutrição proteica perinatal sobre o peso corporal	32
Figura 8: Efeito da desnutrição perinatal sobre neurônios imunorreativos ao receptor 5HT-1B em áreas de regulação do comportamento alimentar hedônico.	33
Figura 9: Neurônios imunorreativos ao receptor 5HT1-B em áreas hipotalâmicas. .	34
Figura 10: Análise quantitativa de neurônios c-Fos positivo em áreas de regulação hedônica do comportamento alimentar com e sem a administração de fenfluramina.	35

Lista de Abreviaturas

ABREVIACES

AC	Amígdala Central
ABL	Amígdala Basolateral
AgRP	Peptídeo Relacionado ao Gene Agouti
ARC	Arqueado
CCK	Colecistoquinina
GPV	Globo Pálido Ventral
HL	Hipotálamo Lateral
NAC	Núcleo Acumbens
NC	Núcleo Caudado
NPB	Núcleo Parabraquial
NTS	Núcleo do Trato Solitário
NPY	Neuropeptídeo Y
POMC	Pró-opiomelanocortina
PVN	Paraventricular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2.1 Regulação Central do Comportamento Alimentar	14
2.1.1 O hipotálamo e o comportamento alimentar homeostático	14
2.1.2 Áreas Hedônicas de controle do Comportamento Alimentar	16
2.2 Sistema Serotoninérgico e o comportamento alimentar	17
2.3 Desnutrição perinatal e comportamento alimentar	22
3 HIPÓTESE	25
4 OBJETIVOS	26
4.1 Geral	26
4.2 Específicos	26
5 MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1 Animais e Grupos experimentais	27
5.2 Peso corporal e consumo alimentar	27
5.3 Análise farmacológica	28
5.4 Eutanásia e processamento do encéfalo	28
5.5 Imunohistoquímica para os receptores 5-HT1B	29
5.6 Imunohistoquímica c-FOS	30
5.7 Análise quantitativa dos neurônios imunorreativos	31
6 Resultados	31
6.1 Efeitos da desnutrição perinatal sobre o peso corporal e consumo alimentar	31
6.2 Consumo alimentar em resposta a fenfluramina	32
6.3 Células Imunorreativas ao receptor 5-HT1B	32
6.4 Ativação neural em resposta a fenfluramina	34
7 DISCUSSÃO	36
8 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE 1 - Effect of Perinatal Protein Malnutrition Under Serotonergic Control on Feeding Behavior: A Systematic Review.	50

1 INTRODUÇÃO

O comportamento alimentar tem controle muito complexo envolvendo mecanismos encefálicos homeostáticos e hedônicos (TRAVERS E TRAVERS, 1987; KILLGORE et al., 2003; HINTON et al., 2004; GRILL et al., 2006; VARELA E HORVATH 2012). A regulação deste comportamento é realizada através das interações existentes entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e órgãos periféricos tais como o trato gastrointestinal, o pâncreas e o tecido adiposo (DILEONE et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2010). Estes últimos, liberam diversas moléculas sinalizadoras de fome ou saciedade que encontram receptores em estruturas encefálicas como o núcleo do trato solitário e hipotálamo.

Os mecanismos de controle central do comportamento alimentar se estabelecem ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso, sendo assim, vulneráveis a estímulos ambientais adversos. Portanto, podem ser modificados por fatores como desnutrição, estresse, desmame precoce e exposição a fármacos (OROZCO-SOLIS et al., 2009; LIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011; MARCELINO DA SILVA et al., 2013; MARTIMIANO et al., 2015). Essas modificações surgem para melhor adaptar os organismos ao meio que possivelmente irão sobreviver (GLUCKMAN E HANSON, 2004). Sabe-se, no caso da desnutrição perinatal, que se o ambiente for modificado em sua vida adulta, este organismo terá mais chances de desenvolver doenças relacionadas com a síndrome metabólica (GLUCKMAN E HANSON, 2004), tais como hipertensão (STANNER et al., 1997) e diabetes tipo 2 (DE ROOIJ et al., 2006).

Organismos que foram submetidos a desnutrição na vida uterina tornam susceptíveis a desenvolverem obesidade na vida adulta (BARRETO MEDEIROS et al., 2002). Esses indivíduos apresentam atraso no ponto de saciedade e apresentam maior preferência por dietas palatáveis e ricas em gordura (LOPES DE SOUZA et al., 2008; MARCELINO DA SILVA et al., 2013). Essas adaptações comportamentais estão diretamente relacionadas com sistemas de neurotransmissores que regulam o comportamento alimentar, dentre os quais destacamos o serotoninérgico (LOPES DE SOUZA et al., 2008).

A serotonina é um neurotransmissor amplamente difundido no SNC, onde promove a hipofagia ao ser liberada (DRYDEN et al., 1996; LUCAS et al., 1998). Os

componentes do sistema serotoninérgico são facilmente alterados em resposta a agressões impostas no período perinatal, dentre as quais podemos destacar a desnutrição proteica. Ratos desnutridos apresentam hiperfagia e não reduzem o consumo em resposta a fenfluramina (aumenta a disponibilidade de serotonina na fenda sináptica) e ao agonista 5-HT_{1B} como animais controle (LOPES DE SOUZA et al., 2009). Em ratos desnutridos houve aumento na quantidade de neurônios marcados contra os receptores 5HT-1A no hipotálamo (MANUEL-APOLINA et al., 2014). Foi também observado que a desnutrição não altera a expressão gênica do receptor 5-HT_{1B} no hipotálamo (LOPES DE SOUZA et al., 2008). Entretanto, não há estudos morfológicos que analisaram a distribuição dos receptores 5HT-1B em diferentes áreas encefálicas responsáveis pela regulação do comportamento alimentar em animais submetidos a desnutrição perinatal, sendo este o principal objetivo deste estudo.

2. Revisão de Literatura

2.1 Regulação Central do Comportamento Alimentar

O comportamento alimentar pode ser definido como uma série de episódios responsáveis pela aquisição e utilização de fontes alimentares energéticas. Devido a sua importância para a homeostasia, esse comportamento é regulado por diversas moléculas, centrais e periféricas, que regem os mecanismos de fome e saciedade (NAGASE e NAKAJIMA, 2002). Existem dois principais mecanismos de regulação do comportamento alimentar: um homeostático e o outro hedônico (GRILL et al., 2006; VARELA E HORVATH 2012). O controle homeostático envolve eventos relacionados com a busca e ingestão de nutrientes necessários para homeostasia. Por outro lado, os mecanismos hedônicos não estão diretamente relacionados ao balanço energético e sim com o poder de recompensa promovido pelo alimento (KELLEY et al., 2002).

2.1.1 O hipotálamo e o comportamento alimentar homeostático

Nos mamíferos, o hipotálamo é uma das mais importantes áreas de regulação do comportamento alimentar homeostático (BERTHOUD, 2002; LEIBOWITZ e WORTLEY, 2004). No hipotálamo chegam informações oriundas de todo o corpo, tornando-o um centro de regulação da glicemia, controle hídrico e ingestão de alimentos (VARELA e HORVATH 2012; SHON et al, 2002). O hipotálamo apresenta mais de quarenta núcleos histologicamente distintos (MEISTER, 2007). Dentre eles, os mais conhecidos na regulação do comportamento alimentar são os núcleos arqueado (ARC), paraventricular (PVN), ventromedial (VM), dorsomedial e o hipotálamo lateral (HL) (ANAND e BROBECK, 1951; BROBECK et al., 1956; LEIBOWITZ e WORTLEY, 2004; MEISTER, 2007). Nas últimas décadas, o papel do núcleo arqueado tem sido amplamente discutido e muitas vias de sinalização para controle da fome e saciedade foram descritas a partir dele. Sua interação com o PVN exerce determinante papel no processo de saciedade.

No ARC a barreira hemato-encefálica encontra-se fragilizada, o que permite maior interação com hormônios e outras moléculas que chegam nessa região (MULLIER et al., 2010). Esse núcleo recebe informações via corrente sanguínea e de vias neurais particularmente provenientes do núcleo do trato solitário (WOODS e D'ALESSIO,

2008). No ARC, encontramos duas populações distintas de neurônios envolvidos no controle do comportamento alimentar. Uma população co-expressa os peptídeos Transcrito relacionado a cocaína e anfetamina (CART) e pro-opiomelanocortina (POMC) e a outra co-expressa o Neuropeptídio Y (NPY) e Peptídeo Relacionado ao gene Agouti (AgRP) (MORTON et al., 2004; WYNNE et al., 2005). A primeira, estimula a saciedade, enquanto a segunda, a fome (SCHWARTZ et al., 2000; LUCAS et al., 1998).

Estes neurônios apresentam receptores para diversos sinalizadores centrais e periféricos (POCAI, 2014; HEISLER et al., 2006; WILLESEN et al., 2001; BLEVINS et al., 2000). Por exemplo, os neurônios NPY/AgRP apresentam receptores para a ghrelina, hormônio produzido principalmente no estômago, que ao serem ativados aumentam o consumo e reduzem o gasto energético (WILLESEN et al., 1999; TSCHO et al., 2000; WREN et al., 2001). Por outro lado, injeções hipotalâmicas de colecistocinina (CCK, produzida principalmente no intestino) ativam receptores CCK1 no ARC, promovendo a saciedade (BLEVINS et al., 2000). Podemos citar outros hormônios que atuam sobre o ARC, como a leptina (produzida no tecido adiposo), o polipeptídeo pancreático, a oxintomodulina e o glucagon provenientes do intestino delgado (POCAI, 2014; BATTERHAM et al., 2003; TURTON et al., 1996). Entre os neurotransmissores, foi descrito a interação da serotonina no ARC com os grupamentos neuronais CART/POMC e NPY/AgRP, através dos seus receptores 5-HT1B e 5-HT2C (Heisler et al., 2006). Ao ser estimulado pelo neurotransmissor serotonina, o ARC aumenta a liberação de CART e POMC (LI et al., 2002) promovendo a saciedade (SCHWARTZ et al., 2000). Ao mesmo tempo há ainda a redução da liberação de NPY, potencializando o efeito hipofágico (DRYDEN et al., 1996; LUCAS et al., 1998).

Importantes projeções do ARC são direcionadas aos neurônios de segunda ordem localizados no PVN. Este núcleo possui dois principais grupos de neurônios: os magnocelulares, situados na região lateral, e os parvocelulares, situados na região medial (PAXINOS e WATSON, 1982; TOTH et al., 1999). Os neurônios situados na subdivisão magnocelular secretam ocitocina e vasopressina na hipófise posterior. Por outro lado, a divisão parvicelular produz o CART, o POMC, o hormônio liberador de tireotropina (TRH), Somatostatina e Galanina, projetando-se para diversas regiões

encefálicas e espinais (TOTH et al., 1999; VRANG et al., 1999; THOMPSON e SWANSON, 2003; FERGUSON et al., 2008).

Além do controle homeostático promovido sobretudo pelo hipotálamo, há regiões que exercem o controle hedônico do comportamento alimentar. Estes centros hedônicos envolvem diferentes regiões encefálicas, como será abordado em seguida.

2.1.2 Áreas Hedônicas de controle do Comportamento Alimentar

O comportamento alimentar hedônico é regulado por diversas áreas encefálicas tais como, o Núcleo do Trato Solitário (NTS), o Núcleo Acumbens (NAC), a Amígdala e o Estriado (GRILL e HAYES, 2009; MARCELINO DA SILVA et al., 2013). O NTS está localizado no tronco encefálico estando diretamente relacionado com o início, término, duração e tamanho da refeição (GRILL, 2006, 2010; GRILL e HAYES, 2009). Nesse núcleo chegam aferências originadas nas papilas gustativas e no tracto gastrointestinal, com informações sobre os gostos básicos, a densidade dos diferentes nutrientes, bem como informações de distensão gástrica (TRAVERS e TRAVERS, 1987). Essas informações advêm tanto de moléculas circulantes no sangue quanto por impulsos trazidos pelo nervo vago (GRILL e KAPLAN, 2002). Além disso, as relações existentes entre o NTS, o hipotálamo lateral e o Núcleo Parabraquial (NPB) são de grande importância para a regulação de neurônios orexígenos. (Iwai et al., 2015)

O NPB nos ratos está localizado dorsolateralmente a ponte, circundando o pedúnculo cerebelar superior e são compostos por diversos subnúcleos menores (LUNDY e NORGREN, 2004; SAPER e STORNETTA, 2014). Os impulsos nervosos oriundos destes núcleos, trazendo informações gustatórias e mecanossensoriais, seguem topograficamente através dos núcleos talâmicos até a porção ventral do núcleo caudado (NC) (Iwai et al., 2015). Em ratos, o núcleo estriado dorso-lateral- o equivalente ao putamem em humanos (HILARIO e COSTA, 2008; SOUZA e ALMEIDA 2012) - está envolvido com a formação de hábitos, estando em atividade quando um comportamento é automático (WUNDERLICH et al, 2012; YIN et al., 2004). Por outro lado, o estriado dorso-medial está em atividade no início do aprendizado, reduzindo esta atividade quando o comportamento se torna automático (ASHBY et al., 2010). A administração central de Peptídeo YY (PYY) em ratos, mostrou que os efeitos orexígenos do PYY dependem da sinalização dopaminérgica no núcleo caudado (NC)

(HNASKO et al., 2004), incluindo o estriado como uma das regiões moduladoras do comportamento alimentar hedônico.

Na região mais rostral do estriado, encontramos o NAC. Esse núcleo também participa do comportamento alimentar hedônico (MICHAELIDES et al., 2013). Recentemente descobriu-se que o NAC possui receptores opióides que ao serem estimulados aumentam a vontade de comer (CASTRO e BERRIDGE, 2014), relacionando este núcleo com o “vício” promovido por certos alimentos. O NAC possui recíprocas relações com o a porção ventral do Globo Pálido (GPV), e a inativação destes núcleos por agonistas do GABA fizeram com que ratos perdessem o gosto pela sacarose (HO e BERRIDGE, 2014). Além de se relacionar com o NAC, o GPV apresenta ainda relações com centros gustatórios, com o NPB e outros núcleos pontinos (NORGREN e LEONARD, 1973; WU et al., 2012). As fibras dopaminérgicas trazidas ao GPV pela área tegmentar ventral são as principais mediadoras da motivação pelo alimento neste núcleo (XIA et al, 2011; HJELMSTAD et al., 2013).

Outro núcleo importante na regulação do comportamento alimentar hedônico é a Amígdala. Este núcleo envia projeções para o hipotálamo lateral (KING et al., 1993). Estudos mostram que a amígdala é ativada por diversos estímulos gustatórios e olfatórios relacionados ao alimento (AZUMA et al., 1984; Nishijo et al., 1998). Através de imagens funcionais, verificou-se que a amígdala participa da ativação e manutenção do apetite em humanos (HINTON et al., 2004). Entretanto, a relação da amígdala com o comportamento alimentar data de antes da década de 60, quando iniciou-se os estudos com lesões na amígdala, evidenciando modificações na ingestão de alimentos (ANAND e BROBECK, 1952).

Dessa forma, fica claro que o comportamento alimentar é uma modalidade comportamental altamente complexa e que apresenta centros de regulação em diferentes partes do sistema nervoso. Uma vez que a alimentação é fundamental para manutenção da homeostase, sempre que um dano é provocado em uma das alças de regulação, há uma compensação por outra área.

