

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
DOUTORADO EM BASES EXPERIMENTAIS DA NUTRIÇÃO**

**ESTUDO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NO HIPOTÁLAMO E TRONCO
ENCEFÁLICO DE ANIMAIS JOVENS SUBMETIDOS A FLUOXETINA NEONATAL.**

ISABELI LINS PINHEIRO

RECIFE – 2017

ISABELI LINS PINHEIRO

**ESTUDO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NO HIPOTÁLAMO E TRONCO
ENCEFÁLICO DE ANIMAIS JOVENS SUBMETIDOS A FLUOXETINA NEONATAL**

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

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Sandra Lopes de Souza
Co-Orientador (a): Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

RECIFE – 2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

P654e Pinheiro, Isabeli Lins.
Estudo do sistema serotoninérgico no hipotálamo e tronco encefálico de animais jovens submetidos a fluoxetina neonatal / Isabeli Lins Pinheiro. – 2017.
131 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Sandra Lopes de Souza.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2017.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Serotonina. 2. Inibidores da captação de serotonina. 3. Proteínas da membrana plasmática de transporte de serotonina. 4. Ingestão alimentar. I. Souza, Sandra Lopes de (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-154)

ISABELI LINS PINHEIRO

**ESTUDO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NO HIPOTÁLAMO E TRONCO
ENCEFÁLICO DE ANIMAIS JOVENS SUBMETIDOS A FLUOXETINA NEONATAL.**

Tese aprovada em 13/03/2017

Prof. Dr. Omar Guzman Quevedo

**Facultad de Químico-Farmacologia/ Universidad Michoacana de San Nicolás
de Hidalgo Morelia- México**

Profª Drª Amanda Alves Marcelino da Silva

Colegiado de Enfermagem/ UPE

Profª Drª Kelli Nogueira Ferraz Pereira Althoff

Centro Acadêmico de Vitória / UFPE

Profª Drª Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro

Centro Acadêmico de Vitória / UFPE

Profª Drª Sandra Lopes de Sousa

Departamento de Anatomia/ UFPE

RECIFE

2017

*Aos meus pais e meu irmão, meus exemplos de amor. Sem eles, meus sonhos
jamais se tornariam realidade.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu força para lutar e me trouxe luz e amor para enxergar todas as coisas maravilhosas que a vida tem para nos oferecer. Gratidão por sua presença em meu coração, em minha vida.

Aos meus pais e meu irmão, que me ensinam todos os dias a importância da família. Talvez o agradecimento mais difícil de fazer. Meu olhar, mesmo que em silêncio, agradece à vocês todos os dias. A família é a nossa maior oportunidade de aprender sobre o amor, o respeito, a fé, o perdão e a vida. O aprendizado mais valioso. Gratidão por ser quem sou, graças à eles. Gratidão porque sou meu pai, sou minha mãe, sou meu irmão. Somos um.

À minha orientadora, Prof. Sandra Lopes por permitir o meu crescimento profissional, por acreditar no meu trabalho. Gratidão por seu apoio no meu concurso para professor, jamais esquecerei. Gratidão por seu conhecimento e sua atenção sempre.

Ao meu orientador, Prof. Raul Manhães, por compartilhar seu conhecimento, por me estimular a ir mais longe, por acreditar no meu trabalho. Gratidão pelas oportunidades que o senhor me deu.

Aos amigos do laboratório, Larissa, Lívia, Paula, Amanda, Renata, Juliet, Taisy, Matilde, Bruna, Fernanda, Paulinha, Gabriel, a ciência se faz em conjunto. Sem vocês, este trabalho não seria possível. Gratidão pelo apoio de todos vocês, este trabalho é nosso.

Às minhas amigas, que a vida profissional trouxe, Raquel, Kelli, Emília e Lígia, por nossas conversas, nossos cafés, nossas discussões científicas. Liginha, mesmo estando em outro país neste último ano, se fez tão presente sempre. Obrigada por nossas conversas no whatsapp (na minha madrugada e tua tarde), por todo o conhecimento, por todo o auxílio. Gratidão por todos os momentos juntas.

Às minhas amigas-irmãs, Helena, Margarida e Pedrita, por compartilhar tantos momentos. Os amigos são nossa verdadeira riqueza. Sou rica. Gratidão por ter vocês na minha vida.

À minha família Lins Pinheiro, meus tios, primos e agregados. E minha cunhada Lau, obrigada pelo auxílio. Gratidão.

Aos colaboradores científicos, Manoela Figueiroa, Rhowena Matos, Mariana Fernandes, Cândido Ferraz, Arthur Clarck, Viviane Nogueira, Monique de Assis, e ao querido estagiário Reginaldo. Gratidão pela disponibilidade e atenção na execução dos experimentos.

Aos companheiros do Dept. de Educação Física do CAV-UFPE, por todo o rendimento ao longo destes três anos de trabalho. Antônio, meu chefe, obrigada por sua compreensão e auxílio para que este sonho fosse real. Gratidão por ser professora junto à vocês.

Aos companheiros científicos do Grupo de pesquisa Nutrição, Atividade física e Plasticidade fenotípica. Gratidão pelas experiências vividas.

Ao LabDiMe, em especial a Prof. Marciane Milanski e Andressa Reginato, por sua acolhida na Unicamp e todo o auxílio para o desenvolvimento dos experimentos. Gratidão por esta experiência.

À PósNutri, Neci, Cecília e Professora Elizabeth por todo incentivo e auxílio nestes quatro anos. Gratidão.

Ao CNPQ e FACEPE, por financiarem meus experimentos. Obrigada.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: CURVA DE VELOCIDADE COMPARANDO RITMO, DURAÇÃO E TEMPO RELATIVOS DE PROCESSOS BIOLÓGICOS FUNDAMENTAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO ENCÉFALO DE HUMANOS E RATOS. ADAPTADO DE MORGANE <i>ET AL.</i> , 2002. (MORGANE <i>ET AL.</i> , 2002).....	18
FIGURA 2: BIOSÍNTESE DA SEROTONINA.....	22
FIGURA 3: LOCALIZAÇÃO DE GRUPOS DOS CORPOS CELULARES SEROTONINÉRGICOS EM SECÇÃO SAGITAL DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS E SUAS PRINCIPAIS PROJEÇÕES (CONSOLAZIONE, A. AND CUELLO, A. CNS SEROTONIN PATHWAYS. IN: THE BIOLOGY OF SEROTONERGIC TRANSMISSION. NEW YORK: JOHN WILEY & SONS, 1982, PP 29–61).....	25
FIGURA 4: MODELO DE SINAPSE SEROTONINÉRGICA.	29
FIGURA 5: ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DA RECAPTAÇÃO DA PROTEÍNA SERT NO MEIO INTRA E EXTRACELULAR DO NEURÔNIO.....	31
FIGURA 6: ESCALA DE TEMPO DA EXPRESSÃO DO SERT EM PRIMATAS/HUMANOS E ROEDORES (CAMUNDONGOS E RATOS) DURANTE O PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO EMBRIOGÊNICO E PÓS-NATAL. (HOMBERG <i>ET AL.</i> , 2010)	35
FIGURA 7: AÇÃO DA SEROTONINA NA VIA DAS MELANOCORTINAS (ADAPTADO HEISLER <i>ET AL.</i> , 2006).....	39
FIGURA 8: A) EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE A LACTAÇÃO SOBRE O PESO CORPORAL DE RATOS...	58
FIGURA 9: EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE A LACTAÇÃO SOBRE A INGESTÃO ALIMENTAR DE RATOS.....	59
FIGURA 10: EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE A LACTAÇÃO SOBRE A INGESTÃO ALIMENTAR APÓS JEJUM.....	60
FIGURA 11: EFEITO DA FLUOXETINA EM DOSE AGUDA SOBRE A INGESTÃO ALIMENTAR DE RATOS EXPOSTOS A FLUOXETINA DURANTE A LACTAÇÃO.....	61
FIGURA 12: EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE A LACTAÇÃO SOBRE CONTEÚDO PROTÉICO DE SEROTONINA NO HIPOTÁLAMO DE RATOS AOS 21 E 40 DIAS DE VIDA.....	62
FIGURA 13: EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE A LACTAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO SERT NO HIPOTÁLAMO DE RATOS.....	63
FIGURA 14: EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE A LACTAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO PROTÉICA DO SERT NO HIPOTÁLAMO DE RATOS.....	64
FIGURA 15: EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE A LACTAÇÃO SOBRE A QUANTIDADE DE NEURÔNIOS SERT-IR NO HIPOTÁLAMO DE RATOS AOS 75 DIAS DE VIDA....	65

FIGURA 16: EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE A LACTAÇÃO SOBRE A QUANTIDADE DE NEURÔNIOS SERT-IR NOS NÚCLEOS DA RAFE TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS AOS 75 DIAS DE VIDA.66

FIGURA 17: EFEITO DA EXPOSIÇÃO À FLUOXETINA DURANTE A LACTAÇÃO SOBRE A QUANTIDADE DE NEURÔNIOS SERT-IR NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO NO TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS AOS 75 DIAS DE VIDA.....67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviações	Português	Inglês
5-HT	5-Hidroxitriptamina	5-Hydroxytryptamine
5-HT _{1A}	Receptor 1A da Serotonina	5-HT _{1A} Receptor
5-HT _{1B}	Receptor 1B da Serotonina	5-HT _{1B} Receptor
5-HT _{1D}	Receptor 1D da Serotonina	5-HT _{1D} Receptor
5-HT _{2A}	Receptor 2A da Serotonina	5-HT _{2A} Receptor
5-HT _{2C}	Receptor 2C da Serotonina	5-HT _{2C} Receptor
AgRP	Proteína Relacionada ao Agouti	Agouti Related Protein
Arc	Núcleo Arqueado	Arcuate nucleus
BHE	Barreira Hemato Encefálica	Blood-brain barrier
CART	Transcrito regulado pela cocaine e anfetamina	Cocaine and amphetamine regulate transcribed
DAB	3-3diaminobenzidina	
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina	Selective Serotonin Reuptake Inhibitors
MAO	Monoamino oxidase	Monoamine oxidase
NPY	Neuropeptídeo Y	Neuropeptide Y
NTS	Núcleo do Trato Solitário	Nucleus Tractus Solitarius
POMC	Pró-opiomelanocortina	Proopiomelanocortin
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia	Polymerase Chain Reaction
SERT	Transportador da serotonina	Serotonin Transporter Solute carrier family 6
SLC6A4	---	neurotransmitter transporter serotonin member 4
SNC	Sistema Nervoso Central	Central Nervous System
TpH ₂	Triptofano Hidroxilase 2	Tryptophan Hydroxylase 2
VMH	Hipotálamo Ventromedial	Ventromedial Hypothalamus

RESUMO

O sistema serotoninérgico apresenta funções no controle de eventos biológicos fundamentais para o desenvolvimento adequado do sistema nervoso. A serotonina (5-HT) e o Transportador de Serotonina (SERT) são indispensáveis para este controle. A disponibilidade destes componentes é precisamente regulada durante o período crítico de desenvolvimento, e podem sofrer interferências providas do ambiente alterando sua ação sobre o sistema nervoso. Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina bloqueiam o SERT e promovem o aumento dos níveis extracelulares da 5-HT. A 5-HT está intimamente relacionada à ingestão alimentar, e parece ter uma relação inversa com o consumo energético, pois promove redução da ingestão alimentar por estimular a saciedade em ratos. Esta ação anorexígena da 5-HT exibe uma resistência quando requisitada por estímulos agudos, demonstrando que os animais desenvolvem adaptações de acordo com os estímulos ambientais sofridos no período de desenvolvimento. Este trabalho avaliou os efeitos da exposição à fluoxetina durante o período de lactação sobre parâmetros morfológicos e moleculares da serotonina e do transportador de serotonina, e seus efeitos sobre a ingestão alimentar de animais jovens. **Métodos:** Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a manipulação experimental, um grupo fluoxetina (F): filhotes machos que receberam aplicação de fluoxetina (10mg/kg, 10µl/g, s.c.) e um grupo controle (C): filhotes machos receberam aplicação de salina (NaCl 0.9%, 10µl/g, s.c), ambos durante toda a lactação (1º ao 21º dia de vida). Foram avaliados o peso corporal durante a lactação e aos 40 dias, ingestão alimentar e sequência comportamental da saciedade após a lactação, expressão gênica e protéica do SERT e o conteúdo de serotonina no hipotálamo aos 21 e 40 dias, e a imunorreatividade de neurônios ao SERT no hipotálamo e tronco encefálico aos 75 dias de vida. **Resultados:** A fluoxetina neonatal promoveu redução no peso corporal a partir do 11º dia até os 40 dias (11 dias SAL:34,3±1,8; FLU:30,4±2,7/ 40 dias SAL:166,9±27,2; FLU: 127,3±17,5) e na resposta hipofágica da serotonina (FLU:3,36±0,22; FLU+FLUAGUDA:3,37±0,26), aumento no conteúdo de serotonina aos 21 dias (SAL:4,55±0,55; FLU:7,12±0,96), do gene SERT (21 dias SAL:0,82±0,04; FLU:1,01±0,04/ 40 dias SAL:1,00±0,03; FLU:1,40±0,03) e da proteína SERT (21 dias SAL:100±4,47; FLU:119,25±6,47/ 40 dias SAL:92,29±3,40;FLU:117,96±8,75) no hipotálamo. A quantidade dos neurônios SERT nos núcleos arqueado (ARC) e paraventricular (PVN) do hipotálamo e núcleo dorsal (DR) da rafe no tronco encefálico foi menor nos ratos expostos à fluoxetina neonatal aos 75 dias (ARC SAL: 156,1±20,1; FLU:62±8,5/ PVN SAL:319,3±23,3; FLU:135±35,2/ DR SAL: 139,4±39,4; FLU: 47,4±9,1). **Conclusão:** Concluímos que a organização do sistema serotoninérgico durante o período crítico de desenvolvimento é fundamental para a programação da ingestão alimentar em roedores.

Palavras-chave: Serotonina. Inibidores da captação de serotonina. Proteínas da membrana plasmática de transporte de serotonina. Ingestão Alimentar.