2.2 Sistema Serotoninérgico e o comportamento alimentar

O sistema serotoninérgico é formado por neurônios serotoninérgicos, seus receptores, pela proteína de receptação (Sert) e pelo neurotransmissor serotonina. Esse sistema está envolvido no controle de diversas modalidades comportamentais

como o comportamento agressivo (MUSHTAQ et al., 2014; ZOHAR et al., 2015; de BOER e NEWMAN-TANCREDI, 2015), o comportamento alimentar (LI et al., 2002; CHOI et al., 2006; LOPES DE SOUZA et al., 2008; WILECKI et al., 2015), dentre outros. Também está relacionado a alterações neuropsiquiátricas como a depressão (CHEN et al., 2013). Os neurônios que produzem a serotonina estão situados nos núcleos da rafe no tronco encefálico, do qual enviam projeções para diferentes áreas cerebrais (JACOBS e AZMITA, 1992) Figura 1. Os núcleos da rafe se dividem em um grupamento rostral (Núcleos rostral e caudal linear, paramediano, dorsal e mediano) e outro caudal (Núcleos pontino, magno, pálido e obscuro) (JACOBS e AZMITA, 1992).

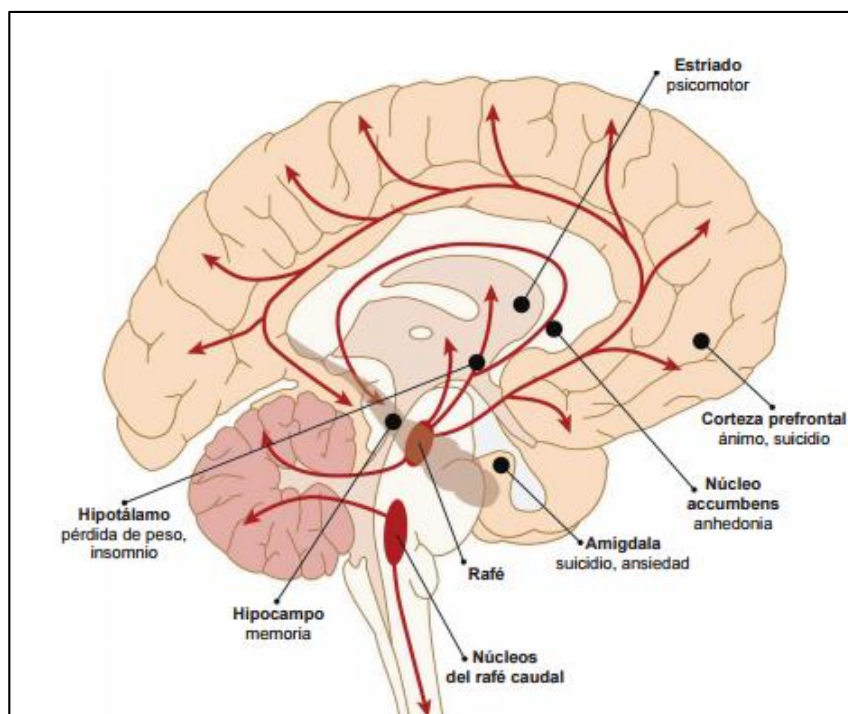


Figura 1: Imagem representando a face medial do encéfalo com ilustrações esquemáticas das projeções de fibras serotoninérgicas dos núcleos da rafe para as demais áreas do sistema nervoso central. Disponível em: http://www.bic.edilaser.net/es/pdf/2503/03_BIC_Marzo_2014_p19-21.pdf

A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano. Esse aminoácido é inicialmente convertido pela enzima limitante L-5-triptofanohidroxilase em L-5-hidroxitriptofano, o qual é subsequentemente descarboxilado pela enzima L-aminoácido aromático descarboxilase, sendo convertido em serotonina (Figura 2).

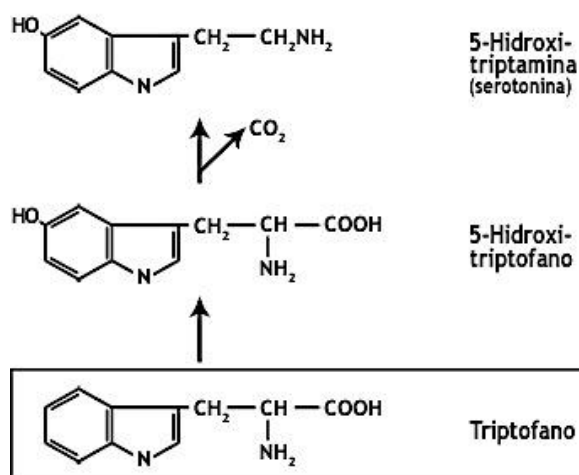


Figura 2: Biossíntese da serotonina. Disponível em http://www.orgone.com.br/a_thumor1.html

A ação da serotonina sobre o corpo é desencadeada através da interação desse neurotransmissor com os seus receptores. Atualmente já foram descritos mais de 13 subtipos diferentes de receptores serotoninérgicos (BARNES e SHARP, 1999). Esses receptores podem ser agrupados em famílias, que vão desde os 5-HT1 até os 5-HT7. A maior parte dos receptores serotoninérgicos são classificados como metabotrópicos, estando associados com proteínas G, exceto o receptor 5-HT3 que é ionotrópico (HOYER et al., 2002). Para maiores descrição dos subtipos de receptores serotoninérgico, sua ação farmacológica e distribuição vide Barnes e Sharp (1999).

Como exposto anteriormente, é bem entendido o papel hipofágico da serotonina sobre neurônios no núcleo hipotalâmico ARC. Essa ação pode ser avaliada ao se administrar d-fenfluramina, que bloqueia a recaptação da serotonina, aumentando seus níveis na fenda sináptica (ROWLAND e CARLTON, 1986; GUY-GRAND, 1992), permitindo maior interação com os receptores. Entre os principais receptores recrutados nessa função hipofágica estão os 5-HT1B e 5-HT2C. A administração de mCPP, um agonista dos receptores 5HT-1B/2C, aumentam a ativação de neurônios, medido pela marcação da proteína FOS, que expressam POMC no ARC. Dados semelhantes foram obtidos ao se aplicar um agonista dos receptores 5HT2A/2C, o que sugere a participação dos receptores 5HT2C na despolarização dos neurônios POMC do arqueado (HEILSER et al., 2002; HEISLER et al., 2003), como mostra a figura 3.

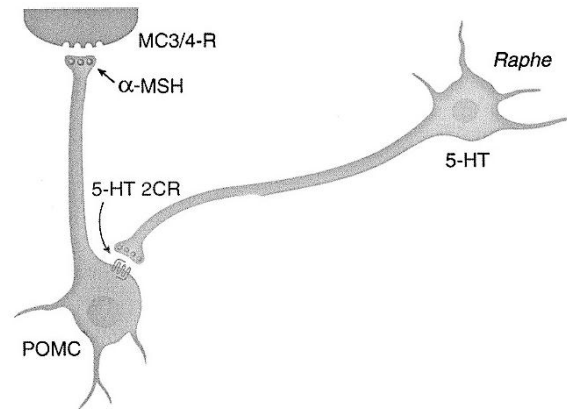


Figura 3: Esquema proposto para ação de drogas serotoninérgicas envolvidas no recrutamento de vias centrais de melanocortina. (Heisler et al., 2003)

Entretanto, os receptores 5HT-1B também possuem papel importante na modulação dos neurônios anorexígenos que expressam POMC/CART e orexígenos que expressam NPY/AgRP. Foi demonstrado que a serotonina, além de despolarizar os neurônios POMC/CART por meio dos receptores 5-HT_{2C} (HEISLER et al., 2002), ainda é capaz de inibir os neurônios NPY/AgRP através dos receptores 5HT-1B (HEISLER et al., 2006). Os neurônios NPY/AgRP apresentam ainda comunicações GABAérgicas com os neurônios POMC/CART que também são inibidas pela ação dos receptores 5HT_{1B} (HEISLER et al., 2006), levando ao aumento de α -MSH e redução de AgRP como ilustra a figura 4. Os receptores 5-HT_{1B} são expressos na membrana pré-sináptica de diversos neurônios (ZHUANG et al., 1999), podendo atuar como um autoreceptor ou um heteroreceptor. A principal função dos receptores 5-HT_{1B} é a hiperpolarização da membrana, inibindo a liberação de neurotransmissores (PAUWELS, 1997). Estes receptores estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central, podendo ser encontrados na substância negra, no globo pálido, no hipocampo, nos núcleos da rafe e no hipotálamo (ZHUANG et al., 1999; HOYER et al., 2002; MAKARENKO et al., 2002; CLISSOLD e CHOI, 2013).

colaboradores (2014) verificaram que a atividade locomotora foi modulada pelos receptores 5HT1A e não 1B. Para alcançar essa conclusão, além de injetarem o agonista 5-HT1A (RU24969), injetaram ainda antagonista deste receptor (WAY100635) e do receptor 5HT1B (GR127935). Dessa forma, eles verificaram que animais injetados com antagonista do receptor 5-HT1A apresentaram o comportamento locomotor normalizados, enquanto que apenas os animais injetados com o antagonista 5-HT1B normalizaram a ingestão de líquidos (Figura 5) (ARSEN et al., 2014).

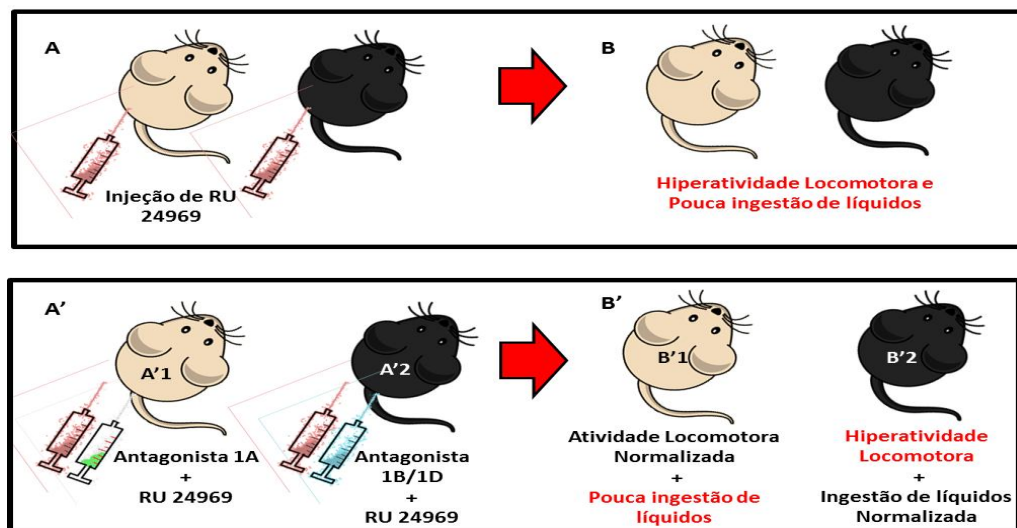


Figura 5: Diagrama dos experimentos farmacológicos realizados por Arosen et al., 2014. A e B- Animais injetados com RU 24969 apresentam hiperatividade locomotora e redução da ingestão de líquidos. A' e B' - Animais injetados com Ru 24969 e antagonista do receptor 1A (A'1) possui a atividade locomotora normalizada (B'1) enquanto que animais injetados com RU 24969 (A'2) possuem a ingestão de líquidos normalizada (B'2)

2.3 Desnutrição perinatal e comportamento alimentar

Durante o período de desenvolvimento, o organismo apresenta a capacidade de adaptar-se a estímulos do meio em que se encontra. Esse fenômeno foi denominado inicialmente de programação metabólica e deu origem a diferentes teorias que relacionam ambiente precoce e doenças na vida adulta (BARKER, 2003). Um dos fatores ambientais indutores de processos adaptativos durante o desenvolvimento e relacionados ao desenvolvimento de doenças na vida adulta é o nutricional, particularmente a desnutrição (BARKER, 2003; GLUCKMAN et al., 2008;

SYMONDS et al., 2009). Diversas pesquisas comprovam que dieta pobre em proteína (8% de caseína) durante o período gestacional e/ou lactação promove alterações permanentes na morfologia e função do sistema nervoso central (MORGANE et al., 1993, OROZCO-SOLIS et al., 2009, 2010). Além do sistema nervoso, diversos outros sistemas são afetados pela desnutrição perinatal, como o músculo esquelético (TOSCANO et al., 2008), o cardiovascular, o renal (HALES e BARKER, 1992) e o próprio metabolismo (OROZCO-SOLIS et al., 2010). Organismo que sofreram desnutrição perinatal são mais susceptíveis a desenvolver síndrome metabólica, cujos principais sintomas são obesidade abdominal (RAVELLI et al., 1999), resistência a insulina (de ROOIJ et al., 2006), hiperglicemia (LI et al., 2010; WANG et al. 2015), hipertensão arterial (STANNER et al., 1997) e hiperlipidemia (LUSSANA et al., 2008). O fato do organismo ter sido submetido a desnutrição perinatal em si não faz com que ele apresente doenças na vida adulta, isto ocorre apenas se ambiente nutricional se modificar (GLUCKMAN e HANSON 2004).

A desnutrição proteica no período perinatal acarreta diferentes alterações morfofisiológica em estruturas responsáveis pelo comportamento alimentar. Animais que foram submetidos a desnutrição proteica no período perinatal são hiperfágicos (LOPES DE SOUZA et al., 2008), apresentam atraso no ponto de saciedade e aumento do tamanho da refeição (OROZCO-SOLIS et al., 2009; LIRA et al., 2014). Foi verificada maior expressão gênica dos peptídeos orexigênicos NPY e AgRP e menor do anorexigênico POMC no hipotálamo de ratos desnutridos no período perinatal (OROZCO-SOLIS et al., 2009). Estas modificações nos peptídeos hipotalâmicos apresentaram ajustes circadianos, com o AgRP apresentando aumento em todos os períodos do dia/noite e o NPY apenas em um horário (OROZCO-SOLIS et al., 2010). Genes constituintes do sistema circadiano também apresentaram alterações de expressão, com níveis elevados para o gene *Periodo1* em quase todos os horários (OROZCO-SOLIS et al., 2010). Além disso, esses animais apresentam maior preferência por alimentos palatáveis e ricos em gordura (ERHUMA et al., 2007) e maior motivação para recompensa alimentar (MARCELINO DA SILVA et al., 2013). Foi observado, em ratos, maior ativação de neurônios em resposta a alimento padrão no NTS (LIRA et al., 2014) e a alimento palatável no NC e ABL (MARCELINO DA SILVA et al., 2013). A maior motivação foi associada ao aumento do receptor dopaminérgico D1 no estriado (MARTIMIANO et al., 2015).

Algumas alterações do comportamento alimentar verificadas em animais desnutridos podem estar relacionadas a ajustes do sistema serotoninérgico. A administração aguda de d-fenfluramina reduziu o consumo alimentar de forma atenuada em ratos desnutridos comparado aos controles (LOPES DE SOUZA et al., 2008). A desnutrição pode ter promovido hiporresponsividade dos receptores 5-HT1B, mas não do 5-HT2C, na indução de hipofagia (LOPES DE SOUZA et al., 2008). Além disso, foi verificado que em animais desnutridos há um aumento da densidade dos receptores 5-HT1A (MANUEL-APOLINA et al., 2014), que quando ativados aumentam o consumo alimentar.

O conjunto de informações publicadas descrevendo as consequências da desnutrição proteica perinatal sobre mecanismos de controle do comportamento alimentar e/ou sobre o sistema serotoninérgico, podem ser analisadas na revisão da literatura intitulada: *Effect of Perinatal Protein Malnutrition Under Serotonergic Control on Feeding Behavior: A Systematic Review* publicada no ***International Journal of Nutrition and Food Sciences*** que encontra-se no apêndice A.

3 HIPÓTESE

A desnutrição proteica perinatal promove redução do número de células imunorreativas ao receptor 5-HT_{1B} nos núcleos arqueado e paraventricular do hipotálamo, bem como no caudado-putame e amígdala.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

- Analisar os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre a densidade de receptores 5-HT1B em estruturas encefálicas que regulam o comportamento alimentar

4.2 Específicos

- Analisar o consumo basal e peso corporal dos animais.
- Verificar número de células imunorreativas aos receptores 5-HT1B nos núcleos arqueado e paraventricular do hipotálamo, amígdala basolateral e caudado-putamem.
- Verificar a expressão de células imunorreativas a proteína FOS nos núcleos caudado-putamem e amígdala central e basolateral em resposta a fenfluramina.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais e Grupos experimentais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem *wistar*, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram transportados para um biotério experimental com em condições ambientais adequadas (temperatura $22,2 \pm 1$ °C), com água e ração *ad libitum* e com ciclo de luz claro/escuro de 12 horas invertido, com luz das 18h00 as 06h00. Após 15 dias de adaptação no biotério experimental, os animais foram acasalados na proporção de um macho para duas fêmeas. Diariamente foi realizado esfregaço vaginal nas fêmeas para verificação de cópula. As fêmeas que apresentaram presença de espermatozoide foram isoladas em gaiolas individuais e delineadas em dois grupos: O grupo Controle, que recebeu água e dieta caseína a 17% *ad libitum*; e o grupo Desnutrido que recebeu dieta hipoproteica caseína 8% até o período de desmame (Tabela 1). Todos os cuidados e experimentos com os animais seguiram as recomendações do CONCEA (Conselho nacional de controle de Experimentação Animal) e foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo: 23076.026104/2012-16).

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais oferecidas durante o período de gestação e lactação.

Constituintes	Dieta hipoprotéica (Caseína 8%)	Dieta normoprotéica (Caseína 17%)
g %	100,00	100,00
Proteínas	8,10	17,30
Carboidratos	75,10	65,90
Lipídios	7,00	7,00
Fibras	5,00	5,00
Vitaminas	1,00	1,00
Minerais	3,50	3,50
Metionina	0,30	0,30
% Kcal	362,48	363,44

5.2 Peso corporal e consumo alimentar

Após o 30º dia de vida, os animais foram mantidos em caixas individuais e o peso corporal (g) foi aferido no 35º dia pós-natal. O consumo alimentar basal também

foi aferido ao 35 dia de vida. Foi considerado o consumo de 4 horas durante o ciclo escuro. O consumo foi medido através da diferença entre o valor oferecido e o valor rejeitado dentro de período de quatro horas.

5.3 Análise farmacológica

No 35^o dia de vida, os animais de ambos os grupos receberam aplicação aguda de fenfluramina (3mg/kg p.c) ou solução salina (NaCl 0,9%). Dessa forma, obteve-se quatro subgrupos: Controle Salina (CS), Controle Fenfluramina (CF), Desnutrido Salina (DS) e Desnutrido Fenfluramina (DF). Após 90 minutos das aplicações, foi realizada a mensuração do consumo alimentar e em seguida o sacrifício para obtenção dos encéfalos para análise histológica.

5.4 Eutanásia e processamento do encéfalo

Os animais foram anestesiados com ketamina (60mg/kg de peso corporal) e xilasina (7,5 mg/kg de peso corporal). O efeito do anestésico foi confirmado através da ausência dos reflexos de preensão. Esta foi realizada com o animal deitado com a região ventral voltada para cima e devidamente fixado pelos membros anteriores em superfície apropriada. A partir do processo xifóide foi efetuado um corte em forma de “V” na musculatura e costelas, abrindo a cavidade torácica de maneira que expusesse o coração permitindo o acesso ao ventrículo esquerdo, onde foi introduzida a cânula para a perfusão a qual esteve presa à área por uma pinça de Keller.

Afastando-se os pulmões, a aorta descendente foi pinçada impedindo, assim, que toda a sua área de irrigação fosse perfundida. A bomba peristáltica, na qual a cânula esteve acoplada, foi acionada mantendo-se a velocidade de infusão da solução compatível com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. 100ml de solução salina (NaCl, 0,9%) foram infundidos inicialmente à temperatura ambiente para remoção sanguínea dos vasos, evitando a formação de coágulos e proporcionando a correta penetração do fixador nos tecidos. Em seguida foram infundidos 400 mL de solução fixadora (4% de paraformaldeído, pH 7,4, em 4^o C). A chegada do fixador na região dos membros anteriores foi constatada pela contração destes, então foi adicionado gelo sobre a cabeça do animal para minimizar a degradação protéica.

Ao final da infusão, os encéfalos fixados foram retirados do crânio e imersos na mesma solução fixadora acrescida de sacarose (20%) durante 4 horas. Em seguida, foram armazenados em solução de PBS e sacarose (20%) até o momento do corte. 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.

5.5 Imunohistoquímica para os receptores 5-HT1B

Uma série de cortes de cada grupo experimental foi submetida a reações de imunohistoquímica contra o receptor 5-HT1B. Os cortes coronais de uma série foram removidos da solução anti-congelante e submetidos a três séries de lavagens (PBS) para remover os resíduos do fixador. Em seguida foram incubados em solução com anticorpos primários anti-5-HT1B (feito em coelho) por 24 h. Esta solução foi formada por PBS, soro normal de cabra (NGS 5 %) e anticorpo contra a proteína 5-HT1B (1:500). 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 PBS (3 x 10 min) e posteriormente incubados em solução com anticorpo secundário por 45 min. Esta solução foi composta por PBS e anticorpo secundário biotinizado feito em cabra contra coelho (1:200). Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens com PBS (3 x 10 min) e outra incubação (45 min) com complexo avidina-biotina-peroxidase 1%. Esta solução foi composta por PBS e cloreto de sódio (NaCl). 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) 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 em lâminas previamente gelatinizadas e submetidos ao processo de desidratação e diafanização. O processo de desidratação ocorreu pela imersão dos cortes em uma sequência crescente de concentrações de álcoois (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %).

70 %, 95 %-I, 95 %-II - 3 min em cada, 100 %-I, 100 %-II, 100 %-III - 5 min cada) seguido de diafanização em xilol (Xilol-I, 5 min, Xilol-II, 10 min). No final do processo os cortes receberam enterlan e lamínula. A identificação dos núcleos estudados foi realizada com auxílio de microscopia óptica de campo claro e do atlas Paxinos e Watson (1998).

5.6 Imunohistoquímica c-FOS

Uma outra 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.

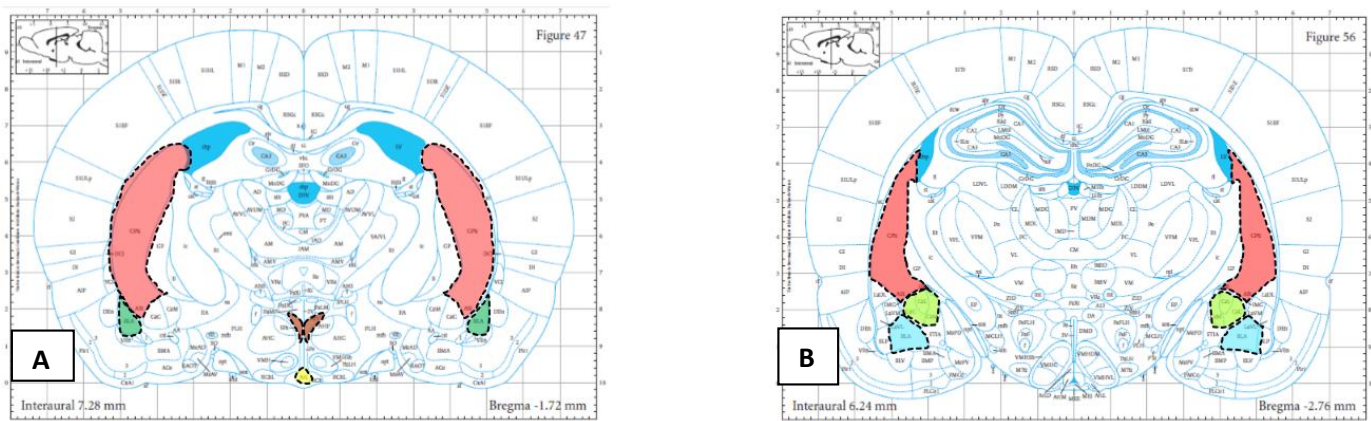
Após a incubação os cortes foram submetidos a lavagens em PBS (3 x 10 min) e posteriormente incubados em solução com anticorpo secundário por 90 min. Esta solução é composta por Triton (0,3%), PBS e anticorpo secundário biotinilado feito em cabra contra coelho (1:200) (Sigma- B8895). Em seguida, os cortes 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 e submetidos a processo de desidratação e diafanização como descrito anteriormente.

5.7 Análise quantitativa dos neurônios imunorreativos

A análise foi realizada em microscopia óptica de campo claro. As células imunorreativas para o receptor 5-HT_{1B} foram quantificadas no hipotálamo – PVN e ARC – no CPu e ABL, nos níveis que se estende de -1,72 à -2,64mm a partir do bregma (figura 6-A e B, respectivamente). Já as células imunorreativas para proteína FOS foram quantificadas no CPu, ABL e AC nos níveis -264 e -2,76mm a partir do bregma (figura 6 B e C, respectivamente). Para delimitação das estruturas foi utilizado como referência o Atlas Estereotático de Rato (PAXINOS e WATSON, 1998).

Figura 6: Ilustração das regiões analisadas no estudo da imunoreatividade ao



receptor 5-HT_{1B} e a proteína FOS. A- nível de bregma -1,72; B- nível de bregma -2,64; Núcleo Caudado; Amígdala Basolateral; Arqueado; Núcleo Paraventricular. Adaptado de Paxinos e Watson, 1998.

6 Resultados

6.1 Efeitos da desnutrição perinatal sobre o peso corporal e consumo alimentar

Os animais desnutridos apresentaram menor ($p < 0,001$) peso corporal ($94,5 \pm 17,1\text{g}$, $n=9$) quando comparado ao grupo controle ($121,9 \pm 8,5\text{g}$, $n=9$) (Figura 7A). Por outro lado, o consumo alimentar foi maior ($p < 0,001$) nos animais desnutridos ($2,8 \pm 0,6\text{g}$, $n=9$) comparado aos controles ($3,8 \pm 0,4\text{g}$, $n=9$) (Figura 7B).

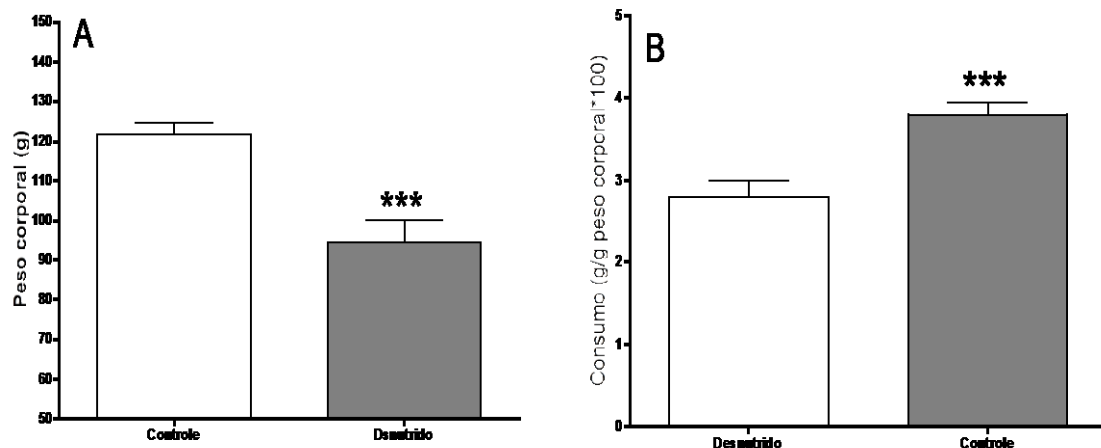


Figura 7- Efeito da desnutrição proteica perinatal sobre o peso corporal (A) e consumo alimentar (B) de ratos pós desmame. Ratos foram submetidos a dieta hipoproteica durante a gestação e lactação. O consumo foi aferido no 35 dia de vida em período de 4 horas. ***p<0,01, Test t de Student.

6.2 Consumo alimentar em resposta a fenfluramina

Após a administração de fenfluramina, foi verificada redução do consumo alimentar nos animais controles e desnutridos comparados aos animais que receberam salina (C= $1,78 \pm 0,080g$, n=12 versus CF= $0,68 \pm 0,070g$, n=6, $p<0.001$; e D= $2,13 \pm 0,11g$, n=10 versus DF= $1,44 \pm 0,16g$, n=6; $p<0.001$). No entanto, quando comparamos animais desnutridos que receberam d-fenfluramina com os controles que também receberam a droga, observamos maior consumo alimentar nos animais desnutridos.

6.3 Células Imunorreativas ao receptor 5-HT1B

Foi quantificado o número de neurônios que apresentaram imunorreatividade ao receptor 5-HT1B nos núcleos ARC e PVN do hipotálamo, e CPu, AC e ABL representando regiões da regulação hedônica do comportamento alimentar.

No que concerne as áreas de regulação hedônica do comportamento alimentar, não foi possível notar diferenças no número de células imunorreativas ao receptor 5-

HT1B no núcleo CPu comparando animais desnutridos ($30,8 \pm 12,97$, $n=4$) aos controles ($29,7 \pm 9,29$, $n=3$) (figura 8A). Entretanto, houve maior número de células imunorreativas ($p<0,01$) ao 5-HT1B na ABL no grupo desnutrido ($33,8 \pm 10,05$, $n=4$) comparado ao controle ($5,3 \pm 1,53$, $n=3$) (figura 8B). No hipotálamo, foi verificado aumento de células 5-HT1B imunorreativas no grupo desnutrido comparado ao controle nos núcleos ARC ($C= 14,3 \pm 6,66$, $n=3$ versus $D= 26,8 \pm 4,19$, $n=4$, $p<0,01$, Figura 9A) e PVN ($C= 30 \pm 8,19$, $n=3$ versus $D= 58,3 \pm 16,66$, $n=4$, $p<0,05$, Figura 9B).