ABSTRACT

The serotonergic system presents control of biological events fundamental to the proper development of the nervous system. Serotonin (5-HT) and the Serotonin Transporter (SERT) are indispensable for this control. The availability of components is precisely regulated during the critical period of development and can interfere with the nervous development. Selective serotonin reuptake inhibitors block SERT and promote increased extracellular 5-HT levels. 5-HT is closely related to dietary intake, it seems to be an inverse relation with energy consumption, as it promotes a reduction in food intake by stimulating satiety in rats. This anorectic action of 5-HT shows a resistance when required by a stimulus. This study evaluated the results of the exposure to fluoxetine during lactation on the role of serotonin morphology and serotonin molecules and the transport of serotonin and its effects on food intake of young animals. **Methods:** The animals were divided in two groups according to an experimental manipulation, a group fluoxetine (FLU): male pups that received application of fluoxetine (10mg/kg, 10 μ l/g, s.c.) and male pups that received application of saline (NaCl 0.9%, 10 μ l/g, s.c.), both during all lactation. The body weight during a lactation was evaluated at 40 days, the food intake after lactation, the expression of SERT and the content of hypothalamic serotonin at 21 and 40 days, and the immunoreactivity of the neurons SERT into hypothalamus and brainstem at 75 days of age. **Results:** Neonatal fluoxetine promoted a reduction in body weight from day 11 to 40 days (11 days SAL: 34,3 \pm 1,8; FLU:30,4 \pm 2,7/ 40 days SAL: 166,9 \pm 27,2; FLU: 127,3 \pm 17,5), and the hypophagic response of serotonin (FLU:3,36 \pm 0,22; FLU+FLUACUTE:3,37 \pm 0,26), increase in the serotonin content 21 days (SAL:4,55 \pm 0,55; FLU:7,12 \pm 0,96), SERT gene (21 days SAL:0,82 \pm 0,04; FLU:1,01 \pm 0,04/ 40 days SAL:1,00 \pm 0,03; FLU:1,40 \pm 0,03) and protein SERT (21 days SAL:100 \pm 4,47; FLU:119,25 \pm 6,47/ 40 days SAL:92,29 \pm 3,40;FLU:117,96 \pm 8,75) in the hypothalamus. The amount of SERT neurons in the arched nuclei (ARC) and paraventricular (PVN) of the hypothalamus and dorsal nucleus (DR) in the brainstem were lower in the rats exposed to neonatal fluoxetine at 75 days (ARC SAL: 156,1 \pm 20,1; FLU:62 \pm 8,5/ PVN SAL:319,3 \pm 23,3; FLU:135 \pm 35,2/ DR SAL: 139,4 \pm 39,4; FLU: 47,4 \pm 9,1). **Conclusion:** We conclude that an organization of the serotonergic system during the critical period of development is fundamental to food intake programming in rodents.

Keywords: Serotonin. Serotonin uptake inhibitors. Serotonin plasma membrane transport proteins. Eating.

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
Período crítico do desenvolvimento e Plasticidade Fenotípica	16
Serotonina e Desenvolvimento	21
Transportador de Serotonina e Desenvolvimento	29
Serotonina e Ingestão alimentar	36
Inibição da Recaptação de Serotonina durante o desenvolvimento	41
3. HIPÓTESE	47
4 OBJETIVOS	48
4.1 Objetivo Geral	48
4.2 Objetivos Específicos	48
5 MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1 Animais	49
5.2 Grupos Experimentais	49
5.3 Análises Experimentais	50
5.3.1 Peso Corporal.....	50
5.3.1.1 <i>Peso Corporal Neonatal</i>	50
5.3.1.2 <i>Peso Corporal Pós-Natal</i>	50
5.3.2 Ingestão Alimentar	50
5.3.2.1 <i>Ingestão Alimentar Relativa</i>	50
5.3.2.2 <i>Ingestão Alimentar em Jejum</i>	51
5.3.2.3 <i>Ingestão Alimentar com estímulo agudo</i>	51
5.3.3 Conteúdo Protéico de Serotonina	51
5.3.4 Análises Moleculares do Transportador de Serotonina	52
5.3.4.1 <i>Expressão Gênica do SERT</i>	52
5.3.4.2 <i>Densidade Próteica Total do SERT</i>	53
5.3.5 Imureatividade neuronal ao Transportador de Serotonina (SERT-IR):.....	54
6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	57
7 RESULTADOS	58
7.1 Peso Corporal	58
7.2 Ingestão Alimentar	59
7.2.1 Ingestão alimentar diária	59
7.2.2 Ingestão Alimentar após Jejum.....	60
7.2.3 Ingestão Alimentar com aplicação aguda de fluoxetina	61
7.3 Resultados Moleculares	62
7.3.1 Conteúdo Protéico de Serotonina	62
7.3.2 Expressão Gênica do SERT	63
7.3.3 Densidade Próteica Total do SERT no hipotálamo.....	64
7.4 Resultados Morfológicos	65
7.4.1 Análises quantitativa de neurônios SERT-IR no Hipotálamo	65
7.4.2 Análises quantitativa de neurônios SERT-IR no Tronco Encefálico.....	66
7.4.3 Análises quantitativa de neurônios SERT-IR no Tronco Encefálico.....	67
8 DISCUSSÃO	68
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE	93

APÊNDICE A: ARTIGO ORIGINAL 1	94
APÊNDICE B: ARTIGO DE REVISÃO DA LITERATURA	111
ANEXOS	130
ANEXO A: COMITÊ DE ÉTICA	131

1 APRESENTAÇÃO

No período de crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso central ocorrem fenômenos biológicos importantes como neurogênese, diferenciação neuronal, sinaptogênese, que permitem a organização e especialização das diversas estruturas e funções corporais. Durante esta janela temporal os fenômenos de desenvolvimento ocorrem em grande velocidade e são extremamente sensíveis aos estímulos provindos do meio ambiente. Esta susceptibilidade caracteriza esta fase como um período crítico do desenvolvimento.

Alguns estudos demonstram que influências ambientais promovem alterações nos padrões de desenvolvimento de vários sistemas de neurotransmissão, em especial o sistema serotoninérgico. Dentre as modificações mais significativas encontra-se o aumento no conteúdo encefálico do neurotransmissor serotonina. A desnutrição durante a gestação e o aleitamento promove vários prejuízos fisiológicos e metabólicos que favorecem a maior preferência por alimentos palatáveis, atraso no disparo da saciedade associado à hiperfagia e a redução dos efeitos anorexígenos do neurotransmissor serotonina em indivíduos adultos. O aumento na disponibilidade da serotonina, preconizado pela desnutrição no período de gestação e lactação é semelhante ao que ocorre com a exposição neonatal ao inibidor seletivo de recaptção de serotonina, a fluoxetina.

Influências farmacológicas, assim como as nutricionais, também são consideradas importantes indutoras de adaptações fisiológicas e comportamentais quando administradas em períodos iniciais da vida. Dentre estes fármacos, os inibidores seletivos de recaptção da serotonina, através do bloqueio estrutural e funcional da proteína de transporte de serotonina (SERT) promovem o aumento na disponibilidade de serotonina. Ao longo dos anos, vem sendo estudado o modelo experimental de manipulação farmacológica neonatal do sistema serotoninérgico e seus efeitos sobre a plasticidade fenotípica. Este modelo vem sendo utilizado como uma maneira de manipular o sistema fisiológico da serotonina a fim de isolar os efeitos sobre aspectos estruturais, funcionais, morfológicos e comportamentais promovidos pelo elevado conteúdo de serotonina.

A serotonina desempenha um papel primordial durante o desenvolvimento do sistema nervoso através de sua ação reguladora sobre os eventos biológicos que ocorrem neste período. O principal responsável pela sua regulação é a proteína de

transporte de serotonina. Este transportador facilita a captação da serotonina para o interior da célula neuronal, possibilitando o final de sua ação sobre seus receptores e/ou sua degradação. Durante o período crítico, o transportador de serotonina encontra-se expresso em regiões encefálicas onde se localizam receptores serotoninérgicos envolvidos em processos do desenvolvimento do sistema nervoso. A manipulação com ISRS permite o bloqueio deste transportador, e como consequência estimula o aumento no conteúdo de serotonina, prolongando sua ação sobre seus receptores.

Evidências sugerem a existência de mecanismos de controle sobre a função do transportador de serotonina. As falhas na capacidade de captação da serotonina podem estar relacionadas com a menor disponibilidade do transportador na superfície da membrana celular, e com o conteúdo total desta proteína em estruturas encefálicas importantes para funções como o controle da ingestão alimentar. A disponibilidade do transportador é dependente da ação da serotonina, e a manipulação com ISRS, em fases precoces da vida, parecem imprimir alterações na função desta regulação. Deste modo, questionamos se a exposição neonatal a fluoxetina, nos estágios precoces do desenvolvimento, podem influenciar este controle do SERT e estimular o aparecimento de alterações fenotípicas.

Diante do exposto, é visto que a manipulação farmacológica é capaz de provocar modificações em alguns componentes do sistema serotoninérgico durante o período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso e desencadear alterações comportamentais e funcionais. No entanto, apesar do volume de pesquisas realizadas nos últimos anos sobre agressões perinatais e suas consequências em longo prazo, a origem dos mecanismos fisiológicos e moleculares que induzem o aparecimento de desordens na vida adulta ainda não foram totalmente esclarecidos. Neste intuito, utilizamos o inibidor seletivo da recaptação de serotonina, a fluoxetina, durante a lactação, como uma ferramenta para a manipulação do sistema serotoninérgico, a fim de identificar os possíveis efeitos promovidos à função serotoninérgica e seu controle sobre a ingestão alimentar de roedores.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Período crítico do desenvolvimento e Plasticidade Fenotípica

A plasticidade do desenvolvimento é estabelecida para desempenhar o papel central na etiologia de doenças crônico-degenerativas, associada à hipótese da Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (Wells, 2014). O risco do surgimento de doenças crônicas demonstra uma estreita relação com o ambiente na qual o indivíduo se desenvolveu e o estilo de vida em que se encontra na vida adulta (Wells, 2014). A plasticidade do desenvolvimento é considerada um processo adaptativo que permite refinar os padrões e mecanismos de desenvolvimento do organismo de acordo com o meio ambiente em que o mesmo se encontra. Na perspectiva adaptativa, o indivíduo será beneficiado pela sua capacidade de estruturar suas estratégias de história de vida às condições do meio ambiente (Wells, 2014).

Evidências em humanos foram demonstradas na década de 1970, com o estudo de Ravelli e colaboradores. Conhecido como “*Dutch Famine*” ou Fome Holandesa, foi a denominação para o período de escassez alimentar sofrido por mulheres gestantes durante a 2ª Guerra Mundial (1944-1945). No estudo de Ravelli e colaboradores (1976), foi possível identificar que aproximadamente uma população de 300.000 homens, filhos destas mulheres expostas à fome holandesa apresentaram na vida adulta, diferentes padrões na composição corporal a depender do período na qual haviam sido expostos à desnutrição materna na gestação. Caso a mãe houvesse sofrido desnutrição no último trimestre da gestação, esses indivíduos apresentavam baixa incidência de obesidade. No entanto, se a desnutrição ocorresse no primeiro trimestre da gestação, os indivíduos apresentavam uma maior incidência de obesidade (Ravelli *et al.*, 1976).

Na década de 60, Neel descreveu a “Hipótese do Genótipo Poupador”, propondo que algumas populações apresentavam maior susceptibilidade a desenvolver resistência à insulina, podendo esta patologia estar associada a fatores ambientais ou genéticos. Esta adaptação do organismo poderia trazer benefícios para indivíduos que foram expostos a ambientes de escassez alimentar (Neel *et al.*, 1962). Algumas hipóteses foram exploradas a partir do estudo de Neel, levando a uma maior compreensão sobre a importância do período de gestação e aleitamento

para a susceptibilidade ao surgimento de patologias na vida adulta. Temas como programação metabólica e período crítico do desenvolvimento, atrelados a estes conhecimentos permitiram uma maior compreensão sobre patologias como diabetes e obesidade.

O conceito de período crítico está relacionado à maturação do Sistema Nervoso Central (SNC) de modo linear. Um período crítico representa uma janela de desenvolvimento que não pode ser invertida ou repetida em um momento posterior. Baseado nos achados que os processos de organização são modificados ou interrompidos mais facilmente durante o momento em que ocorrem mais rapidamente. Durante o desenvolvimento, em oposição ao período de manutenção, os processos fisiológicos não apresentam uma taxa uniforme de surgimento e duração. Desta maneira, todos os processos de desenvolvimento exibem períodos críticos cuja importância e duração dependerá de suas taxas de variação. No encéfalo embrionário, muitos processos fisiológicos apresentam uma aceleração, diminuição ou término de suas atividades em um curto período de tempo. O conceito de vulnerabilidade implica que o processo de organização é sujeito a perturbações que influenciam sua taxa de surgimento ou duração (Morgane *et al.*, 2002).

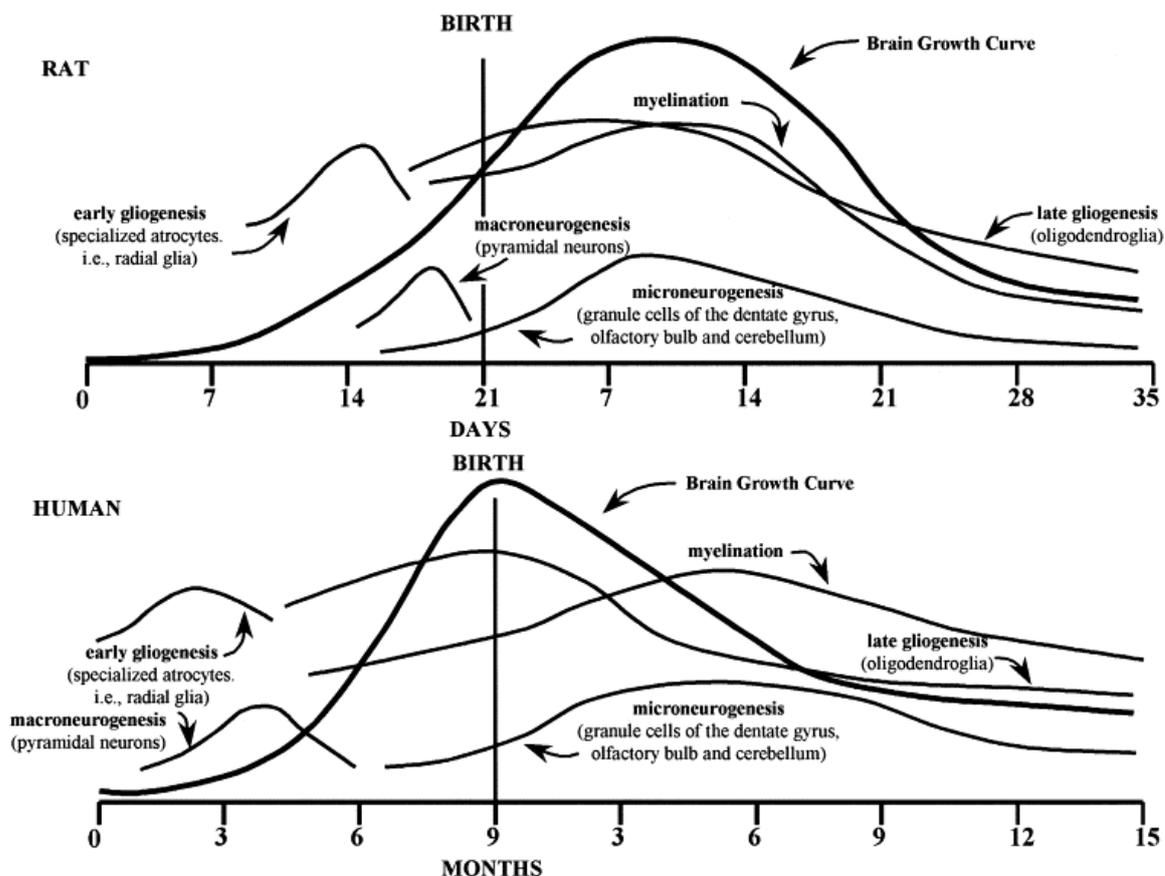


Figura 1: Curva de velocidade comparando ritmo, duração e tempo relativos de processos biológicos fundamentais para o desenvolvimento do sistema nervoso no encéfalo de humanos e ratos. Adaptado de Morgane *et al.*, 2002. (Morgane *et al.*, 2002).