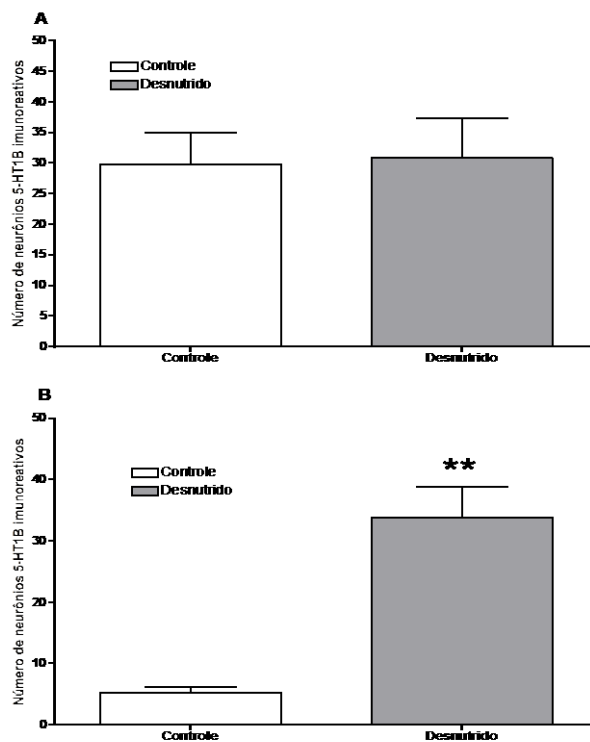


Figura 8: Efeito da desnutrição perinatal sobre neurônios imunorreativos ao receptor 5HT-1B em áreas de regulação do comportamento alimentar hedônico. A- Núcleo Caudado Putame, B- Amígdala Baso Lateral. Os animais receberam dieta hipoproteica (Caseína 8%) ou normoproteica (Caseína 17%) durante a gestação e lactação. As análises celulares foram realizadas ao 35 dia de vida. ** $p<0,01$. Test T de Student.

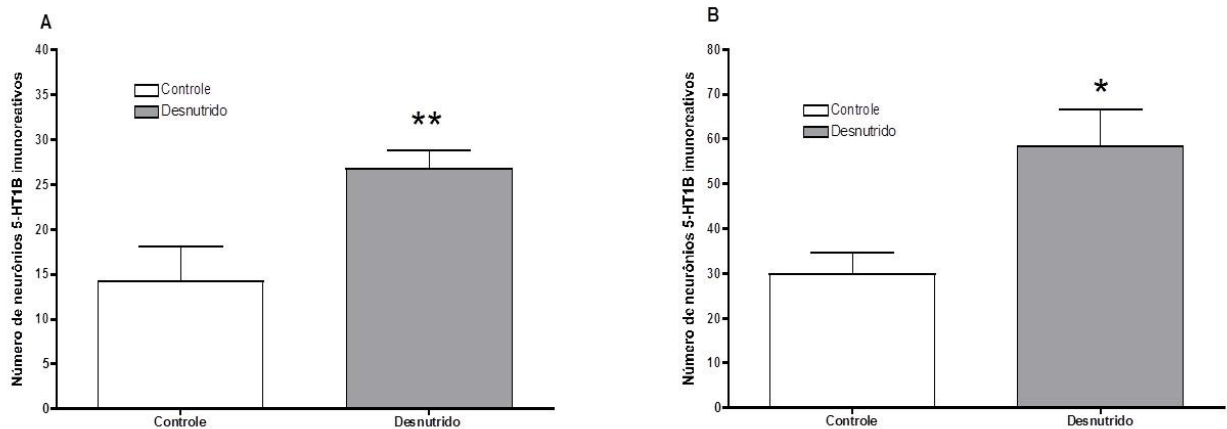


Figura 9: Efeitos da desnutrição proteica no período perinatal sobre o número de neurônios imunorreativos ao receptor 5HT1-B em áreas hipotalâmicas. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de neurônios imunorreativos nos respectivos núcleos: A- ARC; B - PVN. Os animais receberam dieta hipoproteica (Caseína 8%) ou normoproteica (Caseína 17%) durante a gestação e lactação. As análises celulares foram realizadas ao 35 dia de vida. Os dados evidenciam aumento significativo no número de neurônios marcados contra os receptores 5HT-1B nos núcleos ARC e PVN. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Test T de Student.

6.4 Ativação neural em resposta a fenfluramina

Após a administração de fenfluramina, houve aumento no número de neurônios imunorreativos a proteína FOS no grupo desnutrido fenfluramina comparado ao desnutrido salina no CPu ($D = 26,5 \pm 21,56$, $n = 4$ versus $DF = 106,5 \pm 40,45$, $n = 4$, $p < 0,05$, Figura 10A) e AC ($D = 13,6 \pm 8,17$, $n = 5$ versus $DF = 64 \pm 31,48$, $n = 3$, $p < 0,05$, Figura 10B). No grupo controle, a fenfluramina não alterou o número de células ativadas no CPu ($C = 16,5 \pm 7,78$, $n = 2$ versus $CF = 63 \pm 39,28$, $n = 3$, $p > 0,05$, Figura 10A) e AC ($C = 6,3 \pm 4,93$, $n = 3$ versus $CF = 44 \pm 26,33$, $n = 5$, $p > 0,05$, Figura 10B). Não houve alteração no número de células imunorreativas a proteína FOS na ABL no grupo controle ($C = 5 \pm 3,37$, $n = 4$ versus $CF = 21,3 \pm 11,35$, $n = 4$, $p > 0,05$, Figura 10C) ou desnutrido ($D = 20 \pm 13,64$, $n = 4$ versus $DF = 14,4 \pm 3,13$, $n = 5$, $p > 0,05$, Figura 10C) quando comparados aos seus respectivos grupos salina. Esses dados estão sintetizados na figura 10.

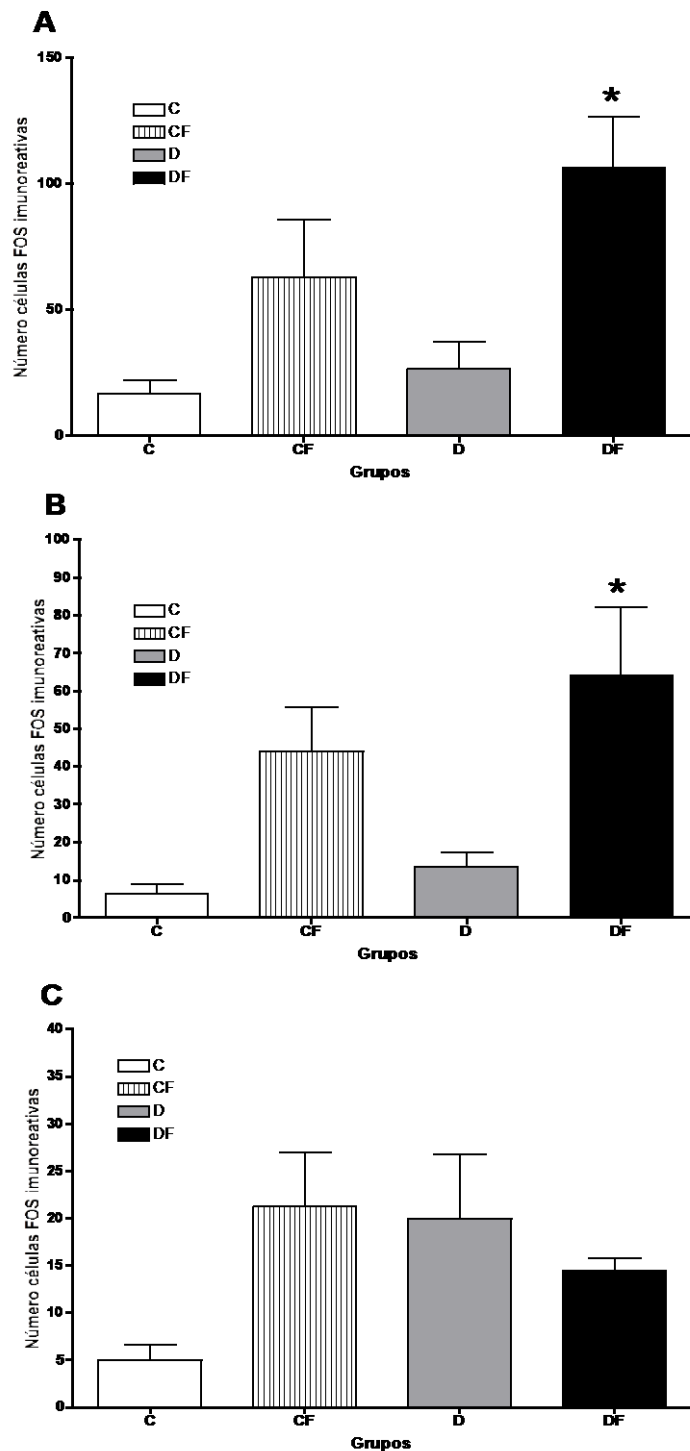


Figura 10: Efeitos da desnutrição proteica no período perinatal sobre o número de neurônios c-Fos positivo em áreas de regulação hedônica do comportamento alimentar com e sem a administração de fenfluramina. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão nos grupos das por área analisada. A- Caudado-Putamen; B- Amígdala Central; C- Amígdala Basolateral. A administração de fenfluramina induziu um aumento na ativação neural nos grupos desnutridos no CPu e na AC, entretanto não diferença na expressão de FOS na ABL. (C= Controle Salina, CF=

Controle Fenfluramina, D=Desnutrido Salina e DF= Desnutrido Fenfluramina).
* $p < 0,05$, test T de Student.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo verificamos que a desnutrição proteica no período perinatal aumentou o número de neurônios que expressam os receptores 5-HT_{1B} nos núcleos ARC, PVN e na ABL. Além disso, a desnutrição aumentou o número de neurônios ativados em resposta a fenfluramina no CPu e na AC. Por vários anos, pesquisas vêm somando evidências dos efeitos tardios desnutrição perinatal. Sobre os mecanismos que controlam comportamento alimentar, foi verificado que a desnutrição perinatal promove maior consumo de alimento, do número de refeições (OROZCO-SÓLIS et al., 2009), do tempo para alcançar a saciedade (LIRA et al., 2014; OROZCO-SÓLIS et al., 2009) e preferência por dietas palatáveis e ricas em gordura (VICENTE et al., 2004; LISBOA et al., 2008; ERHUMA, et al., 2007). A desnutrição perinatal ainda promove aumento na adiposidade visceral (NIELSEN, et al., 2012) e consequentemente aumento da pré-disponibilidade à aquisição de doenças metabólicas, tais como diabetes tipo II (HALES e BARKER, 1992). As alterações sobre o comportamento alimentar promovidas pela desnutrição perinatal estão diretamente relacionadas as adaptações de estruturas encefálicas envolvidas no controle deste comportamento. Entre estas, podemos identificar modificações do controle do sistema serotoninérgico.

No hipotálamo, verificamos o aumento no número de neurônios que expressam os receptores 5-HT_{1B} nos núcleos ARC e PVN. Diversos estudos já correlacionaram a desnutrição perinatal com alterações na expressão de receptores serotoninérgicos e não serotoninérgicos em diversas áreas do encéfalo (MANUEL-APOLINAR et al., 2013). A desnutrição perinatal promoveu aumento do número de neurônios que expressam os receptores 5-HT_{1A} no hipotálamo VM, área pré-óptica medial, HL e no próprio ARC (MANUEL-APOLINAR et al., 2013). Esse aumento vem acompanhado de maior liberação de serotonina na formação hipocampal (MOKLER et al., 2003) e em outras regiões do cérebro (MANJARREZ et al., 2012). Em contraste com nossos resultados, em relação ao hipotálamo, pesquisas anteriores mostraram que a desnutrição perinatal não promoveu modificações na expressão de RNAm para os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} de ratos machos (LOPES DE SOUZA et al., 2008).

Entretanto, estes pesquisadores observaram a expressão dos receptores 5-HT1B no hipotálamo como um todo, enquanto que no presente trabalho realizamos a quantificação apenas no ARC e PVN. Dessa forma, é possível que em demais núcleos hipotalâmicos a expressão dos receptores 5-HT1B seja reduzida, corroborando nossos dados com os achados na literatura (LOPES DE SOUZA et al., 2008). Em outro estudo, em ratas fêmeas submetidas a desnutrição proteica perinatal foi verificado aumento na proteína transportadora de serotonina bem como nos (densidade, número de neurônios, RNAm??) receptores 5-HT1B no hipotálamo (PÔRTO et al., 2009). Essa divergência pode ser acarretada devido ao momento do dia em que estes animais foram sacrificados (houve diferença nos dois estudos, qual?), pois sabe-se que a liberação de serotonina sofre oscilações em diferentes áreas do encéfalo ao longo do dia (CORTHELL et al., 2013; STANLEY et al., 1989; LEIBOWITZ et al., 1989). Além disso, Pôrto e colaboradores (2009) utilizaram ratas em seu experimento, o que abre a possibilidade de haver alterações promovidas pelo ciclo estral (RAPKIN e AKOPIANS, 2012).

Os receptores 5-HT1B atuam por meio de interações com proteínas G do subtipo $G_{i/o}$. Quando estimulado pela serotonina, os receptores 5-HT1B por meio da proteína $G_{i/o}$ atuam inibindo a síntese de AMPc (GORDON et al., 1993; MAROTEAUX et al., 1992; BOUHELAL et al., 1988). A redução na síntese do AMPc causa diminuição de mecanismo polarizantes que envolvem Ca^{+} , o que acaba por hiperpolarizar a célula (GORDON et al., 1993). Sabendo disso, pode-se inferir que um aumento nos receptores 5-HT1B nos núcleos PVN e ARC estejam relacionados com a redução na atividade desses neurônios. Entretanto, no estudo realizado por Lopes de Souza e colaboradores (2008) evidenciou-se que a desnutrição proteica no período perinatal promove aumento na ativação do PVN em resposta a fenfluramina. Neste ponto, é importante destacar que os receptores 5-HT1B são expressos na membrana de neurônios orexígenos que liberam NPY e AgRP (HEISLER et al., 2006), enquanto os receptores 5HT-2C, que desempenham um papel despolarizante, são expressos nas membranas de neurônios anorexígenos que expressam POMC (HEISLER et al. 2003 e 2006). Da mesma forma que o PVN o ARC também apresenta receptores 5-HT1B e 2C predominantes em neurônios orexígenos e anorexígenos, respectivamente (HEISLER et al., 2003; LEE et al., 2002; DRYDEN et al., 1996). Dessa forma é provável que a maior ativação neural verificada por Lopes de Souza e colaboradores no PVN

em resposta a fenfluramina tenha sido devido ao aumento na ativação de neurônios anorexígenos que expressam os receptores 5-HT_{2C} e não nos neurônios orexígenos que expressam os receptores 5-HT_{1B}.

Embora a desnutrição proteica no período perinatal tenha aumentado o número de neurônios marcados contra os receptores 5-HT_{1B} na ABL essas alterações não puderam ser constatadas no CPu. A amígdala como um todo é uma região subcortical que participa do processo de formação da memória (TOUZANI et al., 2009). Ela apresenta alguns subnúcleos distintos que possuem conexões diferentes com diversas áreas encefálicas (REPPUCCI e PETROVICH 2015). A ABL está associada com estímulos gustatórios (AZUMA et al., 1984; NISHIJO et al., 1998) e olfatórios (CAIN e BINDRA et al., 1972; CAIN, 1975) participando do aprendizado de novos odores e sabores (GUZMAN-RAMOS e BERMUDEZ-RATTONI, 2012; TOUZANI e SCLAFANI, 2005; TOUZANI et al., 2009). Estudos recentes demonstraram que a ABL apresenta projeções para o cíngulo anterior, áreas límbicas e uma pequena porção ventral do hipotálamo lateral. Além disso, mostrou ainda que a ABL apresenta conexões recíprocas com o córtex pré-frontal (REPPUCCI e PETROVICH 2015). Análises dos terminais enviados da ABL para o córtex pré-frontal mostram que mais de 95% das fibras enviadas para essa região são glutamatérgicas (GABBOTT et al., 2006). Neurônios piramidais do córtex pré-frontal recebem impulsos da ABL se tornam ativos em resposta a odores (LAVIOLETTE et al., 2005), enquanto que a inativação desses neurônios ocorre em resposta ao medo (SOTRES-BAYON et al., 2012). Dessa forma, sabendo do potencial hiperpolarizante dos receptores 5HT-1B e de sua atuação como heteroceptor, é possível que o aumento deste receptor na ABL seja um dos fatores responsáveis pelas alterações do sistema GABAérgico e pela produção de sobressaltos em resposta ao medo verificados em animais submetidos a desnutrição proteica (FRANÇOLINS-SILVA et al., 2006).