O período de crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso é composto por eventos biológicos como proliferação e diferenciação celular, migração de neurônios, proliferação e ramificação de dendritos e axônios, mielinização e sinaptogênese, que atuam na organização e especialização de diversas estruturas cerebrais (Morgane *et al.*, 2002). Esta fase do desenvolvimento bastante susceptível as influências provindas do meio ambiente é conhecida como período crítico (Dobbing, 1970). Durante esta janela temporal os eventos de desenvolvimento do sistema nervoso ocorrem numa grande velocidade e são extremamente sensíveis à estímulos provindos do ambiente. Em humanos, o período crítico compreende a fase pré-natal, em particular do último trimestre da gestação e tem seguimento até os cinco primeiros anos de vida (Morgane *et al.*, 1978, 2002). Em roedores, esta fase perdura até as três primeiras semanas de vida pós-natal, o período de aleitamento (Morgane *et al.*, 1978).

Estudos epidemiológicos demonstraram a existência da correlação entre o período crítico do desenvolvimento com o surgimento de patologias metabólicas na vida adulta. Um dos primeiros modelos teóricos sugerido por Hales e Barker (1992), denominado Hipótese do Fenótipo Pougador (*Thrifty Phenotype Hypothesis*), propôs que estímulos ou insultos ocorridos durante o período perinatal, gestação e aleitamento, poderiam promover adaptações fisiológicas e metabólicas. Estas adaptações iriam privilegiar o aporte nutricional para o desenvolvimento de órgãos vitais, como o encéfalo, em detrimento de outros órgãos. Em curto prazo, o organismo teria a capacidade de se adaptar ao meio ambiente a fim de permitir sua sobrevivência, no entanto, em longo prazo, estas adaptações fenotípicas tornariam o organismo susceptível ao aparecimento de patologias. Os estudos da hipótese do Fenótipo Pougador demonstram associações entre o pobre crescimento fetal e infância ao maior risco de desenvolvimento de tolerância à glicose e síndrome metabólica na vida adulta. Uma questão chave para a discussão da hipótese é a proporção na qual os mecanismos subjacentes são genéticos ou ambientais (Hales e Barker, 2001).

Em meio ao estudo das hipóteses do Genótipo Pougador, Fenótipo Pougador e Programação Metabólica surge um novo modelo teórico proposto por Wells (2011), que associa a trajetória de crescimento desde a infância até a maturidade ao risco de doenças cardiovasculares na idade adulta. Nesta hipótese, o peso ao nascer é considerado como um índice de “Capacidade Metabólica”, na qual a estrutura e função dos órgãos durante a vida fetal e infância são promotores da manutenção da homeostase. E os vários fatores da infância como índice de carga metabólica que desafia a manutenção da homeostase, como o acúmulo de tecido adiposo, sedentarismo e dieta rica em gordura. De acordo com este modelo, o aumento no tamanho do corpo e o maior acúmulo de tecido adiposo são preditores do aumento da carga metabólica, da mesma maneira que o baixo peso ao nascer é preditor de uma capacidade metabólica reduzida.

Os modelos teóricos estão inseridos na Hipótese da Origem Fetal de Doenças da Vida Adulta ou Plasticidade Fenotípica. Segundo Gluckman e colaboradores (2011), a predisposição genética e o ambiente precoce, podem influenciar as respostas adaptativas do organismo ao ambiente e podem favorecer o aparecimento de patologias na vida adulta. Sendo assim, a plasticidade fenotípica está relacionada

à expressão de genótipos do indivíduo frente às condições ambientais, representada como as respostas do organismo sob a forma de fenótipos morfológicos, fisiológicos, moleculares e comportamentais (Gluckman *et al*, 2011).

A Plasticidade é definida por adaptações estruturais e funcionais promovidas pelo SNC a partir de estímulos externos provindos do meio ambiente, ou internos relacionados à carga genética do indivíduo (Sodhi e Sanders-Bush, 2004). A plasticidade neural é essencial para a sobrevivência de um indivíduo em um ambiente em constante mudança (Sodhi e Sanders-Bush, 2004). Este processo dinâmico é baseado nas habilidades dos sistemas neuronais, sinapses cerebrais, células nervosas e receptores a fim de se adaptarem as mudanças ocorrentes. A plasticidade se revela de diversas maneiras, através de alterações na expressão de genes, liberação de neurotransmissores até mudanças nos comportamentos e fenótipos corporais (Sodhi e Sanders-Bush, 2004). Um dos processos que contribui para a plasticidade neuronal é a habilidade de aumentar a taxa de síntese e liberação de neurotransmissores em resposta ao aumento da atividade neuronal. Os neurônios serotoninérgicos têm esta habilidade. A síntese da serotonina, a partir do triptofano, é aumentada em resposta a frequência de estimulação elétrica do corpo celular serotoninérgico (Boadle-Biber, 1993). Requerimentos à curto prazo para o aumento da síntese de serotonina podem ocorrer através de alterações nas propriedades cinéticas da triptofano hidroxilase (TPH), sem necessitar o aumento do conteúdo da própria enzima TPH (Hensler, 2006).

Uma maior compreensão sobre ação da serotonina durante o período crítico de desenvolvimento do Sistema Nervoso iniciou a partir dos estudos sobre a interação entre a nutrição perinatal e as possíveis repercussões sobre o organismo do indivíduo na vida adulta (Morgane *et al.*, 1978; 2002; Manjarrez *et al.*, 1994; Hales e Barker, 1992; 2001; Deiro *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2008). Inicialmente foi possível identificar uma estreita relação entre a desnutrição e modificações no desenvolvimento estrutural e funcional do encefálico de ratos (Manjarrez *et al.*, 1994). No sistema nervoso, a desnutrição perinatal provoca algumas das alterações estruturais e funcionais como; redução do número (Leuba e Rabinowicz, 1979a) e forma dos neurônios (Resnick *et al.*, 1979), quantidade de neurotransmissores (Hisatomi e Niyama, 1980; Manjarrez *et al.*, 1994). A desnutrição perinatal parece estimular o sistema serotoninérgico com o aumento dos níveis de serotonina no

sistema nervoso central (Hisatomi e Niyama, 1980; Manjarrez *et al.*, 1994; Borue *et al.*, 2007). Segundo Manjarrez-Gutiérrez e colaboradores (1988), a concentração de serotonina encefálica em ratos submetidos à desnutrição precoce se encontra aumentada no período pós-natal e na idade adulta. No estudo de Hisatomi e Niyama (1980), a desnutrição, induzida pelo aumento da ninhada com 18 filhotes machos por lactante, promoveu aumento no conteúdo de serotonina no 21º dia de vida no prosencéfalo, cerebelo, tronco encefálico e no encéfalo total. Ao contrário, estes animais apresentaram menor conteúdo de Ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA) no 10º e 21º dia de vida no prosencéfalo e no 21º dia no encéfalo total (Hisatomi e Niyama, 1980). Estas alterações estão relacionadas ao aumento na concentração de L-triptofano encefálico e na atividade da 5-triptofano-hidroxilase (Hernandez, 1973; Manjarrez *et al.*, 1994). Durante o desenvolvimento, a serotonina atua na auto-regulação dos neurônios serotoninérgicos e no desenvolvimento de tecidos-alvos (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1996). Sendo assim, alteração na disponibilidade de 5-HT pode promover alterações morfológicas e funcionais duradouras (Borue *et al.*, 2007).

Serotonina e Desenvolvimento

O conteúdo encefálico desta monoamina foi detectado bioquimicamente na década de 50 (Twarog e Page, 1953; Bogdanski *et al.*, 1956) porém, apenas na década de 60, neurônios serotoninérgicos foram visualizados pela primeira vez (Dahlström e Fuxe, 1964). Ao longo dos anos, foi possível identificar mais detalhes sobre a morfologia dos neurônios serotoninérgicos utilizando a técnica de imunocitoquímica com a identificação da TPH (Pickel *et al.*, 1977), da própria serotonina (Steinbusch, 1981) e do transportador de serotonina (SERT) (Ovalle *et al.*, 1995; Sur *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1996). Em virtude de sua característica hidrofílica, a serotonina não ultrapassa a barreira hemato-encefálica (BHE), tornando necessária para sua ação central, que sua síntese ocorra no SNC, a partir do aminoácido essencial triptofano. Este aminoácido deve ser adquirido através do alimento na dieta, não sendo sintetizado pelo organismo (Azmitia, 2010), podendo seguir três destinos metabólicos: síntese protéica, via da quinurenina e via da serotonina. O triptofano não utilizado na síntese protéica, 99% é destinado a vida da quinurenina (Stone *et al.*, 2002). A serotonina é produzida em baixas quantidades devido à escassez de triptofano (D'Souza *et al.*, 2010). Apenas 1% é convertido em

serotonina. A síntese de serotonina no SNC ocorre principalmente em neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe. Uma vez digerido, triptofano apresenta-se numa forma livre ou ligado a albumina no plasma. Apenas a forma livre está disponível para ser transportada ao cérebro, e o seu transporte deve competir com a incorporação de todos os outros ácidos aromáticos aminados (tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina, valina e metionina) (Curzon *et al.*, 1973). Inicialmente, o triptofano é captado do plasma por transportadores de aminoácidos neutros localizados na BHE (Blundell, 1992). Após sua entrada no neurônio, o triptofano é hidrolisado a 5-Hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima Triptofano Hidroxilase (TPH), codificada por dois genes: *TPH-1* nos tecidos periféricos e *TPH-2* no sistema nervoso central (Walther *et al.*, 2003) (Figura 2).

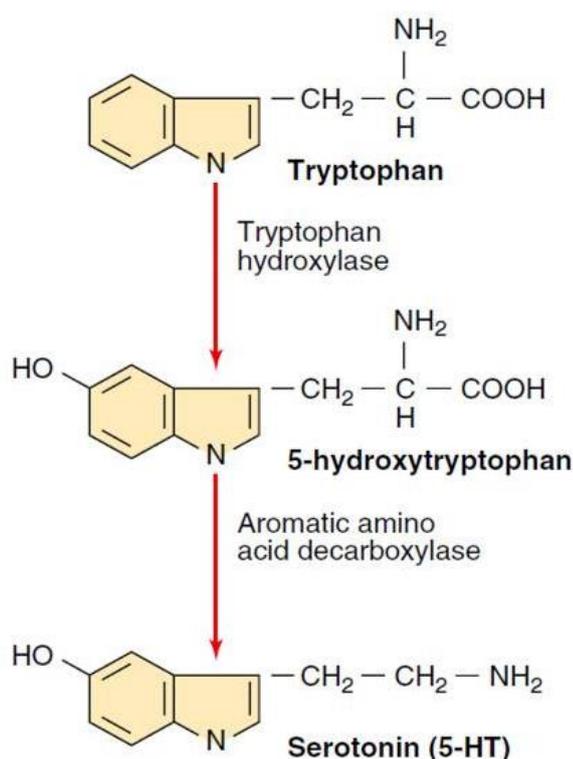


Figura 2: Biosíntese da serotonina.

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina é uma monoamina amplamente distribuída no sistema nervoso central e apresenta funções distintas e/ou complementares a depender do estágio de maturação do organismo. Durante o período de desenvolvimento, atua como sinalizador celular, neuromodulador, hormônio e neurotransmissor, e sua atividade pode variar de acordo com a região em que está localizada e da fase de desenvolvimento e maturação na qual o organismo se encontra (Turlejski, 1996). A regulação destes processos biológicos é fundamental para o desenvolvimento normal do sistema nervoso.

No encéfalo de mamíferos, os sistemas monoaminérgicos de neurotransmissão surgem precocemente, mas em particular, a serotonina se apresenta mais cedo e em mais regiões terminais (Whitaker-Azmitia, 2001). Na gestação, a placenta demonstra a habilidade de sintetizar e transportar serotonina a partir de um complexo sistema de conversão do triptofano materno em serotonina liberando-a na circulação fetal (Bonnin, 2011).

Em camundongos *Pet-1*^{-/-} é observada uma consistente redução de serotonina durante o período fetal de desenvolvimento no tronco encefálico. Entretanto, nos estágios iniciais (10.5^o ao 15.5^o dia embrionário) os níveis de serotonina estão normais. No prosencéfalo, no 16.5^o dia embrionário, a concentração de serotonina é menor, o que permite considerar que esta região recebe inervação exclusivamente provinda do núcleo dorsal da rafe (Bonnin *et al.*, 2011). O diferente acúmulo de serotonina no prosencéfalo e tronco encefálico, em camundongos *Pet-1*^{-/-} no período fetal de desenvolvimento é um indicativo de uma transição conteúdo exógeno precoce para o conteúdo endógeno tardio nos neurônios no núcleo dorsal da rafe. Esta mudança durante o desenvolvimento permite que o prosencéfalo, durante a embriogênese precoce e intermediária, se torne progressivamente dependente de sua própria produção de serotonina (Bonnin e Levitt, 2011).

Alterações genéticas e ambientais podem influenciar o metabolismo placentário da serotonina, assim como o próprio conteúdo placentário de 5-HT pode promover conseqüências diretas à rede axonal do feto. No encéfalo humano, os neurônios serotoninérgicos são evidenciados pela primeira vez no tronco encefálico na 5^a semana de gestação (Sundstrom *et al.*, 1993). Os níveis encefálicos de serotonina aumentam ao longo da gestação até os dois primeiros anos de vida, com

o pico aos 5 anos de vida (Chugani et al., 1999). Aproximadamente na 15ª semana de gestação, a organização típica do corpo celular de neurônios serotoninérgicos é observada nos Núcleos da Rafe (Takahashi *et al.*, 1986). Em roedores, o aparecimento de neurônios serotoninérgicos ocorre entre o 10º a 12º dia de vida do embrião (Lidov e Molliver, 1982), com síntese de serotonina detectada um dia após este surgimento (Gaspar *et al.*, 2003). Logo após, os neurônios serotoninérgicos emergem a partir dos núcleos da rafe a fim de modular o desenvolvimento e maturação dos diversos circuitos neuronais (Lautenschlager *et al.*, 2000). Machos neonatos apresentam um alto nível de serotonina, com pico no 3º dia de vida, comparado com fêmeas, que apresentam uma elevação gradual no 5º dia de vida (Connel *et al.*, 2004). O desenvolvimento das propriedades serotoninérgicas dos neurônios dos Núcleos da Rafe no tronco encefálico dependem de um sistema de feedback positivo, na qual pequenas quantidades de serotonina, presente nos tecidos, possibilitam o início de sua própria síntese e estimulam o desenvolvimento de outras propriedades serotoninérgicas, mesmo em neurônios que não produzem serotonina (De Vitry *et al.*, 1986). Este mecanismo pode ser responsável pelo rápido desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos e pela presença transitória da 5-HT em alguns neurônios durante o desenvolvimento (Shuey *et al.*, 1993). O sistema intracelular da serotonina é um dos primeiros a surgir no sistema nervoso de mamíferos atuando como fator trófico nas fases iniciais do desenvolvimento (Lauder, 1993).