Nossos dados mostraram ainda maior ativação da AC e do CPu promovida pela desnutrição proteica perinatal em resposta a administração de d-fenfluramina. A AC, diferentemente da ABL, envia projeções para região dorsal do hipotálamo lateral e recebe densas projeções desse núcleo hipotalâmico através do estriado (REPPUCCI e PETROVICH 2015; SWANSON e PETROVICH 1998). O CPu e a AC atuam principalmente gerando o prazer promovido pelo alimento (BERRIDGE e KRINGELBACH, 2008). Para realização dessa função, O CPu e AC contam com

diversos neurotransmissores, tais como dopamina (BARBANO et al., 2009), opióides (BARBANO et al., 2009), endocanabinóides (MAHLER et al., 2007) e serotonina (PRATT et al., 2009). Estudos anteriores mostraram que a desnutrição proteica no período perinatal é capaz de promover alterações no sistema dopaminérgico, aumentando a expressão de receptores D1 no núcleo estriado e estimulando a motivação por recompensa alimentar (MARTIMIANO et al., 2015). Além disso, foi verificado que a desnutrição proteica promove aumento da ativação do CPu, ABL e AC em resposta a oferta de dieta palatável (MARCELINO DA SILVA et al., 2013). Esses dados se assemelham com os nossos após o aumento dos níveis de serotonina promovidos pela d-fenfluramina nos animais desnutridos.

Essas evidências sugerem que a desnutrição proteica no período perinatal aumenta a motivação por recompensa alimentar não apenas por modificações ocorridas no sistema dopaminérgico (MARTIMIANO et al., 2015), como também no sistema serotoninérgico, uma vez que a maior ativação da AC e CPu encontradas em animais desnutridos após a oferta de dieta palatável (MARCELINO DA SILVA et al., 2013) foi semelhante ao nossos achados após a administração de d-fenfluramina. A maior ativação da ABL verificado por Marcelino da Silva difere dos resultados encontrados aqui possivelmente pelo fato que a ABL está relacionada com o aprendizado de sabores e odores, como discutido acima. Entretanto, como nossa dieta foi mantida a mesma durante todo o procedimento experimental, é compreensível a razão pela qual não houve aumento na ativação desse núcleo. Isso sugere que o principal neurotransmissor envolvido na ativação da ABL em resposta a odores e sabores provavelmente não é a serotonina (YOON e BAIK et al., 2015), caso contrário haveríamos obtido maior número de FOS nos animais desnutridos após o uso da d-fenfluramina.

8 CONCLUSÕES

Este estudo evidenciou que a desnutrição proteica no período perinatal aumenta o número de células imunorreativas ao receptores 5HT-1B no hipotálamo (nos núcleos PVN e ARC) e em áreas de regulação hedônica do comportamento alimentar (na ABL). Além disso, promove ainda o aumento da ativação dos núcleos CPu e na AC em resposta a administração de fenfluramina.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA JI, BOYNTON FA, KIRSCHNER KF, NEISEWANDER JL. Stimulation of 5-HT_{1B} receptors decreases cocaine- and sucrose-seeking behavior. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** . v.80, p: 297–307. 2005.
- ANAND, BK, BROBECK, JR. Food intake and spontaneous activity of rats with lesions in the amygdaloid nuclei. **J. Neurophysiol.** v.15, p: 521 - 530. 1952.
- ANAND BK, BROBECK JR. Localization of a 'feeding center' in the hypothalamus of the rat. **Proc Soc Exp Biol Med**.v. 77, p: 323–324. 1951.
- ARONSEN D, WEBSTER J, SCHENK S. RU 24969-produced adipsia and hyperlocomotion: Differential role of 5HT_{1A} and 5HT_{1B} receptor mechanisms. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** v. 124, p: 1–4. 2014.
- ASHBY FG, TURNER BO, HORVITZ JC: Cortical and basal ganglia contributions to habit learning and automaticity. **Trends Cogn Sci.** v.14, p: 208–215. 2010.
- AZUMA S, YAMAMOTO T, KAWAMURA Y. Studies on gustatory responses of amygdaloid neurons in rats. **Exp Brain Res.** v.56, n.1, p: 12–22. 1958.
- BARBANO, M.F., LE SAUX, M., CADOR M. Involvement of dopamine and opioids in the motivation to eat: influence of palatability, homeostatic state, and behavioral paradigms. **Psychopharmacology.** v.203, n.3, p: 475–487. 2009.
- BARKER DJ. The developmental origins of adult disease. **Eur J Epidemiol.** v.18, p:733–736. 2003.
- BARNES NM, SHARP T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology.** v.38, p:1083–1152. 1999.
- BARRETO MEDEIROS JM, CABRAL FILHO JE, DE SOUZA SL, FREITAS SILVA SR, MENDES DA SILVA C, DEIRO TC, ET AL. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. **Nutr Neurosci.** v.5, n.3, p: 211-4. 2002.
- BATTERHAM RL, LE ROUX CW, COHEN MA, PARK AJ, ELLIS SM, PATTERSON M, FROST GS, GHATEI MA, BLOOM SR. Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. **J Clin Endocrinol Metab.** v.88, p: 3989–92. 2003.
- BERTHOUD HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 26, n.4, p: 393–428. 2002.
- BLEVINS JE, STANLEY BG, REIDELBERGER RD. Brain regions where cholecystokinin suppresses feeding in rats. **Brain Res.** v.860, p: 1–10. 2000.
- BOUHELAL R, SMOUNYA L, BOCKAERT J. **Eur. J. Pharmacol.** v.151, p: 189-196. 1988.
- BROBECK JR, LARSSON S, REYES E. A study of the electrical activity of the hypothalamic feeding mechanism. **J Physiol.** v.132, p: 358–364. 1956.

CAIN DP. Effects of insulin injection on responses of olfactory bulb and amygdala single units to odors. **Brain Res.** v.99, n1, p: 69–83. 1975.

CAIN DP, Bindra D. Responses of amygdala single units to odors in the rat. **Exp Neurol.** v. 35, n.1, p: 98–110. 1972.

CASTRO DC, BERRIDGE KC. Opioid Hedonic Hotspot in Nucleus Accumbens Shell: Mu, Delta, and Kappa Maps for Enhancement of Sweetness “Liking” and “Wanting”. **The Journal of Neuroscience.** v.34, n.12, p: 4239–4250. 2014.

CHEN H-X, JIN Z-L, ZHANG L-M, XUE R, XU X-D, ZHAO N, QIU Z-K, WANG X-W, ZHANG Y-Z, YANG R-F, LI Y-F. Antidepressant-Like Activity of YL-0919: A Novel Combined Selective Serotonin Reuptake Inhibitor and 5-HT_{1A} Receptor Agonist. **PLoS ONE.** v.8, n. 12. 2013

CHOI S, BLAKE V, COLE S, FERNSTROM JD. Effects of chronic fenfluramine administration on hypothalamic neuropeptide mRNA expression. **Brain Res.** p: 1087, 83–86. 2006.

CLISSOLD KA, CHOI E, PRATT WE. Serotonin 1A, 1B, and 7 receptors of the rat medial nucleus accumbens differentially regulate feeding, water intake, and locomotor activity. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** v.112, p: 96-103. 2013.

CORTHELL JT, STATHOPOULOS AM, WATSON CC, BERTRAM R, TROMBLEY PQ. Olfactory bulb monoamine concentrations vary with time of day. **Neuroscience.** v. 247, p: 234–241. 2013.

DE BOER SF, NEWMAN-TANCREDI A. Anti-aggressive effects of the selective high-efficacy 'biased' 5-HT_{1A} receptor agonists F15599 and F13714 in male WTG rats. **Psychopharmacology (Berl).** 2015.

DE ROOIJ SR, PAINTER RC, ROSEBOOM TJ, PHILLIPS DI, OSMOND C, BARKER DJ, TANCK MW, MICHELS RP, BOSSUYT PM, BLEKER OP. Glucose tolerance at age 58 and the decline of glucose tolerance in comparison with age 50 in people prenatally exposed to the Dutch famine. **Diabetologia.** v. 49, p: 637-43. 2006.

DILEONE RJ, TAYLOR JR, PICCIOTTO MR. The drive to eat: comparisons and distinctions between mechanisms of food reward and drug addiction. **Nature neuroscience.** v.15, n.10. 2012.

DOBBING, J. The Influence of Early Nutrition on the Development and Myelination of the Brain. **Proc R Soc Lond B Biol Sci.** v.159, p: 503-9. 1964.

DRYDEN S, FRANKISH HM, WANG Q, WILLIAMS G. Increased feeding and neuropeptide Y (NPY) but not NPY mRNA levels in the hypothalamus of the rat following central administration of the serotonin synthesis inhibitor p-chlorophenylalanine. **Brain Res.** v.724, p: 232–237. 1996.

ERHUMA A, BELLINGER L, LANGLEY-EVANS SC, BENNETT AJ. Prenatal exposure to undernutrition and programming of responses to high-fat feeding in the rat. *Br J Nutr.* 2007; 98, 517-524.

FERGUSON AV, LATCHFOR KJ, SAMSON WK. The paraventricular nucleus of the hypothalamus – a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. **Expert Opin.** p: 717–727. 2008.

FRANÇOLINS-SILVA AL, BRANDÃO ML, ALMEIDA SS. Early postnatal protein malnutrition causes resistance to the anxiolytic effects of diazepam as assessed by the fear-potentiated startle test. **Nutritional Neuroscience**. v.10, n.1/2, p: 23–29

GABBOTT PL, WARNER TA, BUSBY SJ. Amygdala input monosynaptically innervates parvalbumin immunoreactive local circuit neurons in rat medial prefrontal cortex. **Neuroscience**. v.139, p: 1039–1048. 2006.

GLUCKMAN PD, HANSON MA. Developmental Origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. **Pediatr Res**. v. 56, n.3, p: 311-7. 2004.

GLUCKMAN PD, HANSON MA, COOPER C, THORNBURG KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. **N Engl J Med**. v.359, p: 61–73. 2008.

GORDON YK. SUSAN R, GEORGET-S ROMAN L, ZASTAWNY, T MIREILLE CARON, MICHEL BOUVIER, MICHAEL DENNIS, BRIAN F. O'DOWD. Human Serotonin1B Receptor Expression in Sf9 Cells: Phosphorylation, Palmitoylation, and Adenylyl Cyclase Inhibition. **Biochemistry** v. 32, p: 11727-1733. 1993.

GRILL HJ. Leptin and the systems neuroscience of meal size control. **Front.Neuroendocrinol**. v.31, n.1, p: 61–78. 2010.

GRILL HJ. Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. **Obesity** (Silver Spring). v. 5, p: 216S–221S. 2006.

GRILL HJ, HAYES MR. 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.). v.1, p:S11–S15. 2009.

GRILL HJ, KAPLAN JM. The neuroanatomical axis for control of energy balance. **Front Neuroendocrinol**. v.23, p: 2–40. 2002.

GUY-GRAND. Clinical studies with d-fenfluramine. **Am. J. Clin. Nutr.** v.55, p: 172S-176S. 1992.

GUZMAN-RAMOS K, BERMUDEZ-RATTONI F. Interplay of amygdala and insular cortex during and after associative taste aversion memory formation. **Rev Neurosci**. v.23, n. 5–6, p: 463–71. 2012.

HALES CN, BARKER DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**. v.35, n.7, p: 595-601. 1992.

HALFORD, J. C., S. C. WANNINAYAKE, et al. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. **Pharmacol Biochem Behav**. v.61, n.2, p: 159-68. 1998.

HEISLER LK, COWLEY MA. TECOTT LH, FAN W, LOW MJ, SMART JL, RUBINSTEIN M, TATRO JB, MARCUS JN, HOLSTEGE H, LEE CE, CONE RD, ELMQUIST JK. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. **Science**. v.297, p: 609-611. 2002.

HEISLER LK, COWLEY MA. TECOTT LH, FAN W, LOW MJ, SMART JL, RUBINSTEIN M, TATRO JB, MARCUS JN, HOLSTEGE H, LEE CE, CONE RD, Elmquist JK. Central serotonin pathways regulating energy homeostasis. **Annals New York Academy of Sciences**. v.994, p: 169-174. 2003.

HEISLER LK, JOBST EE, SUTTON GM, ZHOU L, BOROK E, THORNTON-JONES Z, LIU HY, ZIGMAN JM, BALTHASAR N, KISHI T, LEE CE, ASCHKENASI CJ, ZHANG CY, YU J, BOSS O, MOUNTJOY KG, CLIFTON PG, LOWELL BB, FRIEDMAN JM, HORVATH T, BUTLER AA, ELMQUIST JK, COWLEY MA. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. **Neuron**. v.51, p: 239-249. 2006.

HILARIO MR, COSTA RM. High on habits. **Front Neurosci**. v. 2, p: 208–217. 2008

HINTON EC, PARKINSON JA, HOLLAND AJ, ARANA FS, ROBERTS AC, OWEN AM. Neural contributions to the motivational control of appetite in humans. **Eur. J. Neurosci**. v.20, p: 1411-1418. 2004.

HJELMSTAD GO, XIA Y, MARGOLIS EB, FIELDS HL. Opioid modulation of ventral pallidal afferents to ventral tegmental area neurons. **J. Neurosci**. v.33, p: 6454–6459. 2013.

HNASKO TS, SZCZYPKA MS, ALAYNICK WA, During MJ, Palmiter RD. A role for dopamine in feeding responses produced by orexigenic agents. **Brain Res**. v.1023, n.2, p: 309–318. 2004.

HO C-Y, BERRIDGE KC. Excessive disgust caused by brain lesions or temporary inactivations: mapping hotspots of the nucleus accumbens and ventral pallidum. **European Journal of Neuroscience**, v. 40, p: 3556–3572. 2014.

HOYER D, HANNON JP, MARTIN GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacology, Biochemistry and behavior**. v.71 p: 533-554. 2002.

IWAI H, KURAMOTO E, YAMANAKA A, SONOMURA T, UEMURA M, GOTO T. Ascending parabrachio-thalamo-striatal pathways: Potential circuits for integration of gustatory and oral motor functions. **Neuroscience**. 2015.

JACOBS BL, AZMITIA EC. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiol Rev**. v.72, n.1, p: 165-229. 1992.

KELLEY AE, BALDO BA, PRATT WE. A proposed hypothalamic- thalamic striatal axis for the integration of energy balance, arousal and food reward. **J. Comp.Neurol**. v.493, p: 72–85. 2005.

KILLGORE WD, YOUNG AD, FEMIA LA, Bogorodzki P, Rogowska J, Yurgelun-Todd DA. Cortical and limbic activation during viewing of high- versus low-calorie foods. **Neuroimage**. v. 19, p: 1381-1394. 2003.