Os neurônios serotoninérgicos são um dos sistemas neurais mais amplamente distribuídos no encéfalo desta classe de animais. Suas projeções originam-se a partir dos Núcleos da Rafe, localizados ao longo da linha média do tronco encefálico, e consistem em numerosos e distintos grupos de neurônios que se organizam emitindo projeções ascendentes e descendentes (Lauder, 1993; Whitaker-Azmitia, 2010). Os corpos celulares destes neurônios serotoninérgicos encontram-se, em sua maioria, distribuídos nos nove núcleos da rafe. Estes núcleos serotoninérgicos são classificados em grupos de acordo com a estrutura anatômica e organização do corpo celular, no sentido caudo-rostral dos roedores (Dahlstrom e Fuxe, 1964). Em sequência são denominados: Núcleo Pálido (RPa), Núcleo Obscuro (ROb), Núcleo Magno (RMg), Núcleo Pontino (PnR), Núcleo Paramediano (PMnR), Núcleo Mediano (MnR), Núcleo Dorsal (DR), Núcleo Caudal Linear (CLi) e Núcleo

Rostral Linear (RLi) (Dahlstrom e Fuxe, 1964; Steinbusch, 1981; Tork, 1985; Weissmann *et al.*, 1987). Os dois grupos de neurônios serotoninérgicos parecem ter um padrão de maturação e migração distintos (Lidov e Molliver, 1982; Wallace e Lauder, 1983). O grupo rostral formado pelos núcleos Dorsal (DR), Caudal Linear (CLi), Mediano (MnR) enviam projeções predominantemente rostrais para o tálamo e hipotálamo. Enquanto o grupo caudal formado pelos núcleos Pálido (RPa), Núcleo Obscuro (ROb), Núcleo Magno (RMg) projetam-se mais caudal e ventralmente para inervar a medula espinhal e o cerebelo (Dahlstroem e Fuxe, 1964; Jacobs e Azmitia, 1992; Hornung, 2010) (Figura 3).

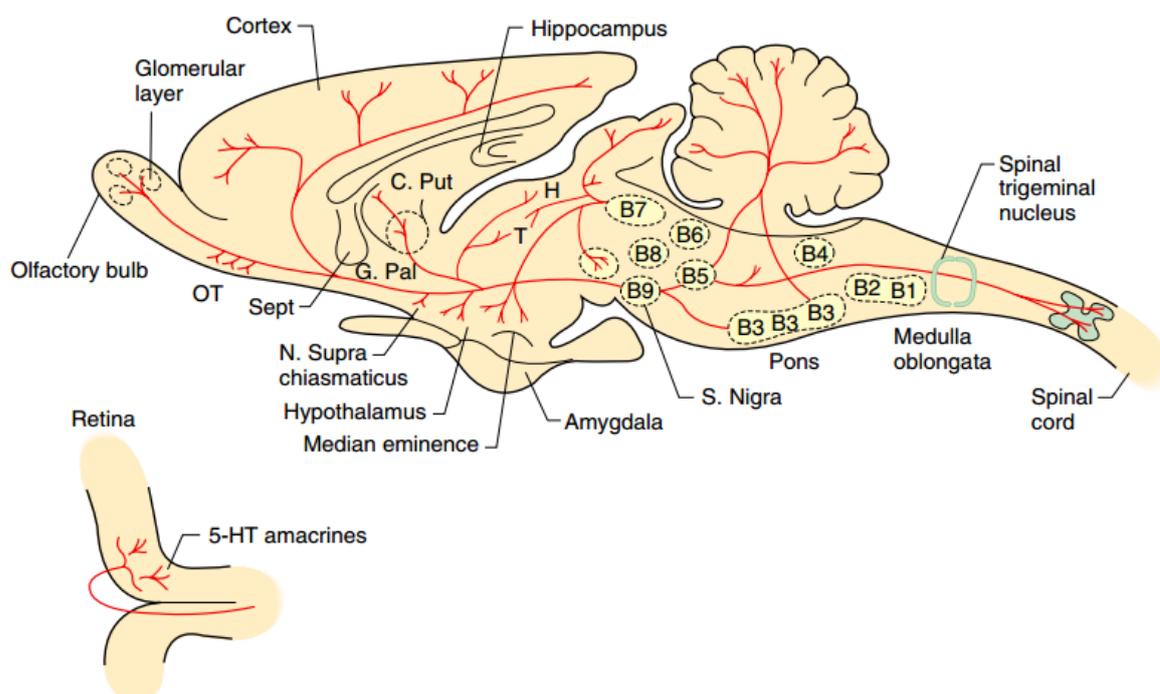


Figura 3: Localização de grupos dos corpos celulares serotoninérgicos em secção sagital do sistema nervoso central de ratos e suas principais projeções (Consolazione, A. and Cuello, A. CNS Serotonin Pathways. In: The Biology of Serotonergic Transmission. New York: John Wiley & Sons, 1982, pp 29–61).

Estas projeções ascendentes se desenvolvem em três fases distintas em ratos: Fase 1 – alongamento axonal inicial que ocorre entre o 13º e 16º dia de gestação com os axônios que se dirigem ao feixe prosencéfalo medial e atingem o prosencéfalo basal. Fase 2 – projeções serotoninérgicas atravessam ao longo de

tratos de fibras pré-existentes entre o 16º e 19º dia de gestação, em especial no 16º dia, algumas fibras laterais que atravessam tratos de fibras que inervam o hipotálamo. E a Fase 3 – ocorre a inervação de áreas terminais específicas no 19º dia de gestação até o nascimento (Lidov e Molliver, 1982). Embora os axônios serotoninérgicos alcancem áreas terminais próximo ao período de nascimento, sua arborização final ainda ocorre de forma significativa até o 21º dia de lactação (Whitaker-Azmitia, 2005). É durante este período de arborização terminal de seus neurônios que a 5-HT encontra-se com seus níveis elevados no encefálico de roedores (Lidov e Molliver, 1982; Connel *et al.*, 2004).

Segundo Huether e colaboradores (1992), o aumento pré-natal na disponibilidade de triptofano, aminoácido precursor da serotonina, retarda o desenvolvimento de axônios serotoninérgicos e reduz a síntese de serotonina. Este mecanismo pode prevenir a hiperinervação de neurônios serotoninérgicos em estruturas encefálicas. A inibição do crescimento e inervação de neurônios serotoninérgicos também podem ser um importante indutor de anormalidades neurocomportamentais (Lidov e Molliver, 1982). A exposição pré-natal a cocaína reduziu a recaptção de serotonina e a densidade de fibras serotoninérgicas no córtex e hipocampo na primeira semana de vida pós-natal (Azmitia, 1987). O sistema serotoninérgico é diretamente regulado pelos auto-receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} e pelo transportador de serotonina, estes componentes atuam como reguladores do fenótipo neuronal serotoninérgico (Rumajogee *et al.*, 2004). A expressão de receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} em axônios tálamos-corticais, durante o período de gestação, demonstram um sintonia com a sinalização serotoninérgica por regular a orientação e crescimento destes neurônios (Bonnin *et al.*, 2007). Através da imunohistoquímica do SERT, observada do 2º ao 14º dia de vida em roedores, no córtex somatossensorial foi possível identificar uma organização cortical precoce e uma relação com a inervação transitória de neurônios 5-HT nesta região (D'Amato *et al.*, 1987). Este aspecto transitório também é observado na expressão do SERT, que ocorre ao final do primeiro trimestre de gestação em humanos, e demonstra uma associação ao crescimento e desenvolvimento de neurônios 5-HT no córtex pré-natal (Verney *et al.*, 2002).

A densidade final e distribuição de terminais serotoninérgicos também são moldadas durante a maturação pós-natal do sistema nervoso central (Lidov, 1982).

Em algumas estruturas, a inervação serotoninérgica passa por fases de hiperinervação ou expressão temporária de alguns receptores serotoninérgicos, os quais podem ser decisivos para a participação da serotonina no desenvolvimento e plasticidade do sistema nervoso central (Lidov, 1982). Os níveis de serotonina durante o desenvolvimento do sistema nervoso são precisamente regulados. A alta atividade serotoninérgica é detectada precocemente (Lidov e Molliver, 1982), concentrações máximas de serotonina no encéfalo ocorrem até o 21º dia de vida nos ratos demonstrando (Whitaker-Azmitia, 2005). O desenvolvimento de terminais serotoninérgicos também depende de um balanço entre fatores de crescimento presentes em tecidos alvos, como a liberação do fator de crescimento S-100 β , nas células da glia, é estimulado pela serotonina, demonstrando a ação indireta da serotonina na estimulação do seu próprio crescimento (Whitaker-Azmitia, 2001). A síntese, estoque e recaptção da serotonina são diminuídos pela presença da própria 5-HT em cultura de células neuroepiteliais que podem ser induzidas em um fenótipo de células serotoninérgicas neuronais, particularmente quando os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} aparecem pela primeira vez. A 5-HT também inibe seu próprio crescimento através de receptores serotoninérgicos em seus terminais.

Os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} são considerados auto-receptores por sua presença em neurônios pré-sinápticos e ação sobre o controle da produção, armazenamento e liberação da serotonina. Estes receptores regulam a direção e crescimento de neurônios serotoninérgicos (Whitaker-Azmitia *et al.*, 1986). O auto-receptor 5-HT_{1A} é um dos primeiros receptores serotoninérgicos a aparecer, com o surgimento no período pré-natal em humanos e ratos (Bar-Peled *et al.*, 1991). Apresenta uma expressão transitória durante o desenvolvimento em regiões encefálicas nas quais está ausente no adulto, como o cerebelo (Daval *et al.*, 1987). Este receptor é encontrado nos corpos celulares de neurônios serotoninérgicos nos Núcleos da Rafe bem como em tecidos alvos, especialmente em regiões límbicas. No desenvolvimento, os receptores 5-HT_{1A} localizados no corpo celular de neurônios serotoninérgicos nos Núcleos da Rafe desempenham uma ação inibitória como auto-regulador do desenvolvimento neuronal da 5-HT. No encéfalo maduro, estes receptores apresentam esta função inibitória, como auto-receptores (Lauder *et al.*, 2000; Whitaker-Azmitia, 2001; Gaspar *et al.*, 2003). Esta ação auto-inibitória da serotonina, através do receptor 5-HT_{1A}, é controlada pela inibição de um segundo

mensageiro cAMP (Rumajogee *et al.*, 2004). Os receptores 5-HT_{1A} inibem o disparo de neurônios serotoninérgicos (Sprouse e Aghajanian, 1987) e o 5-HT_{1B} diminui a liberação de serotonina em terminais axonais ou vesículas (Galzin *et al.*, 1992). Vias estimuladas por AMPc parecem participar na regulação à longo prazo de neurônios serotoninérgicos (Rumajogee *et al.*, 2004).

Após síntese da serotonina nos neurônios da rafe, a 5-HT é armazenada em vesículas presentes nos neurônios pré-sinápticos. A passagem de um potencial de ação no neurônio induz a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática, através do aumento de Ca²⁺ intracelular, induzindo a liberação da serotonina intracelular para o meio extracelular. Uma vez livre na fenda sináptica, a serotonina pode atuar em seus receptores, entretanto, após esta interação, sua ação é encerrada. A proteína de membrana de vesículas secretoras chamada de transportador de monoaminas vesicular 2 (VMAT₂) induz a remoção da serotonina do citoplasma neuronal e permitindo o empacotamento da 5-HT dentro destas vesículas até o momento de transportar a serotonina ao terminal pré-sináptico e liberá-la para o meio extracelular (Schuldiner *et al.*, 1995). Animais *knockout VMAT^{2(-/-)}* não apresentam um mecanismo específico para empacotar a serotonina dentro das vesículas sinápticas, sendo assim todo conteúdo serotoninérgico é rapidamente degradado e depletado. Estes animais apresentam características como: hipoatividade, predisposição a hipotermia, exibem um grave retardo de crescimento, e a maioria sobrevive poucos dias após o nascimento (Wang *et al.*, 1997).

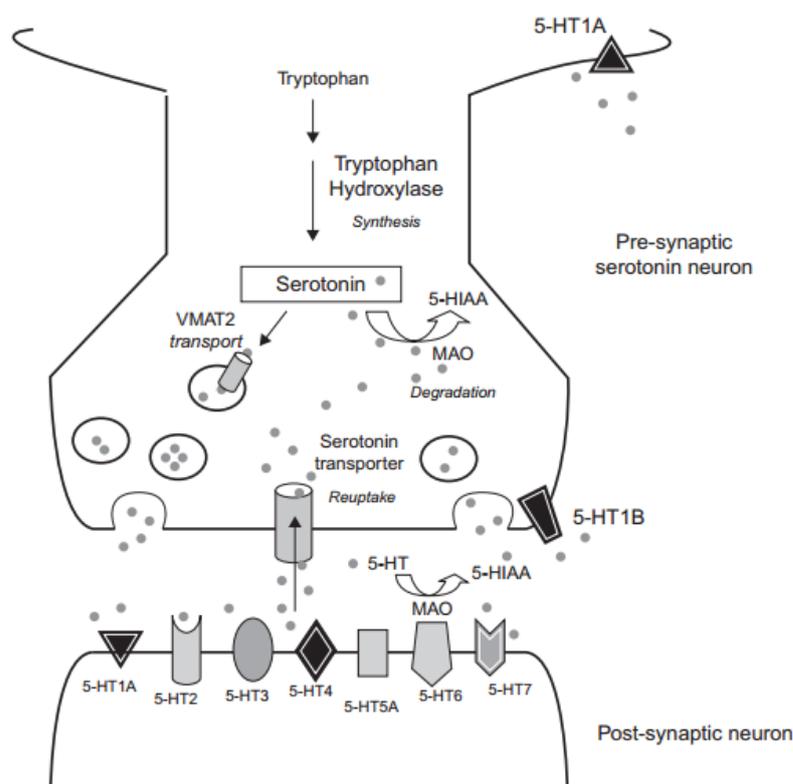


Figura 4: Modelo de sinapse serotoninérgica.

O término de sua atividade é determinado por dois processos, sua degradação enzimática através da enzima monoamina oxidase (MAO), ou através de sua remoção da fenda sináptica de volta para o interior do neurônio pré-sináptico através do transportador de serotonina (Borue *et al.* 2007; Meier *et al.* 2007) (Figura 4). A principal via de catabólica de serotonina é realizada por ação da enzima monoamino oxidase (MAO). Esta enzima apresenta duas isoformas, MAO-A e MAO-B. Ambas estão presentes no encéfalo, preferencialmente em neurônios serotoninérgicos. A catabolização da serotonina pelas enzimas MAO-A e MAO-B gera o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Sablin *et al.*, 1998). Apesar da ação destas enzimas na degradação serotoninérgica, a MAO-A apresenta alta afinidade para a serotonina. Um segundo mecanismo de degradação da serotonina se dá através de sua recaptação pela proteína de transporte localizada na membrana pré-sináptica, o transportador de serotonina (D'Souza *et al.*, 2010).

Transportador de Serotonina e Desenvolvimento

O transportador de serotonina é o principal responsável pela regulação dos níveis de serotonina na fenda sináptica. Esta proteína de membrana plasmática tem a função de recaptar a serotonina, não degradada pela MAO na fenda sináptica, de volta ao interior dos neurônios pré-sinápticos (Borue *et al.* 2007; Meier *et al.* 2007). A remoção ativa reduz os níveis de neurotransmissor na fenda sináptica mais rapidamente que a difusão, restringindo os efeitos da liberação da serotonina para áreas menores e permitindo que o neurotransmissor seja reciclado para o uso posterior (Sghendo e Mifsud, 2011). A recaptação é realizada através do transportador de proteínas de membranas, o SERT, local aonde o neurotransmissor, serotonina se liga para ser carregada através da membrana plasmática de volta para o interior do neurônio pré-sináptico (Sghendo e Mifsud, 2011).

O SERT sofre uma mudança em sua conformação e move uma ou mais moléculas de serotonina por ciclo, ao contrário de canais, que ficam abertos ou fechados, isto permite a saída de moléculas através da membrana bicamada. O transportador de serotonina assemelha-se estrutural e funcionalmente a outros transportadores de aminas biogênicas como os transportadores de noradrenalina e a dopamina (Sghendo e Mifsud, 2011). O mecanismo de ação do SERT é dependente do nível extracelular de íons sódio (Na^+) e cloro (Cl^-). Os íons cloro, em parte, podem ser substituídos por íons bicarbonato (HCO_3^-), diferente dos íons sódio. Os níveis intracelulares de potássio (K^+) também são requeridos neste processo, mas também podem ser substituídos por íons de hidrogênio (H^+). Bombas ATPase de Na^+/K^- mantém a concentração dos níveis de sódio extracelular bem como a concentração intracelular de íons potássio. A bomba ATPase Na^+/K^- libera três íons sódio para fora para cada dois íons potássio são bombeados para dentro da célula (Sghendo e Mifsud, 2011). O potencial elétrico produzido, em adição a criação da concentração de íons sódio usado pelo SERT, também leva a perda de íons cloro para fora da célula. O primeiro passo ocorre quando um íon sódio se liga a proteína SERT. A serotonina, em sua forma protonada (5-HT^+), se liga ao transportador seguido por um íon cloro. O complexo inicial de serotonina, um íon sódio e um íon cloro criam uma mudança na conformação da proteína SERT (Plenge *et al.*, 2007). O SERT se encontra em uma posição voltada para o meio externo da célula neuronal, inicia uma mudança em sua posição movendo-se em direção ao interior da célula, permite a liberação da serotonina e íons para o citoplasma do neurônio. Um

íon potássio intracelular se liga ao SERT promovendo a reorientação em sua posição conformacional e o início de um novo ciclo de recaptação (Sguendo e Mifsud, 2011) (Figura 5). A despolarização da membrana plasmática é associada a uma redução na velocidade de transporte, enquanto uma hiperpolarização resulta em uma melhora no transporte. Durante a despolarização neuronal ocorre uma inibição temporária da captação de serotonina pelo SERT, esta ação pode permitir que a 5-HT se difunda pelo terminal pré-sináptico para interagir com os receptores pós-sinápticos.

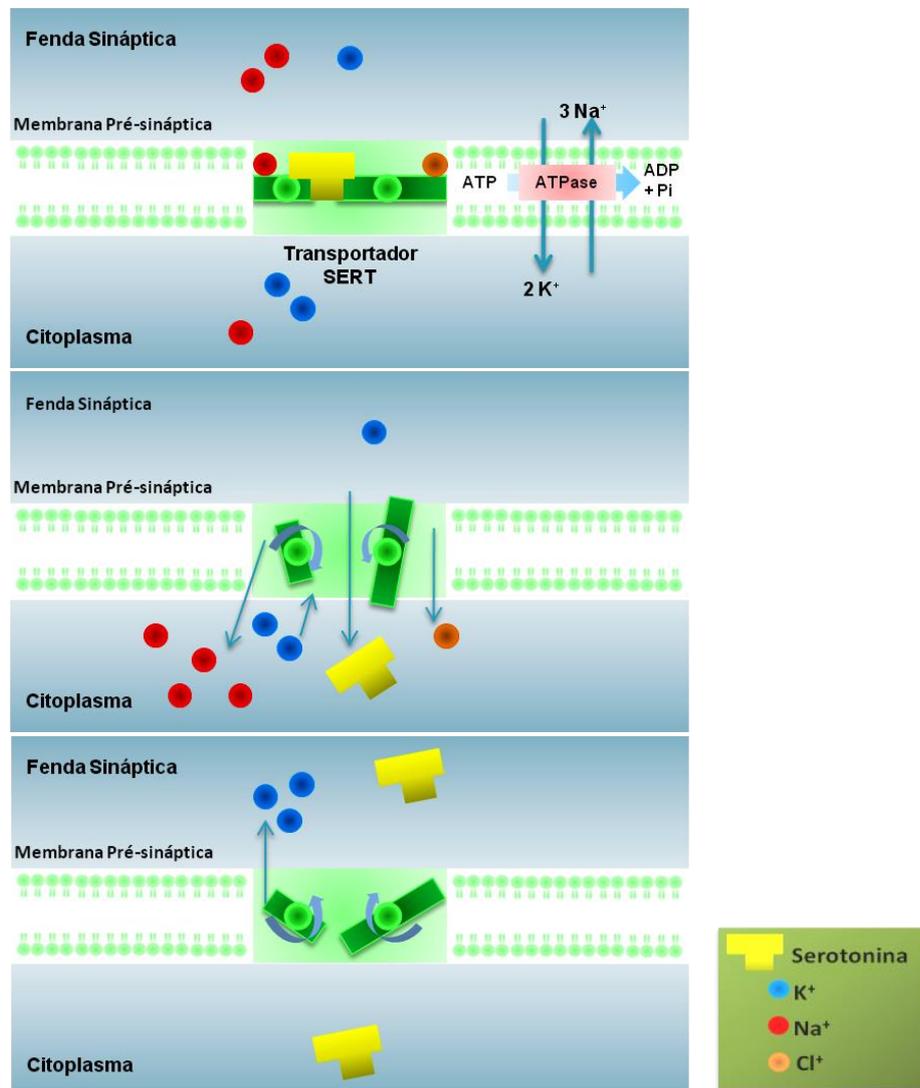


Figura 5: Esquema de funcionamento da recaptação da proteína SERT no meio intra e extracelular do neurônio.

O transportador de serotonina faz parte da família de Simportadores ou Co-Transportadores de neurotransmissores dependentes de cloreto de sódio localizados principalmente na membrana plasmática dos neurônios serotoninérgicos (Saier, 1999). O SERT apresenta aproximadamente 50% de homologia absoluta com transportadores de noraepinefrina (NET) e dopamina (DAT) (Frazer e Hensler, 1999). No entanto, existe apenas um gene e uma proteína que codifica o Transportador de Serotonina, localizados tanto no sistema nervoso central como em tecidos periféricos (Homberg *et al.*, 2010). A estrutura protéica deste transportador é composta por 12 hélices transmembranais com um laço extracelular entre as hélices 3 e 4 (Mitchell *et al.*, 2004).

A expressão gênica do transportador de serotonina é influenciada por vias dependentes de AMP cíclico (AMPC) e rapidamente reguladas por alterações intracelulares de cálcio e ativação de proteínas quinases C (PKC). A maioria das alterações na cinética enzimática pode refletir mudanças na capacidade de transporte máxima ($V_{m\acute{a}x}$) ao invés de mudanças na afinidade (K_m). A ativação de PKC causa uma redução na disponibilidade da proteína SERT na superfície da membrana. A ocupação do SERT pelo substrato, serotonina, pode induzir uma mudança na conformação do transportador que impede a fosforilação pela PKC, assim inibe a internalização do SERT promovida pela PKC ou melhora a ação das fosfatases, assim reduz a fosforilação e internalização do transportador (Zahniser e Doolen, 2001). Além disso, a ocupação do substrato e/ou a atividade de transporte promove retenção do SERT na superfície da membrana, estimulando a manutenção da função do SERT (Zahniser e Doolen, 2001).

O gene que codifica o SERT é o *Solute Carrier Family 6 neurotransmitter transporter, serotonina, member 4 (slc6a4)* (Meier *et al.*, 2007). Sua organização é semelhante a membros da família de transportadores de neurotransmissores Na^+/Cl^- . O gene *slc6a4* pode ser considerado um “Gene de Plasticidade” (Plasticity Gene) ou “Fator de Plasticidade” (Plasticity Factor), ao invés de um “Gene de Vulnerabilidade” (Brummelte *et al.*, 2016). O polimorfismo na região promotora do gene SERT tem dois principais variantes: o alelo curto (s: short) e o longo (l: long) (Munafo *et al.*, 2009). Polimorfismo é determinado como variações genéticas encontradas com frequência maior que 1% na população, pode atuar como marcadores genéticos, tornar indivíduos mais susceptíveis ao aparecimento ou

desenvolvimento de patologias quando associado a outros fatores genéticos e/ou ambientais. O polimorfismo da região promotora do gene *slc6a4* (5-HTTLPR) influencia a transcrição gênica e nível do SERT, assim como a recaptação da 5-HT (Heils *et al.*, 1996). A variação alélica para o gene *slc6a4* pode ser sensível a fatores ambientais positivos ou negativos (Way e Taylor, 2010), sugerindo que nem todos os fatores afetam a sinalização serotoninérgica do mesmo modo. No entanto, as variações alélicas oferecem uma compreensão sobre a maneira como as alterações na sinalização precoce da serotonina podem provocar consequências duradouras. Consequências funcionais e transcricionais no alelo curto podem resultar em baixa densidade do mRNA e da proteína SERT, remoção extracelular de serotonina mais lenta (Murphy *et al.*, 2004). Por reduzir a captação de serotonina, o alelo curto promove uma manutenção dos níveis de serotonina extracelular comparando-se ao alelo longo (Karg *et al.*, 2011). Outros fatores genéticos como em particular, o microRNA 16, parece modular a expressão do SERT e pode ser modulado pelo tratamento crônico com antidepressivos (Baudry *et al.*, 2010). A susceptibilidade do desenvolvimento para exposições na vida precoce à adversidades pode influenciar ou não alguns indivíduos neonatos.

Alterações na sinalização da serotonina no período precoce da vida podem estar diretamente associadas com variações alélicas no gene *slc6a4*. Neonatos com exposição uterina à ISRS apresentam considerável aumento dos níveis de serotonina e distúrbios comportamentais, estes achados são mais evidentes em neonatos que apresentam alelo curto do *slc6a4* (Oberland *et al.*, 2008). O maior risco de desconforto respiratório em neonatos expostos à ISRS e que apresentam alelo longo (Oberland *et al.*, 2008). Dois alelos funcionais, um longo (L) com 16 unidades repetitivas e um curto (S) com 14 unidades repetitivas. Funcionalmente, o alelo S é associado a uma menor ligação do SERT em regiões do sistema límbico do encéfalo, menor expressão e conteúdo de SERT, e menor recaptação de serotonina (Collier *et al.*, 1996). Comparado com o alelo L, o alelo S apresenta reduzida disponibilidade e função da proteína SERT (Luddington *et al.*, 2009), possibilitando um alto conteúdo de serotonina (Brummelt *et al.*, 2016). Indivíduos com alelo S do polimorfismo *5-HTTLPR* apresentam concentrações extracelulares mais elevadas de 5-HT durante o neurodesenvolvimento, e possivelmente, no sistema serotoninérgico maduro (Lee *et al.*, 2005). O excesso de 5-HT encefálica

pode levar a um desenvolvimento anormal na organização topográfica dos campos de barris do córtex somatossensorial, área responsável pelo reconhecimento externo do roedor. Os barris corticais são evidenciados logo após o nascimento, e seu desenvolvimento depende de um período crítico de chegada de sinais aferentes da periferia. Cada barril cortical recebe informação somatossensorial de uma única vibrissa no focinho do roedor, e o arranjo regular de barris corticais reflete a organização somatotópica da informação aferente que chega da superfície corporal, culminando na projeção de aferentes talâmicos para barris corticais específicos. Roedores SERT *knockout* (*SERTKO*), animais com perda ou deficiência no gene *slc6a4* responsável pela codificação do SERT, apresentam maior atividade serotoninérgica e um desenvolvimento e migração neuronal anormal (Riccio *et al.*, 2009).

A expressão gênica do transportador de serotonina é detectada precocemente no corpo celular de neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe de ratos entre o 11º e 12º dia da embriogênese tendo continuidade até a idade adulta em neurônios serotoninérgicos (Hansson *et al.*, 1998; Homberg *et al.*, 2010). Localizado em neurônios e nas células da glia, o SERT é encontrado em elevada densidade nos núcleos dorsal e mediano da rafe, substância negra, amígdala e núcleo dorso-lateral do tálamo (De Souza e Kuyatt, 1987). Sua expressão também se estende a neurônios não-serotoninérgicos, incluindo projeções neuronais do sistema sensorial (Tálamo, Retina, Córtex Somatossensorial), vias do Sistema Límbico (14º e 15º dias gestacionais no Hipocampo, 1º dia pós natal no Córtex Cingulado e Pré-frontal) (Homberg *et al.*, 2010). A expressão do SERT em neurônios não-serotoninérgicos finaliza rapidamente durante a segunda semana pós-natal, coincidindo com a maturação dos circuitos neurais (Homberg *et al.*, 2010). Este gene representa um marcador precoce de neurônios serotoninérgicos ou um progenitor na qual irá diferenciar neurônios serotoninérgicos. Em ratos, a expressão de SERT no encéfalo está intimamente relacionada com a distribuição da triptofano hidroxilase no corpo celular dos neurônios serotoninérgicos (Hoffman *et al.*, 1998) (Figura 6).

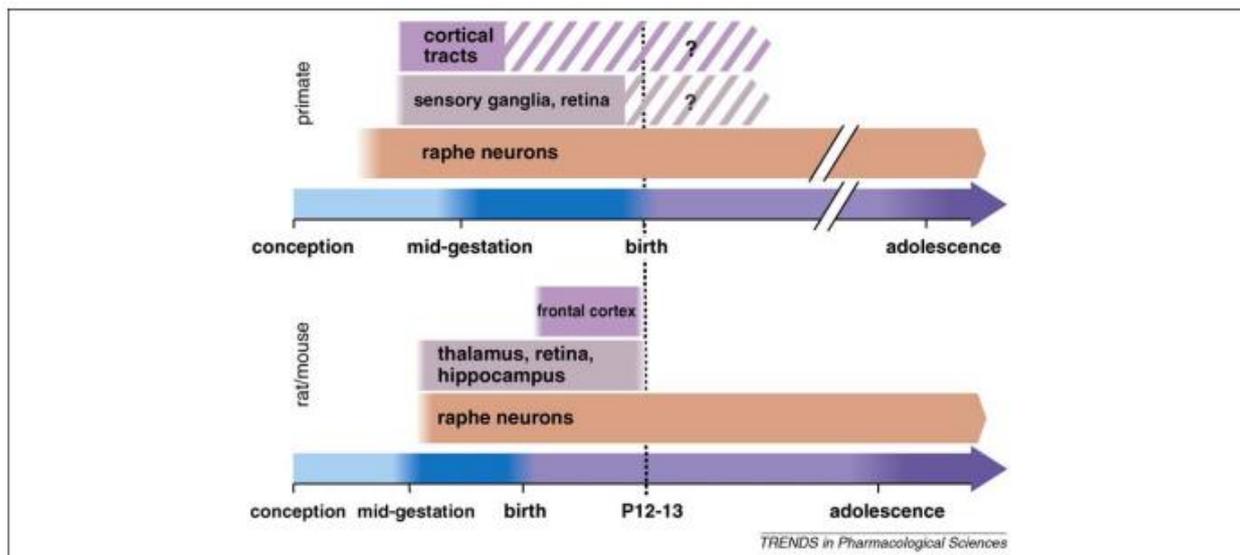


Figura 6: Escala de tempo da expressão do SERT em primatas/humanos e roedores (camundongos e ratos) durante o período de desenvolvimento embriogênico e pós-natal. (Homberg *et al.*, 2010)

Embora uma das principais funções do SERT seja terminar a sinalização da serotonina e facilitar sua reciclagem na fenda sináptica, estes transportadores não são encontrados apenas nos terminais das células neuronais próximos aos sítios de liberação vesicular, estão também localizados ao longo das membranas somatodendríticas e axonais (Tao-Cheng e Zhou, 1999). Esta distribuição do SERT em regiões além do terminal nervoso é relevante para o volume de neurotransmissão, um processo onde os neurotransmissores se difundem para pequenas distâncias antes de atuar sobre seus receptores (Daws, 2009). A regulação na função do SERT pode ocorrer a nível de transcrição ou tradução, ou ainda modificação pós-traducional, como a fosforilação. Estudos *in vitro* utilizando células que expressam SERT têm indicado que sistemas de segundo-mensageiro, particularmente ativado por proteínas quinases, podem participar da regulação da função do SERT (Zahniser e Doolen, 2001).