KING BM, KASS JM, NEVILLE KL, SAM H, TATFORD 3RD AC, ZANSLER CA. Abnormalweight gain in rats withamygdaloid lesions. **Physiol. Behav**. v.54, p: 467-470. 1993.

LAVIOLETTE SR, LIPSKI WJ, GRACE AA. A subpopulation of neurons in the medial prefrontal cortex encodes emotional learning with burst and frequency codes through a dopamine D4 receptor-dependent basolateral amygdala input. **J Neurosci**. v.25, p: 6066–6075. 2005.

LEE MD, KENNETT GA, DOURISH CT, CLIFTON PG. 5-HT1B receptors modulate components of satiety in the rat: behavioural and pharmacological analyses of the selective serotonin1B agonist CP-94,253. **Psychopharmacology**. v.164, n.1, p: 49-60. 2002.

LIRA LA, ALMEIDA LCA, MARCELINO DA SILVA AA, CAVALCANTE TCF, DE MELO DD'PCB, SOUZA JA, CAMPINA RCF. Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. **Int J Dev Neurosci**. v.38, p : 23-29. 2014.

LEIBOWITZ SF, WORTLEY KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. **Peptides**. v.25, n.3, p: 473–504. 2004.

LI Y, HE Y, QI L, JADDOE VW, FESKENS EJ, YANG X, MA G, HU FB. Exposure to the Chinese famine in early life and the risk of hyperglycemia and type 2 diabetes in adulthood. **Diabetes**. 2010.

LISBOA PC, FAGUNDES AT, et al. Neonatal low-protein diet changes deiodinase activities and pituitary TSH response to TRH in adult rats. **Exp Biol Med** (Maywood). v. 233, n. 1, p: 57-63. 2008.

LOPEZ-ALONSO VE, MANCILLA-DIAZ JM, RITO-DOMINGO M, GONZÁLES-HERNÁNDEZ B, ESCASTÍN-PÉREZ RE. The effects of 5-HT1A and 5-HT2C receptor agonists on behavioral satiety sequence in rats. **Neurosci Lett**. v.416, n.3, p: 285-8. 2007.

LOPES DE SOUZA S, OROZCO-SOLIS R, GRIFT I, MANHÃES DE CASTRO R, BOLAÑOS-JIMÉNEZ F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **European Journal of Neuroscience**. v. 27, p: 14000-1408. 2008.

LUCAS JJ, YAMAMOTO A, SCEARCE-LEVIE K, SAUDOU F, HEN R., Absence of fenfluramine-induced anorexia and reduced c-fos induction in the hypothalamus and central amygdaloid complex of serotonin 1B receptor knock-out mice. **J. Neurosci**. v.18, p: 5537–5544.1998.

LUNDY JR RF, NORGREN R. Gustatory system. In: Paxinos G, editor. The Rat Nervous System. San Diego, CA: **Elsevier**. p. 891–921. 2004.

LUSSANA F, PAINTER RC, OCKE MC, BULLER HR, BOSSUYT PM, ROSEBOOM TJ. Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. **Am J Clin Nutr**. v.88, p: 1648-52. 2008.

MAGALHÃES CP, FREITAS MFL, NOGUEIRA MI, CAMPINA RCF, TAKASE LF, LOPES SOUZA S, MANHÃES DE CASTRO R. Modulatory role of serotonin on feeding Behavior. **Nutritional Neuroscience**. v.13, n. 6. 2010

MAHLER SV, SMITH KS, BERRIDGE KC. Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward. **Neuropsychopharmacology**. v. 32, n. 11, p: 2267–2278. 2007.

MANJARREZ GG, MARTINEZ-RADILLA K, BOYZO-MONTES DE OCA A, OROZCO SUÁREZ S, HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ J. Increased expression of tryptophan-5-hydroxylase 1, but not 2, in brainstem as a result of intrauterine malnutrition. **Int J Dev Neurosci**. v. 30, n. 6, p: 445-50. 2012.

MAKARENKO IG, MEGUID MM, UGRUMOV MV. Distribution of serotonin 5-hydroxytryptamine 1B (5-HT1B) receptors in the normal rat hypothalamus. **Neuroscience Letters**. v.328, p: 155–159. 2002.

MANUEL-APOLINA L, ROCHA L, DAMASIO L, TESORO-CRUZ E, ZARATE A. Role of prenatal undernutrition in the expression of serotonin, dopamine and leptin receptors in adult mice: Implications of food intake. **Mol Med Rep**. v.9, n.2, p: 407-12. 2014.

MARCELINO DA SILVA AA, BORBA TK, DE ALMEIDA LIRA L, CAVALCANTE TC, DE FREITAS MF, LEANDRO CG, DO NASCIMENTO E, DE SOUZA SL. Perinatal undernutrition stimulates seeking food reward. **Int J Dev Neurosci**. v. 31, n. 5, p: 334-41. 2013.

MAROTEAUX L, SAUDOU F, AMLAIKY N, BOSCHERT U, PLASST JL, HEN R. Mouse 5HT1B serotonin receptor: Cloning, functional expression, and localization in motor control centers. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v. 89, p: 3020-3024.1992.

MARTIMIANO PHM, ROBERTO DA SILVA G, COIMBRA VFSA, MATOS RJB, DE SOUZA BFP, MARCELINO DA SILVA AA, MELO DD'PCB, LOPES DE SOUZA S, FREITAS MFL. Perinatal malnutrition stimulates motivation through reward and enhances drd1a receptor expression in the ventral striatum of adult mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 134, p.106–114. 2015.

MEISTER B. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. **Physiol Behav**. v.92, p: 263–271. 2007.

MICHAELIDES M, ANDERSON SA, ANANTH M, SMIRNOV D, THANOS PK, Neumaier JF, Wang GJ, Volkow ND, Hurd YL. Whole-brain circuit dissection in free-moving animals reveals cell-specific mesocorticolimbic networks. **J Clin Invest**. v.123, p: 5342–5350. 2013.

MOKLER D, GALLER JR, MORGANE PJ. Modulation of 5-HT release in the hippocampus of 30-day-old rats exposed in utero to protein malnutrition. **Developmental Brain Research**. v.142, p: 203–208. 2003.

MORGANE PJ, AUSTIN-LAFRANCE R, BRONZINO J, TONKISS J, DIAS-CINTRA S, CINTRA L, KEMPER T, GALLER JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev**. v.17, n.1, p: 91-128. 1993.

MORTON DP, ARAGON-VARGAS LF, CALLISTER R. Effect of ingested fluid composition on exercise-related transient abdominal pain. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**. v.14, p: 197–208. 2004.

MULLIER A, BOURET SG, PREVOT V, DEHOUCK B. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. **J Comp Neurol**. v.518, p:943–962. 2010.

MUSHTAQ R, SHOIB S, SHAH T, MUSHTAQ S. 5-Hydroxy tryptamine transporter (5HTT) gene promoter region polymorphism in anxiety and depressive disorders. **Med J Islam Repub Iran**. 2014

NAGASE H, NAKAJIMA A. Regulation of feeding behavior, gastric emptying, and sympathetic nerve activity to interscapular brown adipose tissue by galanin and enterostatin: the involvement of vagal-central nervous system interactions. **Journal Gastroenterol**. v.37, p.118-27, 2002.

NAKURAMA K, KIKUSSUI T, TAKEUCHI Y, MORI Y. Changes in social instigation- and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5HT1B mRNA receptor expression in male mice from early weaning. **Behav Brain Res**. v.187, n. 2, p: 442-8. 2008.

NIELSEN MO, KOGSTED AH, THYGESEN MP, STRATHE AB, CADDY S, QUISTORFF B, JORGENSEN W, CHRISTENSEN VG, HUSTED S, CHWALIBOG A, SEJRSEN K, PURUP S, SVALASTOGA E, MCEVOY FJ, JOHNSEN L. Late gestacion undernutrition can presipose for visceral adiposity by altering fat distribution patterns and increasing the preference for a high-fat diet in early postnatal life. **Br J Nutri.** V.109, n.11, p: 2098-110. 2013.

NISHIJO H, UWANO T, TAMURA R, ONO T. Gustatory and multimodal neuronal responses in the amygdala during licking and discrimination of sensory stimuli in awake rats. **J Neurophysiol.** v.79, n.1, p: 21–36. 1998.

NORGREN R, LEONARD CM. Ascending central gustatory pathways. **J. Comp. Neurol.** v.150, p: 217–237. 1973.

OLIVEIRA LS, PEREIRA DA SILVA L, ISABEL DA SILVA A, PEIXOTO MAGALHÃES C, LOPES DE SOUZA S, MANHÃES DE CASTRO R. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. **Behavioural Processes.** v..86, p: 119-124. 2011.

OROZCO-SOLIS R, LOPES DE SOUZA S, BARBOSA MATOS RJ, GRIT I, LE BLOCH J, NGUYEN P, MANHAES DE CASTRO R AND BOLANOS-JIMENEZ F. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. **Physiol Behav.** v. 96, p: 481-492. 2009.

OROZCO-SOLIS R, BARBOSA MATOS RJ, GUZMAN-QUEVEDO, LOPES DE SOUZA, BIHOUEE A, HOULGATTE R, MANHÃES DE CASTRO R, BOLANOS-JIMENEZ F. Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus. **PLoS One.** v. 5, n.10. 2010.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain. 6° Edição. Elsevier, 1998.

PEROUTKA SJ. Pharmacological differentiation and characterization of 5-HT1A, 5-HT1B, and 5-HT1C binding sites in rat frontal cortex. **J Neurochem.** v.47, n.2, p: 529–40. 1986.

POCAI A. Action and therapeutic potential of oxyntomodulin. **Mol Metab.** 2014.

PÔRTO LCJ, SARDINHA FLC, TELLES MM, GUIMARAES RB, ALBUQUERQUE KT, ANDRADE IS, OYAMA LM, NASCIMENTO CMO, SANTOS OFP, RIBEIRO EB. Impairment of the serotonergic control of feeding in adult female rats exposed to intra-uterine malnutrition. **British Journal of Nutrition.** v. 101, p: 1255–1261. 2009.

PRATT WE, BLACKSTONE K. CONNOLLY ME, SKELLY MJ. Selective serotonin receptor stimulation of the medial nucleus accumbens causes differential effects on food intake and locomotion. **Behavioral Neuroscience.** v.23, n. 5, p: 1046–1057. 2009.

RAPKIN AJ, AKOPIANS AL. Pathophysiology of premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder. **Menopause Int.** v.8, p: 52–9. 2012.

RAVELLI AC, VAN DER MEULEN JH, OSMOND C, BARKER DJ, BLEKER OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. **Am J Clin Nutr.** v.70, p: 811-6. 1999.

REPPUCCI CJ, PETROVICH GD. Organization of connections between the amygdala, medial prefrontal cortex, and lateral hypothalamus: a single and double retrograde tracing study in rats. **Brain Struct Funct.** 2015.

ROWLAND NE, CARLTON J. Neurobiology of an anorectic drug: fenfluramine. **Prog Neurobiol.** v.27, p: 13-62. 1986.

SAPER CB, Stornetta RL. Central autonomic system. In: Paxinos G, editor. The Rat Nervous System. San Diego, CA. **Elsevier.** p:629–673. 2014.

SCHREIBER R E DE VRY J. Role of 5-HT_{2C} receptors in the hypophagic effect of m-CPP, ORG 37684 and CP-94,253 in thimone rat. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.** v.26, p: 441– 449. 2002.

SCHWARTZ MW, WOODS SC, PORTE D JR, SEELEY RJ, BASKIN DG. Central nervous system control of food intake. **Nature.** v. 404, n. 6778, p: 661-71. 2000.

SOHN JW, ELMQUIST JK AND WILLIAMS KW. Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolismo. **Trends Neuroscience,** v.36, p: 504-512. 2013.

SOUSA N, ALMEIDA OF: Disconnection and reconnection: the morphological basis of (mal) adaptation to stress. **Trends Neurosci.** v. 3, p: 742–751. 2012.

SOTRES-BAYON F, SIERRA-MERCADO D, PARDILLA-DELGADO E, QUIRK GJ. Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. **Neuron.** v.76, p: 804–812. 2012.

STANLEY BG, DAVID H, SCHWARTZ T, HERNANDEZ L, SARAH F. LEIBOWITZ, BARTLEY G. Hoebelt patterns of extracellular 5-hydroxyindoleacetic acid (5-hiaa) In the paraventricular hypothalamus (pvn): relation to circadian rhythm And deprivation-induced Eating behavior. **Pharmacology Biochemistry & Behavior.** v. 33, p: 257-260. 1989.

STANNER SA, BULMER K, ANDRES C, LANTSEVA OE, BORODINA V, POTEEN VV, ET AL. Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. **BMJ.** v.315, p: 1342-8.1997.

SWANSON LW, PETROVICH GD. What is the amygdala? **Trends Neurosci.** v.21, p: 323–331. 1998.

SYMONDS ME, SEBERT SP, HYATT MA, BUDGE H. Nutritional programming of the metabolic syndrome. **Nat Rev Endocrinol.** v.5, p: 604–10. 2009.

THOMPSON RH, SWANSON LW. Structural characterization of a hypothalamic visceromotor pattern generator network. **Brain Res. Rev.** v.41, p: 53–202. 2003.

TOSCANO AE, MANHAES-DE-CASTRO R, CANON F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition.** v.24, n.3, p: 270-8. 2008.

TOTH ZE, GALLATZ K, FODOR M, PALKOVITS M. Decussations of the descending paraventricular pathways to the brainstem and spinal cord autonomic centers. **J. Comp. Neurol.** v.414, p: 255–266. 1999.

TOUZANI K, BODNAR RJ, SCLAFANI A. Dopamine D1-like receptor antagonism in amygdala impairs the acquisition of glucose-conditioned flavor preference in rats. **EJN** v. 30, n.2, p:289–98. 2009.

TOUZANI K, SCLAFANI A. Critical role of amygdala in flavor but not taste preference learning in rats. **EJN**. v.22, n.7, p: 1767–74. 2005.

TRAVERS JB, TRAVERS SP, NORGREN R. Gustatory neural processing in the hindbrain. **Annu Rev Neurosci**. v.10, p: 595–632. 1987.

TSCHOOP M, SMILEY DL, HEIMAN ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**. v.407, p: 908–13. 2000.

TURTON MD, O'SHEA D, GUNN I, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. **Nature**. v.379, p: 69–72. 1996.

VARELA L AND HORVATH TL (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. **EMBRO Rep**. v.13, p: 1079-1086. 2012.

VICENTE LL, DE MOURA EG, LISBOA PC, MONTE ALTO COSTA A, AMADEU T, MANDARIM-DE-LACERDA CA, PASSOS MC. Malnutrition during lactation in rats is associated with higher expression of leptin receptor in the pituitary of adult offspring. **Nutrition**. v. 20, n. 10, p: 924-8. 2004.

VRANG N, LARSEN P, CLAUSEN JT, KRISTENSEN P. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. **J. Neurosci**. v.19, p: 1–8. 1999.

WANG N, WANG X, HAN B, LI Q, CHEN Y, ZHU C, CHEN Y, XIA F, CANG Z, ZHU C, LU M, MENG Y, CHEN C, LIN D, WANG B, JENSEN MD, LU Y. Is exposure to famine in childhood and economic development in adulthood associated with diabetes? **J Clin Endocrinol Metab**. v.100, n.12, p: 4514-23. 2015.