O SERT é o principal regulador do conteúdo sináptico e sinalização serotoninérgica. O excesso de 5-HT durante a embriogênese em animais SERT *Knockout* diminui, de maneira reversível, a velocidade de migração radial de neurônios piramidais corticais, afetando a arborização destes circuitos neurais. O receptor 5-HT₆, expresso em progenitores de neurônios piramidais, quando ativados também diminuem a velocidade de migração dos neurônios piramidais (Riccio *et al.*, 2011). Estes achados suportam a hipótese que desregulação na homeostase

serotoninérgica durante o desenvolvimento pode afetar a formação do circuito neocortical e contribuir para o aumento da vulnerabilidade de desordens psiquiátricas (Riccio *et al.*, 2011). Mecanismos compensatórios e alterações neuroadaptativas ocorrem em animais SERT *knockout* (*SERTKO*) durante o período embrionário e subsequente neurodesenvolvimento (Bengel *et al.*, 1998). Camundongos *SERTKO* apresentam concentrações e liberação de 5-HT aumentadas no córtex e no estriado (Mathews *et al.*, 2004). Como resultado de uma reciclagem deficiente de serotonina, estes animais apresentam alterações compensatórias, como o aumento da síntese e turnover da 5-HT em regiões encefálicas (Bengel *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005). O consequente aumento dos níveis extracelulares da serotonina amplia e estende a duração de sua sinalização em receptores 5-HT alterando o estado homeostático de todo o sistema serotoninérgico (Mathews *et al.*, 2004). Durante o período crítico de desenvolvimento, o sistema serotoninérgico apresenta um importante controle dos processos biológicos envolvidos com o desenvolvimento adequado do SNC, em virtude de sua grande distribuição no SNC, este sistema influencia funções fisiológicas relacionadas à manutenção do balanço energético, como manutenção do apetite, termogênese, ritmos circadianos, controle do peso corporal, locomoção e comportamento alimentar (Sodhi e Sanders-Bush, 2004).

Serotonina e Ingestão alimentar

A serotonina participa da modulação do controle da ingestão de alimentos em roedores e humanos (Blundell e Halford, 1998; Leibowitz e Alexander, 1998). A 5-HT parece ter uma relação inversa com o consumo energético, pois promove redução da ingestão alimentar por estimular a saciedade em ratos (Blundell e Halford, 1998). O comportamento alimentar em roedores pode ser observado a partir do modelo experimental de Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) (Halford e Blundell, 1996; Oliveira *et al.*, 2011). Este modelo inicialmente caracterizou a ingestão alimentar seguida por uma sequência de comportamentos de atividade, limpeza e descanso. Esta sequência está associada ao término natural da alimentação e promoção da saciedade (Antin *et al.* 1975). A relação entre a serotonina e a promoção de saciedade é ratificada por estudos que demonstraram a elevação nos níveis de serotonina no hipotálamo como fator desencadeante da

saciedade (Schreiber *et al.*, 2000) e sua redução como estimulante da ingestão (Halford *et al.*, 2005).

No hipotálamo, a serotonina exerce função importante na seleção de macronutrientes, tamanho da refeição e peso corporal (Leibowitz *et al.*, 1989; Leibowitz e Alexander, 1998). O hipotálamo possui função importante na transmissão e integração entre sinais centrais e periféricos do balanço energético no encéfalo, associando as informações periféricas com informações centrais de fome e saciedade. Recebe aferências periféricas provindas do trato gastrointestinal, pâncreas, fígado e tecido adiposo (Morton *et al.*, 2006). Esta pequena região situada no sistema límbico tem papel central em mediar respostas ao estresse, regular a temperatura corporal, sono, sede e estabilizar os ritmos circadianos. Localizado no terceiro ventrículo e altamente vascularizado na eminência mediana, uma área com uma porosa barreira hemato-encefálica (Rodriguez *et al.*, 2010). O hipotálamo é composto por diversos núcleos, dentre os mais importantes relacionados ao controle da ingestão alimentar e gasto energético estão, os núcleos arqueado (Arc), ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH), paraventricular (PVN) e a área do hipotálamo lateral (LH) (Meister, 2007). Em especial, o núcleo arqueado aparece como uma estrutura chave para a integração e controle das informações relacionadas ao controle do comportamento alimentar. Este núcleo fica localizado entre a eminência mediana e o terceiro ventrículo (Cone, 2005).

O hipotálamo também recebe inervação a partir do Núcleo do Trato Solitário (NTS), estrutura localizada no tronco encefálico que transmite sinais via nervo vago para o trato gastrointestinal e outros tecidos viscerais (Sawchenko *et al.*, 1985; Cunningham e Sawchenko, 1988). Os vários núcleos hipotalâmicos recebem outras projeções de outras áreas encefálicas envolvidas com o balanço energético, incluindo núcleos do tronco encefálico, córtex olfatório e áreas relacionadas ao sistema de recompensa como o corpo estriado (Gao e Horvath, 2007). Suas fibras neuronais expressam neuropeptídeos que atuam no controle da ingestão alimentar e gasto de energia: a Proteína Relacionada ao Agouti (AgRP), o Neuropeptídeo Y (NPY), a Pro-ópiomelanocortina (POMC) e o Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina (CART). Estes neuropeptídeos estão organizados em dois grupos de neurônios nos núcleos Arc, neurônios que expressam AgRP e NPY, estimulam a ingestão alimentar e reduzem o gasto de energia, enquanto os neurônios POMC e

CART estimulam a redução da ingestão do alimento e induzem ao aumento do gasto energético (Morton *et al.*, 2006). A localização deste núcleo permite uma maior sensibilidade neuronal a informações hormonais providas através de vias sanguíneas e sinais nutricionais relevantes para o equilíbrio do balanço energético (Morton *et al.*, 2006).

A neurogênese hipotalâmica no adulto ocorre em menor proporção, mas é essencial para a regulação da ingestão alimentar e peso corporal (Pierce e Xu, 2010). Durante a embriogênese, precursores neuronais hipotalâmicos são gerados entre o 10.5º e 14.5º dia de gestação (Padilla *et al.*, 2010; McNay *et al.*, 2012) e persiste até o roedor adulto (Lee *et al.*, 2012). Essas células expressam neuropeptídeos importantes para a regulação da ingestão alimentar e controle do peso corporal (Sousa-Ferreira *et al.*, 2014). Após incubação perinatal com fluoxetina por cinco semanas em neuroesferas hipotalâmicas (E18-19), células-tronco progenitoras, apresentam alteração em parâmetros morfológicos e genéticos (Sousa-Ferreira *et al.*, 2014). As neuroesferas hipotalâmicas expostas à fluoxetina são maiores que as neuroesferas controles, apresentando maior diâmetro (Sousa-Ferreira *et al.*, 2014). Neste estudo, a fluoxetina perinatal promoveu um significativo *upregulation* nos níveis de BDNF em neuroesferas hipotalâmicas. Esta molécula apresenta função importante para o neurodesenvolvimento e maturação do hipotálamo (Sousa-Ferreira *et al.*, 2014).

Alterações na proliferação durante o neurodesenvolvimento hipotalâmico pode levar a distúrbios entre neurônios orexígenos e anorexígenos (Desai *et al.*, 2011), estas células progenitoras do hipotálamo expressam importantes neuropeptídeos como NPY, AgRP, POMC, CART, responsáveis pelo controle da ingestão alimentar (Sousa-Ferreira *et al.*, 2011). A exposição perinatal a fluoxetina induziu o aumento na expressão de AgRP e NPY, em neuroesferas hipotalâmicas, mediado seu pelo efeito proliferativo. Este efeito não foi observado em células controles (Sousa-Ferreira *et al.*, 2014). No entanto, este aumento não foi observado em neuroesferas hipotalâmicas que expressam neuropeptídeos anorexígenos, POMC e CART. Em células neuroprogenitoras hipotalâmicas diferenciadas, a presença de fluoxetina promove diminuição nos níveis de mRNA de NPY e CART. Os níveis de AgRP e POMC não apresentaram alterações (Sousa-Ferreira *et al.*, 2014).

Os neurônios serotoninérgicos, a partir dos núcleos da rafe, enviam projeções para o hipotálamo e podem controlar o comportamento alimentar e o balanço energético (Davidowa e Plagemann, 2000). Cada função da serotonina pode ser mediada por uma variedade de receptores para 5-HT localizados em células neuronais e não neuronais (Lauder, 1990). Alguns receptores têm íntima relação com o comportamento alimentar, o 5-HT_{1A} (Gur *et al.*, 2003), 5-HT_{1B} (Simansky e Nicklous, 2002) e 5-HT_{2C} (Hewitt *et al.*, 2002). Os receptores 5-HT_{1A} são auto-receptores e sua estimulação inibe a liberação de serotonina na fenda sináptica dos terminais nervosos. Estudos demonstram que a exposição crônica a serotonina causa redução deste receptor, restringindo a liberação de 5-HT nos terminais nervosos e impedindo a sua função (Fabre e Hamon, 2003). A aplicação central ou sistêmica do 8-hidroxi-2-(di-n-propilamina)tetralina (8-OH-DPAT), um agonista do receptor 5-HT_{1A}, induziu aumento na ingestão alimentar (Bendotti e Samarin, 1986). No entanto, o uso do 3-(1,2,5,6-TETRA-HIDRO-4-PIRIDIL)-5-propoxypyr-olo[3,2-B]PIRIDINA (CP-94,253), agonista do receptor 5-HT_{1B}, promove redução na ingestão alimentar e aumenta a saciedade avaliada na sequência comportamental de saciedade (Halford e Blundell, 1996). E os receptores 5-HT_{2C} parecem modular o tamanho da refeição e duração do comportamento de alimentação (Wright *et al.*, 1995).

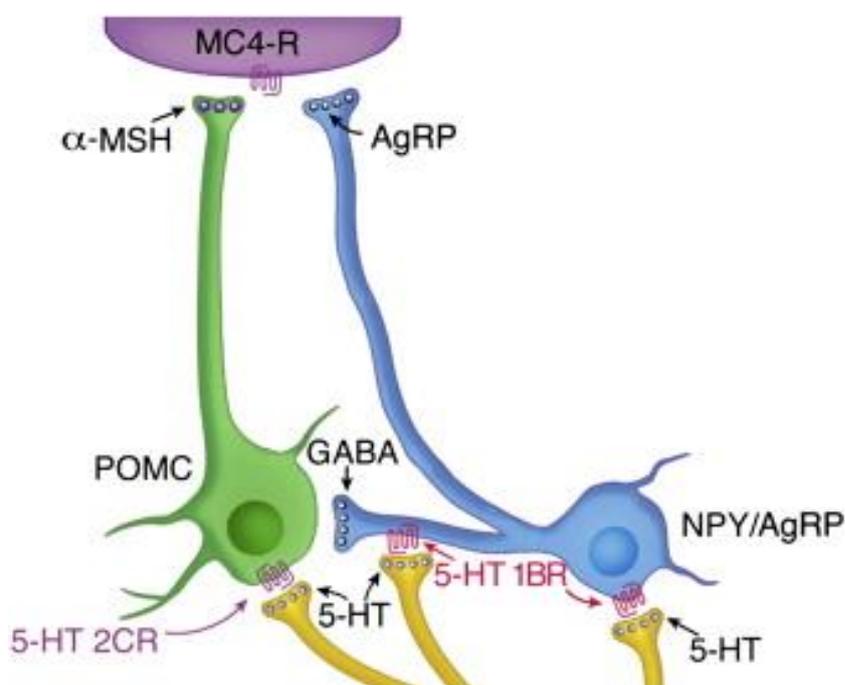


Figura 7: ação da serotonina na via das melanocortinas (Adaptado Heisler *et al.*, 2006).

Os receptores 5-HT_{1B} são expressos em neurônios AgRP do núcleo arqueado. Quando expressos em neurônios serotoninérgicos, estes receptores atuam como autoreceptores, inibindo a adenilato ciclase, hiperpolarizando o neurônio e diminuindo a liberação de serotonina (Kroeze *et al.*, 2002). No estudo de Heisler e colaboradores foi estabelecido um modelo que demonstra a relação entre os receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B} no núcleo arqueado do hipotálamo (Heisler *et al.*, 2006). Foi observado que receptores 5-HT_{1B} são expressos em neurônios AgRP, e que a aplicação do agonista deste receptor pode produzir efeitos opostos em neurônios POMC e AgRP, inibindo neurônios AgRP enquanto excita neurônios POMC. Também foi observado que os efeitos anorexígenos promovidos pelo agonista dos receptores 5-HT_{1B} necessita da ação do receptor MC4. A partir destes dados, os autores propuseram um modelo, na qual a serotonina estimula o sistema de melanocortinas através de dois processos paralelos, agindo através dos receptores 5-HT_{2C} para excitar neurônios POMC, enquanto os receptores 5-HT_{1B} suprimem a inibição de GABA em neurônios POMC por neurônios AgRP (Heisler *et al.*, 2006) (Figura 6).

Experimentos indicam que o ritmo de atividade serotoninérgica, em relação ao comportamento alimentar, possui relação com a transição do ciclo de luz dia e noite, como refletido por mudanças temporais em resposta a estimulação do receptor 5-HT_{1B} no hipotálamo medial e na liberação e utilização da serotonina endógena. O tempo de forte atividade serotoninérgica inicia no começo da ativação do período de alimentação, justamente na transição do ciclo claro e escuro de luz (Shor-Posner *et al.*, 1986; Weiss *et al.*, 1991). O início do ciclo escuro de luz, o período ativo para alimentação livre dos roedores, a estimulação serotoninérgica dos Núcleos Paraventricular (PVN) e Ventromedial (VMH) do hipotálamo, ou mesmo do SNC é mais efetiva em suprimir a ingestão alimentar e em particular, a ingestão de carboidratos (Leibowitz *et al.*, 1990; Weiss *et al.*, 1990).

Estudos demonstram que injeções centrais de serotonina ou seu precursor 5-hidroxitriptofano podem causar hipofagia e aumento na taxa metabólica em roedores (Rothwell e Stock, 1987; Le Feuvre *et al.*, 1991; Yamada *et al.*, 2006). Algumas drogas como a fenfluramina, podem aumentar as concentrações de serotonina por um mecanismo estimulatório da liberação vesicular e inibição da recaptação da serotonina, promovendo hipofagia, redução do tamanho da refeição e aumento nos

intervalos entre as refeições em roedores (Blundell *et al.*, 1975; Grinker *et al.*, 1980). Em adição, a taxa metabólica também é aumentada pela administração de fenfluramina (Rothwell e Stock, 1987; Le Feuvre *et al.*, 1991). O metabólito ativo da fenfluramina, a norfenfluramina, também pode atuar diretamente como agonista de alguns receptores da serotonina (Curzon *et al.*, 1997). A fenfluramina tem como função suprimir a ingestão de alimentos e facilitar a perda de peso corporal em humanos (Rogers e Blundell, 1979; McGuirk *et al.*, 1991). Alguns efeitos sobre a ingestão também são observados. Estudo em roedores TPH2 *knockout* demonstra que estes animais apresentam redução na ingestão alimentar e peso corporal (Yadav *et al.*, 2009). A manipulação farmacológica ou genética através da inibição do transportador da recaptção de serotonina também apresenta evidências sobre a inibição da ingestão alimentar.

A ausência do mecanismo de recaptção de serotonina, em animais SERT *knockout*, promove aumento nas concentrações extracelulares de serotonina (Mathews *et al.*, 2004). Apesar da característica hipofágica da serotonina, estes animais apresentam um fenótipo obeso em idade adulta (Warden *et al.*, 2005; Murphy e Lesch, 2008). O mecanismo pelo qual este fenótipo obeso se apresenta nestes animais ainda não foi totalmente compreendido. Estes roedores obesos não apresentaram hiperfagia, porém demonstram um comportamento exploratório alterado, são hipoativos e demonstram reduzida atividade locomotora na gaiola (Holmes *et al.*, 2002). Este fenótipo obeso pode ser revertido em animais SERT *upregulation* (Jennings *et al.*, 2006). Este animal apresenta peso corporal reduzido e não possui alteração na ingestão alimentar (Pringle *et al.*, 2008).

Inibição da Recaptção de Serotonina durante o desenvolvimento

A inibição da recaptção de serotonina e seus efeitos à longo prazo vêm sendo estudados ao longo dos anos. O transportador de serotonina é alvo de um conjunto de fármacos denominados Inibidores Seletivos da Recaptção de Serotonina (ISRS) que atuam particularmente no bloqueio, prolongando a distribuição espaço-temporal da serotonina extracelular (Blakely *et al.*, 1991). Os ISRS ligam-se diretamente neste sítio de recaptção, visto sua semelhança com o principal substrato do SERT, a serotonina, impedindo sua função (Ravna *et al.*, 2006). A utilização de ISRS durante a gestação ou infância pode modificar

propriedades de neurônios que expressam SERT através de alterações na sua transcrição específica ou mudanças em sua expressão gênica (Narboux-Nême *et al.*, 2008). Evidências demonstram ajustes morfofuncionais do sistema nervoso em resposta a inibição da recaptação da serotonina durante períodos de vulnerabilidade de desenvolvimento do sistema nervoso.

O uso neonatal de citalopram, outro ISRS, reduziu a expressão do SERT no córtex e a enzima triptofano hidroxilase no núcleo dorsal da rafe dos animais após o desmame. A reduzida expressão do SERT persistiu até a idade adulta (Maciag *et al.*, 2006). Em contraste aos efeitos prolongados da exposição neonatal, o tratamento crônico com ISRS em animais adultos, não apresentou diferenças no SERT e na TPH (Maciag *et al.*, 2006). Estes dados indicam que os efeitos da exposição à ISRS durante o período de vulnerabilidade pode promover alterações prejudiciais ao sistema serotoninérgico, além de demonstrar a sensibilidade deste período de crítico do desenvolvimento do sistema nervoso. O bloqueio do SERT pelo citalopram durante toda a lactação promoveu alterações de crescimento, como a redução do crescimento corporal e retardo na maturação de características físicas em roedores (Deiró *et al.*, 2004), até modificações celulares como redução do tamanho de fibras tálamo-corticais e de sua arborização nos terminais nervosos (Xu *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009). As repercussões dessa inibição podem se manifestar na vida adulta em diferentes adaptações celulares, como redução na sensibilidade de receptores serotoninérgicos (Hjorth *et al.*, 2000) e número de neurônios serotoninérgicos (Mendes da Silva *et al.*, 2010). Exposição neonatal a citalopram leva a uma anormal morfologia do soma e axônios de oligodendrócitos, assim como, alteração na mielinização em axônios do corpo caloso, demonstrando anormalidades na rede neural e conectividade interhemisférica (Simpson *et al.*, 2011).

O tratamento crônico com citalopram, do 8º ao 21º dia de vida, em roedores produz redução na expressão da triptofano hidroxilase em subgrupos dos Núcleos da Rafe e redução da densidade em fibras do córtex imunorreativas ao SERT (Maciag *et al.*, 2006). Uma clara redução no comportamento de exploração à novos objetos foi evidenciado no 39º dia de vida roedores que foram expostos ao citalopram do 8º ao 21º dia de vida. Também redução na densidade de fibras imunorreativas ao SERT em áreas límbicas, como hipocampo e córtex pré-frontal medial, e áreas sensoriais do córtex como córtex somatossensorial primário e córtex

auditivo (Simpson *et al.*, 2011). A maioria dos axônios de fibras imunorreativas ao SERT apresenta uma aparência morfológica diferente do arranjo típico de botões sequencialmente conectados nestas fibras de fino calibre, observadas no córtex préfrontal medial e córtex somatossensorial (Maciag *et al.*, 2006). Reduzida imunorreatividade da TPH ao longo da linha média da Rafe, nos subgrupos Dorsomedial e Ventromedial do Núcleo Dorsal da Rafe, bem como no Núcleo Mediano da Rafe após exposição neonatal ao citalopram (Simpson *et al.*, 2011). A exposição à fluoxetina ou fluvoxamina (10mg) durante o 4º e 21º dia de vida pós-natal em animais transgênicos GFP (*Green Fluorescent Protein*) promove efeitos diferentes em células piramidais do córtex cerebral aos 22 dias de idade. A fluoxetina reduz a densidade de dendritos basais e a fluvoxamina reduz a densidade de dendritos apicais no hipocampo (Zheng *et al.*, 2011). À longo prazo a exposição neonatal com fluoxetina promove aumento de dendritos basais e apicais do córtex cerebral nos roedores aos 90 dias de vida (Zheng *et al.*, 2011). Esta diferença pode ser compreendida pelo possível aumento nos níveis de serotonina, promovidos pelo bloqueio neonatal da recaptação realizada pelo SERT modificando o metabolismo e sinalização serotoninérgica (Zheng *et al.*, 2011).

Exposição à ISRS durante o período crítico, afeta a expressão gênica, sinalização neuronal, metabolismo protéico e plasticidade neural no encéfalo de roedores podendo promover disfunções funcionais (Homberg *et al.*, 2010; Olivier *et al.*, 2011; Simpson *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011). Exposição à ISRS durante a gestação promoveu menor nível da proteína reelin, um marcador de neurodesenvolvimento, migração e maturação neuronal. Durante a gestação, esta proteína apresenta uma redução normal com o aumento da idade gestacional, no entanto, em crianças cujas mães foram expostas à ISRS durante a gestação, apresenta-se um menor conteúdo podendo ser um indicativo para um acelerado neurodesenvolvimento induzido pelo aumento da atividade serotoninérgica (Brummelt *et al.*, 2012). Bem como, também são observadas adaptações comportamentais frente demanda ambiental, como redução do comportamento exploratório, maior reatividade a estímulo sonoro, redução da atividade motora, redução na ingestão alimentar (Zheng *et al.*, 2011; Rodriguez-Porcel *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2008). A exposição precoce à fluoxetina diminui a interação social e exploração associado aos comportamentos de ansiedade e depressão (Kiryanova *et*

al., 2013). Outros comportamentos também apresentam alteração, atividade locomotora, comportamento sexual, agressão, sono e resposta à recompensa (Olivier *et al.*, 2011).

No estudo Hjorth e colaboradores (2000), o bloqueio do transportador pela fluoxetina, permitiu a estimulação e ativação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}, produzindo a inibição na taxa de disparo dos neurônios 5-HT (Gardier *et al.*, 1996). Este aumento parece ocorrer, a princípio, no corpo celular e dendritos, consideravelmente nos núcleos dorsal e mediano da rafe (Bambrilla *et al.*, 2005). O maior conteúdo extracelular de serotonina, promovido pelo bloqueio do SERT por antidepressivos, resulta em uma redução na liberação de 5-HT pela vesícula, devido a ativação do mecanismo de *feedback* negativo facilitado pelo receptor 5-HT_{1A} (Piñeyro e Blier, 1999). No entanto, a exposição crônica à fluoxetina provoca a dessensibilização dos auto-receptores 5-HT_{1A}, bem como 5-HT_{1B}, impedindo o controle da neurotransmissão serotoninérgica por estes receptores, o que conseqüentemente permite o aumento no disparo serotoninérgico e acúmulo de serotonina na fenda sináptica (Hjorth *et al.*, 2000; Stenfors e Ross, 2002). No estudo de Tao e colaboradores (2002), a infusão de fluoxetina no hipotálamo de animais adultos promoveu o aumento de 5-HT. Quando utilizado um agonista do auto-receptor 5-HT_{1A}, o aumento inicial dos níveis de 5-HT promovido pela fluoxetina foi atenuado.

A perda da função e o bloqueio farmacológico do receptor 5-HT_{1A} durante o período pós-natal causa aumento da ansiedade no adulto (Vinkers *et al.*, 2005). Os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} regulam efeitos comportamentais sobre a ansiedade e o comportamento depressivo observado em resposta à administração da fluoxetina SSRI no início da vida. Estas observações fornecem um forte apoio para o equilíbrio entre os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} na regulação da sinalização durante a janela crítico-temporal e o surgimento da ansiedade. A vida pós-natal representa um período crítico onde a neurotransmissão serotoninérgica é hipotetizada para regular o amadurecimento do neurocircuito emocional, programando, assim, efeitos duradouros sobre a emotividade (Sarkar *et al.*, 2013).

No estudo de Sarkar e colaboradores (2013), foram encontrados resultados sobre a ação dos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} através do uso concomitante de agonistas, antagonistas e fluoxetina durante a lactação a fim de compreender a

ação destes receptores no desenvolvimento da ansiedade. Dentre os achados estão que o tratamento pós-natal com antagonista dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} impediu o desenvolvimento de ansiedade no roedor adulto causada pela fluoxetina pós-natal. O bloqueio seletivo do receptor 5-HT_{2A} evitou a ansiedade e o comportamento depressivo causados pela fluoxetina pós-natal, enquanto o bloqueio do receptor 5-HT_{2C} evitou a ansiedade, porém não foi eficaz em evitar a depressão. A estimulação pós-natal do receptor 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} causou comportamento de ansiedade no animal adulto e o bloqueio do receptor 5-HT_{1A} não alterou a ansiedade causada pela fluoxetina pós-natal, porém causou ansiedade em animais controles, um efeito atenuado pelo bloqueio concomitante dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}. O tratamento pós-natal com cetanserina bloqueia alterações transcricionais específicas observadas no Córtex Pré-frontal após tratamento fluoxetina pós-natal (Sarkar *et al.*, 2013).

A exposição perinatal a fluoxetina promove uma inibição na diferenciação neuronal de células neuroprogenitoras hipotalâmicas e mantém um estado indiferenciado. Um reduzido percentual de marcação NeuN, um marcador de neurônios maduros (Sousa-Ferreira *et al.*, 2014). Estes achados demonstram da influência ambiental, a partir da exposição a fluoxetina durante o período perinatal e sua importância para a neurogênese e plasticidade metabólica hipotalâmica. No presente estudo, utilizando a fluoxetina, como modelo para a manipulação do sistema serotoninérgico será possível fornecer subsídios para melhor compreensão dos efeitos de insultos ambientais durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso aos aspectos fenotípicos e moleculares relacionados ao sistema serotoninérgico de animais jovens.

Esta revisão da literatura expõe a importância da compreensão do uso de fluoxetina pós-natal no surgimento de patologias na vida adulta, assim como, os mecanismos e receptores serotoninérgicos responsáveis pelo controle da homeostase do sistema serotoninérgico durante o período de desenvolvimento do sistema nervoso. O desenvolvimento de ansiedade, obesidade e outras patologias parecem estar associadas à necessidade do organismo responder a um estímulo que requer uma maior atuação dos sistemas de controle do organismo, como o sistema serotoninérgico. As respostas fisiológicas destes animais apresentam uma resistência quando são requisitadas em estímulos agudos, demonstrando que estes

organismos podem desenvolver adaptações de acordo com as manipulações sofridas no período crítico, porém não são capazes que solucionar as demandas de um novo ambiente quando requisitados. Estes estudos clareiam o entendimento das possíveis alterações provocadas pela exposição à ISRS durante o período crítico do sistema nervoso, no entanto, ainda são necessários entendimentos mais aprofundados sobre os efeitos da exposição à fluoxetina neonatal a organismos mais jovens.

3. HIPÓTESE

A exposição à fluoxetina durante a lactação promove aumento no conteúdo de serotonina e redução do seu transportador no hipotálamo e tronco encefálico, associados à redução da ingestão alimentar.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da exposição à fluoxetina durante o período de lactação em componentes do sistema serotoninérgico no hipotálamo e tronco encefálico e o efeito sobre a ingestão alimentar de animais jovens.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar nos filhotes machos durante a lactação e/ou aos 21, 40 e/ou 41 dias de vida:

- Evolução do peso corporal,
- Ingestão alimentar,
- Conteúdo protéico de serotonina no hipotálamo,
- Perfil molecular do transportador de serotonina no hipotálamo: expressão gênica e densidade protéica total.

Avaliar nos filhotes machos aos 75 dias de vida:

- Imunorreatividade ao SERT no hipotálamo e tronco encefálico.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição – UFPE. Fêmeas primíparas foram transportadas para o biotério de experimentação do Departamento de Anatomia – UFPE, onde tiveram um período de adaptação de quinze dias sob condições padrão de biotério com temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas invertido (escuro: 6:00h às 18:00h / claro: 18:00h às 6:00h) e livre acesso à água *ad libitum* e à alimentação (ração comercial Labina® – Purina S/A) segundo recomendação ética do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Para a realização do estudo, foi obtida aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) (Processo nº: 23076.008725/2012-18) (ANEXO A).

Aos 120 dias de vida as ratas foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho. A prenhez foi diagnosticada pela presença de espermatozóide no esfregaço vaginal, quando confirmada as fêmeas foram alocadas em gaiolas individuais. Para a confirmação da gestação o ganho de peso corporal foi acompanhado. Um dia após o nascimento, foi considerado o primeiro dia de vida dos filhotes e foi realizada randomização aleatória dos filhotes com peso corporal ideal (6g a 8g) mantendo oito filhotes por nutriz, sendo quatro filhotes de cada grupo experimental, até o 21º dia de vida quando foram desmamados e alocados em gaiolas com um total de quatro filhotes por gaiola até a realização das análises.