WILECKI M, LIGHTFOOT JW, SUSOY V, SOMMER RJ. Predatory feeding behaviour in *Pristionchus* nematodes is dependent on a phenotypic plasticity and induced by serotonin. **Journal of Experimental Biology**. v.218, p:1306-13. 2015.

WILLESEN MG, KRISTENSEN P, RØMER J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. **Neuroendocrinology**. v.70, p: 306–16. 1999.

WINICK M, NOBLE A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **J Nutr**, v.89, n.3, Jul, p: 300-6. 1966.

WREN AM, SMALL CJ, ABBOTT CR, DHILLO WS, SEAL LJ, COHEM MA, BATTEHRAM RL, TAHERI S, STANLEY SA, GHATEI MA, BLOOM SR. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. **Diabetes**. v.50, p: 2540–7. 2001.

WOODS SC, D'ALESSIO DA. Central control of body weight and appetite. **J. Clin. Endocrinol. Metab**. v.93, p: S37-S50. 2008.

WU Q, CLARK MS, PALMITER RD. Deciphering a neuronal circuit that mediates appetite. **Nature**. v.483, p: 594–597. 2012.

WUNDERLICH L, DAYAN P, DOLAN RJ: Mapping value based planning and extensively trained choice in the human brain. **Nat Neurosci**. v.15, p: 786–791. 2012.

WYNNE K, PARK AJ, SMALL CJ ET AL. Subcutaneous oxyntomodulin reduces body weight in overweight and obese subjects: a doubleblind, randomized, controlled trial. **Diabetes**. v.54, p: 2390–2395. 2005.

XIA Y, DRISCOLL JR, WILBRECHT L, MARGOLIS EB, FIELDS HL, HJELMSTAD GO. Nucleus accumbens medium spiny neurons target non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. **J. Neurosci**. v.31, p: 7811–7816. 2011.

YOON YR, JA-HYUN BAIK. Melanocortin 4 Receptor and Dopamine D2 Receptor Expression in Brain Areas Involved in Food Intake. **Endocrinol Metab**. v. 30, p: 576-583. 2015

YIN HH, KNOWLTON BJ, BALLEINE BW: Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. **Eur J Neurosci**. v.19, p: 181–189. 2004.

ZHUANG X, GROSS C, SANTARELLI L, COMPAN V, TRILLAT AC, HEN R. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT1A or 5-HT1B receptors. **Neuropsychopharmacology**. v. 21, p: 52–60. 1999.

ZOHAR I, SHOHAM S, WEINSTOCK M. Perinatal citalopram does not prevent the effect of prenatal stress on anxiety, depressive-like behaviour and serotonergic transmission in adult rat offspring. **Eur J Neurosci**. 2015

APÊNDICE 1**Effect of Perinatal Protein Malnutrition Under Serotonergic Control on Feeding Behavior: A Systematic Review**

Effect of Perinatal Protein Malnutrition Under Serotonergic Control on Feeding Behavior: A Systematic Review

Rafael Danyllo da Silva Miguel^{1, *}, Lisiane dos Santos Oliveira², Sandra Lopes de Souza³

¹The Program in Neuroscience and Behavioral Sciences of Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

²Academic Center of Vitoria of Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil

³Department of Anatomy of Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Email address:

r-danyllo@hotmail.com (R. D. da S. Miguel)

To cite this article:

Rafael Danyllo da Silva Miguel, Lisiane dos Santos Oliveira, Sandra Lopes de Souza. Effect of Perinatal Protein Malnutrition Under Serotonergic Control on Feeding Behavior: A Systematic Review. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*.

Vol. x, No. x, 2015, pp. x-x. doi: 10.11648/j.xxx.xxxxxxxx.xx

Abstract: Protein malnutrition during the perinatal period leads to several morphological and physiological changes in the central nervous system whose main purpose is to prepare the body for environmental conditions. Several studies have been developed to explain the effects that malnutrition causes over feeding behavior in adults, and in particular on the role of the serotonergic system in this control. Thus, the objective of this systematic review was to assess emerging literature on the effects of perinatal malnutrition on the control of feeding behavior and the role of the serotonergic system in this control. The articles were researched in the virtual libraries Pubmed, Lilacs and Medline using as keywords: "Protein Malnutrition", "Feeding Behavior", "Serotonin Receptors", "Gestational malnutrition", "Perinatal undernutrition", "Fetal Nutrition Disorders" and "Serotonin". 261 articles in total were found. However, after excluding duplicates and analysis of the criteria for inclusion and exclusion 8 articles remained. Analysis of the articles showed that malnutrition in the perinatal period leads to changes in food preference in rats, in addition to delaying the point of satiety of these animals. It was also found that there is increased protein expression of c-fos groups forebrain neurons, increased expression of 5HT-1A receptors and increase in brain serotonin levels. These findings suggest that changes in eating behavior in malnourished animals can be brought about due to changes in the serotonergic system.

Keywords: Serotonin, Feeding Behavior, Protein Malnutrition

1. Introduction

Early in the life of mammals, there are phases in which intense physiological and structural changes in the nervous system occur, such as neurogenesis, synaptogenesis, and cell migration [1-3]. These phases have been termed critical periods of development [4]. The lack of nutrients during critical periods can promote the development of various types of diseases in the adult individual [5-7]. The main critical periods of development are the period of pregnancy and lactation [3,8].

Studies to identify morphological and physiological changes in adulthood, resulting from assaults during the

critical period, found an increase in the incidence of diabetes type II [6], increased visceral adiposity [9], hyperphagia, increased body weight, preference for palatable and high-fat diets, among others [10-12]. Furthermore, malnutrition during pregnancy or during lactation still entail changes in the serotonergic system, such as desensitization of 5HT-1B receptors and increased basal levels of brain serotonin, causing behavioral changes, which highlight the feeding behavior [7,13].

Feeding behavior is a complex mechanism that involves both central and peripheral stimuli that regulate hunger and satiety [14]. Among the various biomolecules that regulate feeding behavior [15], we can highlight some

neurotransmitters such as some catecholamines [16-17], serotonin [18-19], Neuropeptide Y (NPY), a peptide related to Agouti (AgRP), Pro-opiomelanocortin (POMC) and Transcript Related to Cocaine and Amphetamine (CART) [20-24]. The different signals from different parts of the body are integrated into the central nervous system at the level of the hypothalamus and brainstem [25-27].

In recent years, several new studies have been conducted in order to associate malnutrition during perinatal period with changes in feeding behavior due to damage to the serotonergic system. Therefore, this study aimed to verify that association through a systematic search investigating the publications of the last five years.

2. Method

This study deals with a systematic review of the literature. To this end, we selected original articles published in the last five years. The selection of items was held between October 18, 2014 until June 8, 2015 in the virtual libraries Pubmed, Scielo and Medline. The descriptors used were "Protein Malnutrition", "Feeding Behavior", "Serotonin Receptors", "Gestational malnutrition", "Perinatal undernutrition", "Fetal Nutrition Disorders" and "Serotonin".

Among all the articles found, all original ones that correlated malnutrition in the perinatal period with changes in feeding behavior and / or the central serotonergic system published in Portuguese, English or Spanish were included. As the exclusion criteria, we used review articles such as those articles that were published over five years ago and all articles published in languages other than Portuguese, English and Spanish. After application of exclusion and inclusion criteria, the remaining articles were arranged alphabetically for deletion of duplicates and analysis of the main results.

3. Results

A total of 261 articles were found and distributed in the surveyed virtual libraries, 224 in Pubmed, 7 in Scielo and 30 in Medline. After applying the exclusion criteria and duplications found, eight articles remained. The steps of the review follow in Figure 1.

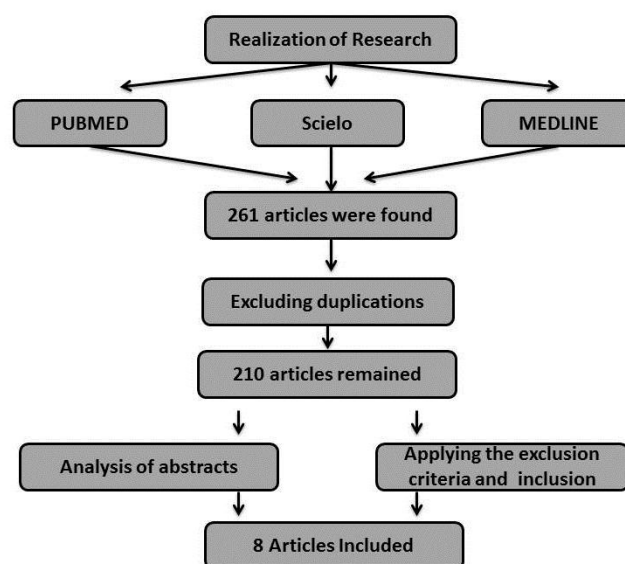


Figure 1. Flowchart illustrating the steps of review.

Table 1 shows the relationship between the set of words used with the number of articles found by the virtual library.

Table 1. Relations between the keywords used and the number of articles obtained by virtual library.

	PUBMED	Scielo	Medline	Total
Protein Malnutrition and Feeding Behavior	93	4	15	107
Protein Malnutrition and Serotonin Receptors	2	0	0	2
Feeding Behavior and serotonin receptors	99	3	1	95
Gestational malnutrition and Feeding Behavior	15	0	8	23
Perinatal undernutrition and Feeding Behavior	12	0	3	15
Fetal Nutrition Disorders and serotonin	3	0	3	6
TOTAL	224	7	30	261
TOTAL After duplications				210
TOTAL after the exclusion criteria				8

The types of malnutrition used were protein or caloric. Among the eight selected articles, six used the rat as experimental animal, another used a mouse and the last one used sheep. Among the six articles that have been performed in rats, the diets used to promote perinatal protein malnutrition showed variation in the concentration of casein. Thus, the control diet in two studies showed 17% casein and test diet was formulated with 8%. An article used 20% and 8% and another article used 22% and 0% casein to the test and control groups respectively. The two other articles used as malnutrition model a food restriction of 50%. This same pattern of 50% was applied to the study of sheep and another pattern of malnutrition under 40% of the reference consumed by the control group was used in the article that worked with

mice. Articles found, the diets used, their respective objectives and key results are summarized in Table 2.

Table 2. Main relevant aspects of the articles analyzed.

Authors	Kind	Goals	Type of malnutrition / period	Main Results
Orozco-Solis et al., 2009	Rats	Analyze the feeding behavior of malnourished rats in the perinatal period	Protein malnutrition. Diet with 20% casein for the control group and 8% for the malnourished rats in the perinatal period.	During the first weeks after weaning malnourished pups had higher food consumption than the control group. Furthermore, it was found that malnourished animals had an increase in the size of meals and not increasing the number of meals.
Manjarrez-Gutiérrez et al., 2012	Rats	Check that intrauterine malnutrition can alter the tryptophan hydroxylase I and II expression to explain the accelerated serotonin synthesis seen in malnourished animals.	Calorie malnutrition. Standard diet for rats was administered in the control group and other diet with 50% of the standard nutrient was administered in the malnourished group	The intrauterine malnutrition increases the trunk brain serotonin levels such as increased expression of tryptophan hydroxylase I and reduces the expression of tryptophan-hydroxylase II.
da Silva et al., 2013	Rats	Analyze the effects of protein malnutrition in the period of pregnancy and lactation on neurobiological mechanisms of food reward.	Diet with 17% casein for the control group and 8% for the malnourished group.	The protein malnutrition increases motivation for food reward and increases the protein expression of c-Fos in neurons in the basolateral amygdala and core, putamen, caudate nucleus, and dorsomedial nucleus of the hypothalamus.
Lira et al., 2014	Rats	Analyze the effects of perinatal malnutrition on the activation of the nucleus of the solitary tract in rats in response to food stimulation.	Diet with 17% casein for the control group and 8% for the malnourished group.	Animals that have suffered perinatal malnutrition had higher feed intake and increased activation of NTS in response to food stimuli
Rocha et al., 2014	Rats	Study the system ARC, PVN, and during NPY development of hypothalamic nuclei	Diet with 22% protein for the control group and 0% for the malnourished animals.	Protein malnutrition causes a delay in the distribution of NPY in the arcuate paraventricular-administration in rats.
Manuel-Apolina et al., 2014	Rats	Analyze the effects of intrauterine malnutrition on the expression of 5HT-1A receptors, D1 and D2, and Ob-Rb	Standard diet for rats was administered in the control group and other diet with 50% of the standard nutrient was administered in the malnourished group	An increase in the expression of 5HT-1A receptor and D2 on day 14, and Ob-Rb on day 14 and 90. There was a decrease in D1 receptor expression in the hypothalamic nuclei on the 14th day and increased on the 90th day.
Avraham et al., 2010	Mice	Examine whether supplementation with fish oil better morbidity and mortality associated with malnutrition and normalize endocannabinoids and monoaminergic systems involved in satiety and cognitive function in the hypothalamus and hippocampus	Standard diet to mice was administered in the control group and other diet with 40% of the standard nutrient was administered in the malnourished group	The fish oil supplement with increased lifetime and reduced cognitive decline in animals. In addition, it increased the levels of expression of genes for serotonin and dopamine in the malnourished group.
Nielsen et al., 2013	Sheep	Check that malnutrition in late pregnancy program to increase appetite and preference for high-fat foods in postnatal life.	Food standard (commercial plus) for the control group and sheep for the group test another diet with 50% of the standard diet of nutrients.	Malnourished sheep exhibit hyperphagia and preference for fatty and caloric foods.

4. Discussions

Several previous studies have correlated malnutrition in the perinatal period with permanent changes in different regions of the nervous system. The main findings suggest that malnourished animals show changes in the normal synthesis of serotonin and the identification of the biomolecule by their respective receptors [1, 18, 28]. Thus, the behavior in general, reflects the damage, whose principal behaviors affected are

aggression [29], learning [30] and feeding behavior [13]. Feeding behavior is the result of interactions influenced by various central and peripheral stimuli that govern the search for food and hunger and satiety mechanisms [14]. This systematic review strengthens the literature, intensifying the hypothesis that the changes found in feeding behavior in early malnourished animals are due to changes in the serotonergic system.

Experimental studies with behavioral sequence of satiety in malnourished animals in the perinatal period have shown

changes in eating behavior in adulthood, which led to increasing the size of the meal [7, 31]. The analysis of graphs of behavioral satiety sequence showed that malnourished animals showed a delay in satiety point, which consequently leads these animals to consume more food [7, 31], as shown in Figure 1. Similar results to these can be found in other previous studies, which have also undergone animals to protein malnutrition and found this delay in satiety [32-34].

Besides increasing the size of the meals, it was also observed that the protein malnutrition in the perinatal period leads to increased motivation for food reward and preference for palatable and rich-in-fat diets, in which these findings were observed in rats and sheep [9, 30]. The hedonic control of feeding behavior is regulated by different brain areas, such as the limbic system [35], cingulate and orbitofrontal cortex, mainly mediated by dopamine [36] and Serotonin [37]. Among these brain structures, the amygdala, caudate nucleus and the hypothalamus are involved in particular events related to the search for food reward. Therefore, besides investigating the motivation palatable food, da Silva and colleagues (2013) investigated the neuronal activation of undernourished rats in

response to palatable food stimulus [30]. As a result, they observed increased neuronal activation in the basolateral amygdala and central core, putamen, caudate, and dorsomedial nucleus of the hypothalamus. These data seem to be in accordance with modifications of the motivation for palatable food intake.

Once the behavioral changes involved in food and food reward search may be triggered mainly by molecular modifications of dopaminergic and serotonergic pathways, it was found that in malnourished animals there was an increase in gene expression for the 5HT-1A receptor such as an increase in serotonin levels and tryptophan hydroxylase I [28,38]. The 5HT-1A receptors are important receptors in satiety mechanism [39]. Studies show that stimulation of these receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus reduces appetite, leading to satiety [18]. An increase of the number of these receptors associated with increased serotonin levels found suggests that there was a desensitization of the 5HT-1A receptors, since these animals showed a delay in satiety point [13].

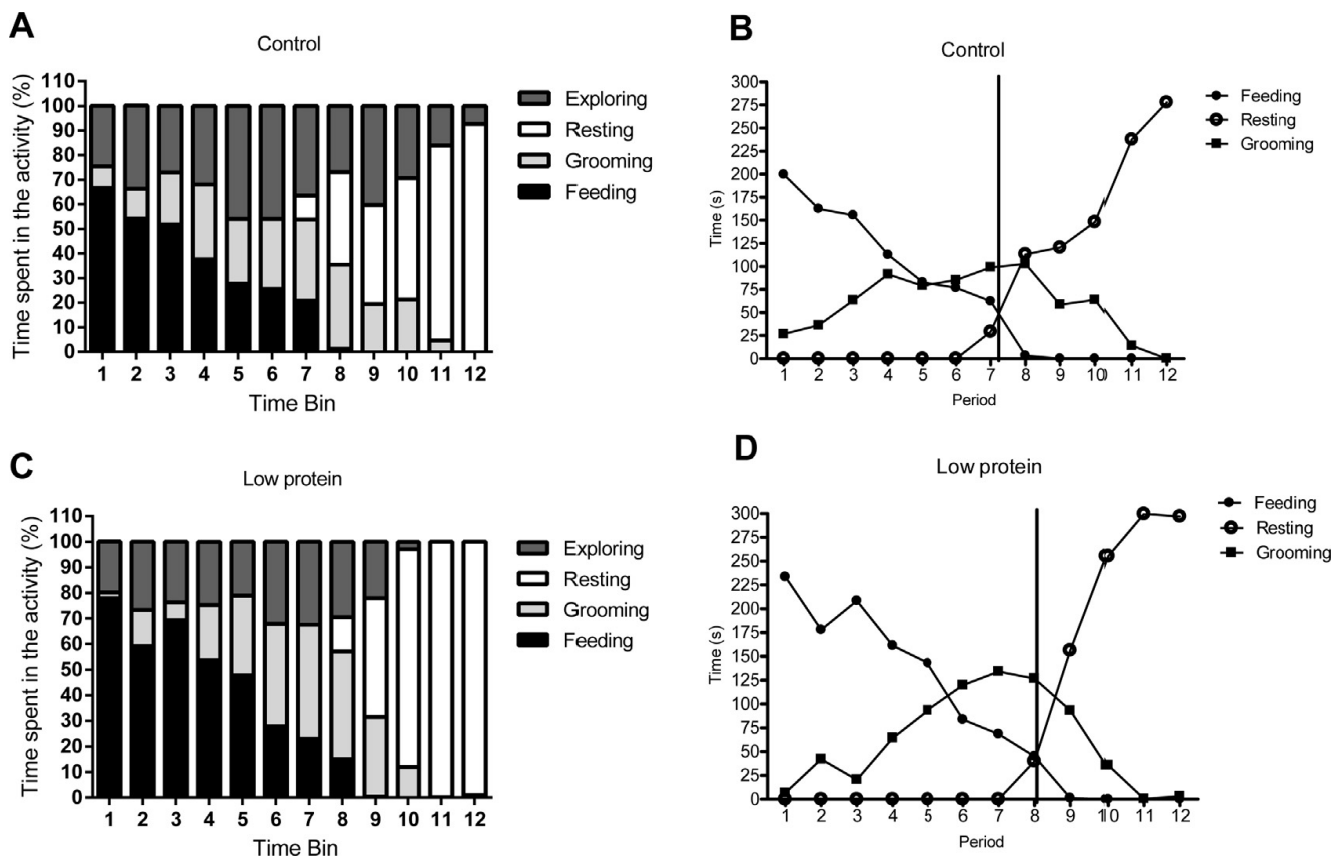


Figure 2. Sequence of behavioral satiety in animals for 150 days old, subjected to perinatal malnutrition. (A) and (C) Power-supply frequency is not conduct in each period (5 min / period). (B) and (D) graphics that illustrate the crossing point between feeding behavior and rest. The vertical line indicates the point of satiety. (Lira, Almeida et al., 2014).

Among the various biomolecules related to feeding behavior, there is Neuropeptide Y. Rocha *et al* (2014) verified that total protein malnutrition in the perinatal period leads in delayed maturation of the path of the arcuate NPY to the paraventricular nucleus, although it has not been consolidated the consequences of this event on feeding behavior [43]. This neuropeptide is synthesized mainly by neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. These neurons, when stimulated, cause starvation in animals [40]. An important receptor for regulating the release mechanism of NPY is the 5HT-1B receptor, which inhibits their synthesis. It is a presynaptic receptor expressed in various regions of the central nervous system, such as the hippocampus, cingulate gyrus, raphe nuclei and hypothalamic regions that govern feeding behavior, such as the paraventricular and ventromedial nucleus.

Another area affected by protein malnutrition in the perinatal period and that is also related to feeding behavior was the Nucleus of the Solitary Tract. It was verified that the NTS shows more activity in response to food in malnourished animals compared to the control group [31]. The NTS neurons receive information through various biomolecules and send dense projections to the lateral hypothalamus, taking action similar to electrical stimulation of the paraventricular nucleus of the hypothalamus [41-42]. It is noteworthy that the NTS receives afferents both from the gustatory pathways and from gastrointestinal neural pathways, which shows its importance in feeding behavior.

The damage that malnutrition causes in the serotonergic system, besides directly affecting the feeding behavior, causes impairment in memory mechanisms behavior [30]. This study verified through a food-motivational test that malnutrition interferes with the reward once the animal has a delay in storing the location of palatable food. This may happen due to the fact that malnutrition early in life affects the hippocampal formation [30]. Knowing that cognitive decline, Avraham *et al* (2010) developed a study with the purpose to check if the use of fish oil could reduce cognitive decline and normalize satiety signals evoked by serotonin and dopamine that malnourished mice present [44]. Therewith, it was found that the use of this oil not only reduces the cognitive decline and normalizes satiety signals but also increases the lifetime of animals. These findings,

among others found in this review, deserve special mention because it suggests that some of the effects observed due to malnutrition in the perinatal period can be mitigated.

5. Conclusions

Protein malnutrition in the perinatal period can promote changes in the control mechanisms of feeding behavior, including the serotonergic control. Such damage may involve hypothalamic nuclei, nucleus of the solitary tract, striatum, hippocampus, including other brain areas. Malnourished animals in the perinatal period have a higher consumption of pattern diet and increased motivation for food reward.

References

- [1] Morgane PJ, Austin-Lafrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993; 17 (1): 91-128.
- [2] Dobbing J. The Influence of Early Nutrition on the Development and Myelination of the Brain. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1964; 159:503-9.
- [3] Winick M, Rosso P, Brasel JA. Malnutrition and cellular growth in the brain. *Bibl Nutr Dieta.* 1972;(17):60-8.
- [4] Matsui F, Morimoto M, Yoshimoto K, Nakatomi Y, Syoji H, Nishimura A, Isoda K, Tanda K, Hosoi H. Effects of stress of postnatal development on corticosterone, serotonin and behavioral changes. *Brain Dev.* 2009.
- [5] Ravelli GP, Stein AZ, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976; 295 (7): 349-53.
- [6] Hale CN and Barker D J. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 2001; 60: 5-20.
- [7] Orozco-Solis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, Manhaes de Castro R and Bolanos-Jimenez F. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav.* 2009; 96:481-492.
- [8] Kikusui T, Kiyokawa Y, Moti Y. Deprivation of mother-pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. *Brain Research.* 2007; 1133: 115-122.

- [9] Nielsen MO, Kogsted AH, Thygesen MP, Strathe AB, Caddy S, Quistorff B, Jorgensen W, Christensen VG, Husted S, Chwalibog A, Sejrsen K, Purup S, Svalastoga E, McEvoy FJ, Johnsen L. Late gestacion undernutrition can predispose for visceral adiposity by altering fat distribution patterns and increasing the preference for a high-fat diet in early postnatal life. *Br J Nutri.* 2013; 109 (11): 2098-110
- [10] Vicente LL, De Moura EG, Lisboa PC, Monte Alto Costa A, Amadeu T, Mandarim-de-Lacerda CA, Passos MC. Malnutrition during lactation in rats is associated with higher expression of leptin receptor in the pituitary of adult offspring. *Nutrition.* 2004; 20(10): 924-8
- [11] Lisboa PC, Fagundes AT, et al. Neonatal low-protein diet changes deiodinase activities and pituitary TSH response to TRH in adult rats. *Exp Biol Med* (Maywood). 2008; 233 (1): 57-63.
- [12] Erhuma A, Bellinger L, Langley-Evans SC, Bennett AJ. Prenatal exposure to undernutrition and programming of responses to high-fat feeding in the rat. *Br J Nutr.* 2007; 98, 517-524.
- [13] Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *European Journal of Neuroscience.* 2008; 27: 1400–1408.
- [14] Nagase H, Nakajima A. Regulation of feeding behavior, gastric emptying, and sympathetic nerve activity to interscapular brown adipose tissue by galanin and enterostatin: the involvement of vagal-central nervous system interactions. *Journal Gastroenterol.* 2002; 37:118-27.
- [15] Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008; 18 (2): 158-68.
- [16] Wellman PJ, Miller DK, Ho DH. Noradrenergic modulation of ephedrine-induced hypophagia. *Synapse.* 2003; 48 (1):18-24.
- [17] Maidel S, Lucinda AM, de Aquino VW, Faria MS, Paschoalini MA.. The adrenaline microinjection into the median raphe nucleus induced hypophagic effect in rats submitted to food restriction regimen. *Neurosci Lett.* 2007; 422 (2): 123-7.
- [18] Lopez-Alonso VE, Mancilla-Diaz JM, Rito-Domingo M, González-Hernández B, Escartín-Pérez RE.. The effects of 5-HT1A and 5-HT2C receptor agonists on behavioral satiety sequence in rats. *Neurosci Lett.* 2007; 416 (3): 285-8.
- [19] Tanaka M e Kido Y. Serotonergic regulation of galanin-induced selective macronutrient intake in self-selecting rats. *J Med Invest.* 2008;55 (3):196-203.
- [20] Ramos EJ, Meguid MM, Campos AC, Coelho JC. Neuropeptide Y, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and monoamines in food intake regulation. *Nutrition.* 2005 ; 21(2) : 269-79.
- [21] Mahaut SY. Dumont, Fournier A, Quirion R, Moysse E. Neuropeptide Y receptor subtypes in the dorsal vagal complex under acute feeding adaptation in the adult rat. *Neuropeptides.* 2010 ; 44 (2) :77-86.
- [22] Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Tanaka T, Furuta M, Araki-Sasaki R, Hori Y, Nakatani K, Yano Y, Adachi Y. Plasma levels of agouti-related protein are increased in obese men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86 (5):1921-4.
- [23] Aja, S.S., Ladenheim, E.E., Schwartz, G.J., Moran, T.H. (2001). Intracerebroventricular CART peptide reduces food intake and alters motor behavior at a hindbrain site. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281 (6), 862-7.
- [24] Millington, G. W. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutr Metab (Lond).* 2007 ; 4.
- [25] Blevins JE, Baskin DG. Hypothalamic-brainstem circuits controlling eating. *Forum Nutr.* 2010; 63:133-40.
- [26] Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG. Peptide signals regulating food intake and energy homeostasis. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002; 80 (5): 396-406.
- [27] Funahashi H, Takenoya F, Guan JL, Kageyama H, Yada T, Shioda S. Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. *Anat Sci Int.* 2003;78 (3): 123-38.
- [28] Manjarrez-Gutierrez G, Martinez-Radilla K, Boyzo-Montes de Oca A, Orozco Suárez S, Hernández-Rodríguez J. Increased expression of tryptophan-5-hydroxylase 1, but not 2, in brainstem as a result of intrauterine malnutrition. *Int J Dev Neurosci.*2012; 30 (6): 445-50.
- [29] Coccaro EF, Fanning JR, Phan KL, Lee R. Serotonin and impulsive aggression. *CNS Spectrum.*v. 20, p.295-302, 2015.
- [30] Da Silva AA, Borba TK, de Almeida Lira L, Cavalcante TC, de Freitas MF, Leandro CG, do Nascimento E, de Souza SL. Perinatal undernutrition stimulates seeking food reward. *Int J Dev Neurosci.* 2013; 31 (5): 334-41.
- [31] Lira LA, Almeida LC, da Silva AA, Cavalcante TC, de Melo DD, de Souza JA, Campina RC, de Souza SL. Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. *Int J Dev Neurosci.* 2014; 38: 23-9.
- [32] Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL & Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000; 279: 83–87.
- [33] Bellinger L, Sculley DV & Langley-Evans SC. Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. *Int. J. Obes.* 2006; 30: 729–738.
- [34] Desai M, Gayle D, Babu J & Ross MG. Programmed

- obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005; 288:91-96.
- [35] Berridge KC, Kringelbach ML. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology.* 2008; 199 (3), 457–480.
- [36] Barbano, M.F., Le Saux M., Cador, M. (2009) Involvement of dopamine and opioids in the motivation to eat: influence of palatability, homeostatic state, and behavioral paradigms. *Psychopharmacology.* 203 (3), 475–487
- [37] Pratt WE, Blackstone K, Connolly ME, Skelly MJ. Selective serotonin receptor stimulation of the medial nucleus accumbens causes differential effects on food intake and locomotion. *Behavioral Neuroscience.* 2009; 123 (5): 1046–1057
- [38] Manuel-Apolina L, Rocha L, Damasio L, Tesoro-Cruz E, Zarate A. Role of prenatal undernutrition in the expression of serotonin, dopamine and leptin receptors in adult mice: Implications of food intake. *Mol Med Rep.* 2014; 9 (2): 407-12.
- [39] De Vry J, Schreiber R. Effects of selected serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24:341–53.
- [40] Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484.
- [41] Leibowitz SF, Alexander JT. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol Psychiatry.* 1998; 44: 851–864.
- [42] Rogers RC, Hermann GE. Vagal afferent stimulation-evoked gastric secretion suppressed by paraventricular nucleus lesion. *J Auton Nerv Syst.* 1985; 13: 191–199
- [43] Rocha MLM, Fernandes PP, Loyufo BM, Manhães AC, Barradas PC, Tenório F. Undernutrition during early life alters neuropeptide y distribution along the arcuate/paraventricular pathway. *Neuroscience.* 2014, 379-391.
- [44] Avraham, Y., Saidian, M., Burston, J.J., Mevorach, R., Vorobiev, L., Magen, I., Kunkes, E., Borges, B., Lichtman, A.H., Berry, E.M. (2010). Fish oil Promotes survival and protects against cognitive decline in severely undernourished mice by normalizing satiety signals. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 22, 766-76.