5.2 Grupos Experimentais

Inicialmente, os grupos experimentais foram obtidos aleatoriamente de acordo com o tipo de manipulação oferecida. Para manipulação farmacológica foi utilizado o inibidor seletivo de recaptção de serotonina, fluoxetina (10mg/Kg, 10µl/g), durante o período de lactação. A droga foi obtida na forma de cloridrato de fluoxetina e foi dissolvida em solução salina (NaCl 0.9%). Os animais receberam o tratamento uma hora após o início do ciclo escuro (7:00h). A concentração usada neste estudo foi determinada em estudo prévio de relação dose-efeito (Mendes *et al.*, 2002).

Grupo Salina (S): Os filhotes machos receberam solução salina (NaCl 0.9%, 10µl/g) via subcutânea no dorso, diariamente, do 1º ao 21º dia de vida.

Grupo Fluoxetina (F): Os filhotes machos receberam solução com fluoxetina (10mg/Kg, 10µl/g), diariamente, via subcutânea no dorso, do 1º ao 21º dia de vida.

5.3 Análises Experimentais

5.3.1 Peso Corporal

5.3.1.1 *Peso Corporal Neonatal*

O peso corporal das fêmeas durante a gestação foi obtido semanalmente. Durante o período de lactação (1º ao 21º dia de vida) o peso corporal dos filhotes foi obtido diariamente no mesmo horário, às 7 horas da manhã, no início do ciclo claro.

5.3.1.2 *Peso Corporal Pós-Natal*

O peso corporal após a lactação, o peso corporal foi registrado aos 40 dias de vida, às 7 horas da manhã, no início do ciclo claro.

5.3.2 Ingestão Alimentar

5.3.2.1 *Ingestão Alimentar Relativa*

Após o desmame a ingestão alimentar foi acompanhada no período de 24 horas do 33º dia e no 35º dia de vida. Nestes dias foi oferecida uma quantidade conhecida de ração (R1) padrão de biotério (Labina). Após o período de 24 horas, a ração foi novamente pesada (R2) e a ingestão alimentar foi determinada pela diferença entre R1 e R2 ($R1 - R2 = \text{Ingestão}$).

5.3.2.2 Ingestão Alimentar em Jejum

A ingestão alimentar de dieta padrão (Labina) foi mensurada após 12 horas de jejum aos 49 dias de vida. Foi oferecida uma quantidade conhecida de ração (R1) padrão de biotério (Labina) e após o período de 4 horas com a oferta da ração.

5.3.2.3 Ingestão Alimentar com estímulo agudo

Os animais foram separados em gaiolas individuais no 33º dia de vida para um período de adaptação a gaiola. Aos 40º dia de vida, após jejum de 3 horas, foi oferecida uma quantidade conhecida de ração e a ingestão avaliada 1 hora depois, pela subtração do peso da ração rejeitada pelo peso inicial ofertado (gramas). A ingestão foi aferida novamente após 24 horas, pela subtração do rejeito encontrado pelo peso inicial de ração ofertada. Aos 41º dia de vida, os animais foram expostos a 3 horas de jejum e receberam, em seguida, uma dose aguda da fluoxetina (10mg/Kg, 10µl/g). Após 30 minutos da aplicação, o alimento foi ofertado e o consumo de uma hora foi avaliado.

5.3.3 Conteúdo Protéico de Serotonina

Os animais dos grupos experimentais foram sacrificados aos 21 dias, após a aplicação farmacológica, e 40 dias por decaptação para obtenção dos encéfalos. Após abertura do crânio, o encéfalo foi removido da cavidade craniana e foi dissecado o hipotálamo. Os tecidos foram acondicionados em tubos isolados e imediatamente congelados em gelo seco, sendo em seguida acondicionados em freezer -82 C° até o momento da análise.

Homogeneizado de tecido: A estrutura encefálica coletada foi colocada individualmente em tubos contendo 1 ml de 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA e 1 mM EGTA, e homogeneizado com um homogenizador Ultra-Turrax (tipo TP 18/10; Janke & Kunkel KG, Staufen, Alemanha). O homogeneizado foi centrifugado a 11,000 g a 4º graus durante 30 minutos. O resultado do sobrenadante aliqotado para determinar os níveis de 5-HT. O extrato do tecido foi utilizado para determinar a concentração de proteínas (Mateos *et al.*, 2008). Após a homogeneização a concentração de proteínas foi determinada através do método de Bradford. Este método consiste da formação de um composto de absorção de cor azul entre os resíduos de aminoácidos básicos de proteínas e o corante azul de Comassie. A

absorbância depende do conteúdo de aminoácidos e proteínas presente no tecido (Bradford, 1976).

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

5.3.4 Análises Moleculares do Transportador de Serotonina

Os animais dos grupos experimentais foram sacrificados aos 21 dias, após a aplicação farmacológica, e 40 dias por decaptação para obtenção dos encéfalos. Após abertura do crânio, o encéfalo foi removido da cavidade craniana e foi dissecado o hipotálamo. Os tecidos foram acondicionados em tubos isolados e imediatamente congelados em gelo seco, sendo em seguida acondicionados em freezer -82 C° até o momento da análise.

5.3.4.1 Expressão Gênica do SERT

O RNA total foi isolado de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante Invitrogen, logo após, a quantidade e qualidade do RNA purificado foi avaliada utilizando espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, EUA). Em seguida, o RNA foi tratado com tampão de Wipeout gDNA (Qiagen®, Hilden, Alemanha) para remover de maneira eficaz a contaminação do DNA genômico durante 2 min a 42 ° C e armazenado em gelo. Depois, 2,0g de RNA purificado

foram transcritos utilizando o kit de transcrição reversa QuantiTect (Qiagen®, Hilden, Alemanha), a 42°C durante 15 minutos e a enzima foi inativada a 95°C durante 3 minutos, no volume total de 20 (1 em RNase água livre). A preparação de cDNA foi armazenada a -20°C até sua utilização. Em seguida, 5µl de cada amostra de cDNA diluído foram utilizados como modelo para a amplificação por PCR usando SYBR Green (Qiagen®, Hilden, Alemanha) como corante intercalando e o instrumento o Fluorogenic e o Real-Time PCR - Rotor-Gene HRM 2Plex (Qiagen®, Hilden, Alemanha) como sistema de detecção. Parâmetros de PCR foram: inicialmente desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 5 segundos a 95°C e 10 segundos a 60°C. Os *primers* utilizados para a amplificação estão apresentados na Tabela 1.

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

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
SERT	GCGGAGATGAGGAATGAAGATG	GGAAGAAGATGATGGCAAAGAACG
ACTIN	ACGGTCAGGTCATCACTATCG	CAGCACTGTGTTGGCATAGAG

5.3.4.2 Densidade Próteica Total do SERT

As amostras de encéfalo foram homogeneizadas utilizando um homogeneizador (Polytron PT10-35GT), adicionando para cada mg de tecido encefálico (hipotálamo) 20µl de tampão de extração. O tampão de extração contém: 10mM de EDTA, Trisma base 100mM, Pirofosfato de Na 10mM, Fluoreto de Na 100mM, PMSF 2mM, Ortovanadato de Na, Aprotinina 0,1mg/ml. Os dois últimos reagentes foram adicionados no momento da homogeneização. No homogenato será acrescentado Triton 10% e em seguida decantado por 40 min, em gelo. Após esta etapa, foi centrifugado 11000 rpm, 30 min, 4°C. Os pellets foram descartados e as proteínas totais do sobrenadante foram determinadas usando o kit DC Protein Assay Bio-Rad, com curva de albumina como padrão. As amostras foram desnaturadas à 90°C por cinco minutos, em tampão de amostra contendo β-mercaptanol.

As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), utilizando-se 30µg de proteínas totais por slot do gel. As proteínas separadas no gel foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (BIORAD). Para inibir ligações inespecíficas dos anticorpos, as membranas foram incubadas por 2 horas, a temperatura ambiente, em solução de bloqueio que continha TBS (pH 7,5, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) com 0,2% Tween-20 (T-TBS) acrescido de 3% de albumina bovina sérica (BSA), sob agitação constante. Posteriormente, as membranas foram incubadas, overnight 12h, a 4°C, sob agitação constante, com anticorpo primário anti-SERT (sc-33724, Santa Cruz, 1:1000) diluído em solução de bloqueio. Após este período, as membranas foram lavadas em T-TBS e incubadas por 1 hora e 30 minutos, a temperatura ambiente, com conjugados com peroxidase Goat anti-mouse (Jackson Immunoresearch, 1:40000) também diluído em solução de bloqueio. Após mais uma sequência de lavagens, as membranas foram incubadas com luminol (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate System – Pierce Biotechnology), seguido de leitura da quimiluminescência através da autoradiografia (Macrotec Mx-2). As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria óptica (UN-Scan-it Gel 6.1) com auxílio do programa Scion Image (Scion Corporation) e normalizadas pelo controle endógeno β -actin (ab8227).

5.3.5 Imureatividade neuronal ao Transportador de Serotonina (SERT-IR):

Aos 75 dias de vida, os animais dos grupos experimentais foram anestesiados e perfundidos a fim de obter os encéfalos para estudo da expressão de neurônios imunorreativos ao SERT nos núcleos Arqueado (Arc), Ventromedial (VMH) e Paraventricular (PVN) do Hipotálamo e os núcleos Dorsal (DR) e Mediano (MnR) da Rafe no tronco encefálico.

Perfusão transcardíaca: Após verificação de anestesia profunda os animais foram fixados em superfície apropriada para o procedimento de abertura da cavidade torácica. Em seguida, uma cânula acoplada a uma bomba peristáltica foi introduzida no ventrículo esquerdo do coração para perfusão de 150mL de solução salina (NaCl, 0,9%). Essa perfusão foi seguida da infusão de 400mL solução fixadora (4% de paraformaldeído, 4°C). Ao final da passagem do fixador, os encéfalos foram retirados do crânio e pós-fixados na mesma solução fixadora acrescida de sacarose

(20%) durante 4 horas. Após esse período, foram armazenados em solução crioprotetora (Tampão fosfato de sódio PBS - mais sacarose 20%) por 6-24 horas.

Imunohistoquímica para SERT: Os encéfalos foram crio-seccionados em cortes coronais de 40µm de espessura utilizando-se criostato (Leica-3185). Cinco séries de cortes foram coletadas, para cada animal, em placa de acrílico (25 cavidades) com solução anticongelante e armazenadas a -20°C. Uma série de cortes foi submetida a reações de imunohistoquímica contra o anti-SERT. Nesse procedimento os cortes coronais foram lavados em PBS (3 x 10 min). Em seguida foram incubados em solução com anticorpo primário anti-SERT (AB9322, feito em coelho, 1:100) (Chemicon, Temecula, CA). Após a incubação os cortes foram submetidos a lavagens em PBS (3 x 10 min) e posteriormente incubados em solução com anticorpo secundário (Sigma- B8895, 1:200) por 90 min. Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens com PBS (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 submetidos a reação de revelação imunoperoxidase com 3,3-diaminobenzidina (DAB/Sigma D5637). Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas, passarão por processos de desidratação e diafanização e foram, por fim, cobertos com lamínulas.

Análise quantitativa de neurônios SERT-IR: A análise foi realizada em microscopia óptica de campo claro. Foram verificadas células com marcação evidente nos Núcleos Hipotalâmicos: Arqueado (Arc), Ventromedial (VMH) e Paraventricular (PVN) e no Tronco Encefálico - Núcleos da Rafe: Dorsal (DR) e Mediano (MnR), e no Tronco Encefálico: Núcleo do Trato Solitário (NTS). Para cada núcleo foram considerados na análise todos os cortes coronais de uma série nos quais essas regiões tiverem sido evidenciadas. Foram quantificadas todas as células em cada corte para cada núcleo. Para delimitação das áreas marcadas foi utilizado Atlas Estereotático de Rato (Paxinos e Watson, 2007).

Para a quantificação foram considerados os intervalos de bregmas seguintes: Núcleo Arqueado do Hipotálamo: -1,72mm a -3,48mm; Núcleo Paraventricular do Hipotálamo: -0,96mm a -1,92mm; Núcleo Ventromedial do Hipotálamo: -1,72mm a -

3,36mm; Núcleo Dorsal da Rafe: -6,96mm a -8,64mm; Núcleo Mediano da Rafe: -7,20mm a -8,64mm; Núcleo do Trato Solitário: -12,00mm a -13,36mm. Os dados utilizados apresentam a média do somatório de neurônios em cada núcleo de cada animal.

As imagens dos neurônios SERT-IR no Hipotálamo e Tronco Encefálico foram realizadas a partir de fotomicrografias adquiridas por meio de uma câmara digital (Samsung SHC-410NAD) adaptada a um microscópio (Olympus BX50), e um computador (Funtech). A aquisição das imagens foi realizada utilizando a objetiva 10X e com o auxílio do software TV Turner Application e MoticlImage Plus 2.0.

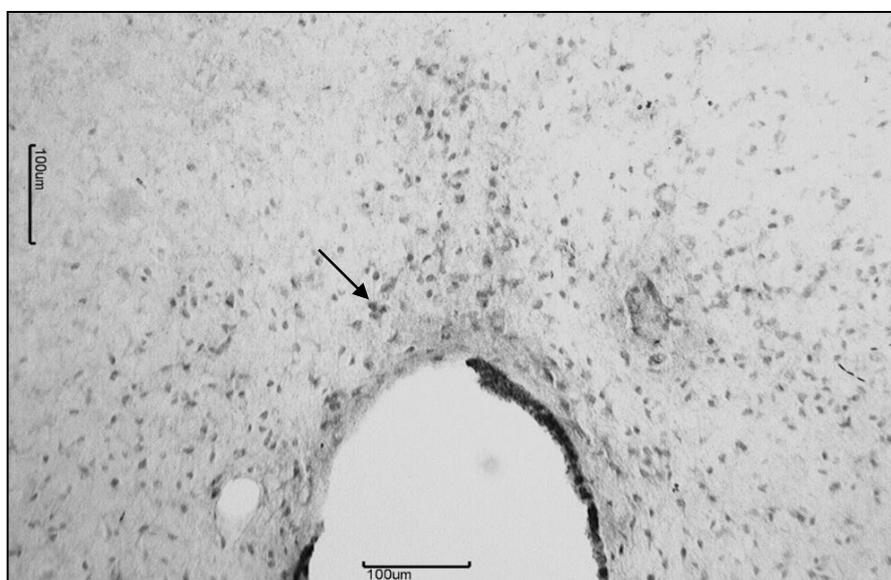


Figura 8: Representação de fotomicrografia de neurônios SERT evidenciados em marcação escura.

6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para analisar o peso corporal foi utilizado o Teste *t* Student, para a comparação entre os grupos em cada idade, os dados foram expressos em média e erro padrão da média, com nível de significância em * $p=0,01$, ** $p=0,001$ ou *** $p=0,0001$. Para avaliar a ingestão alimentar foi utilizado o Teste *t* Student, para a comparação entre os grupos em cada idade, os dados estão expressos em média e desvio padrão, com nível de significância em * $p < 0,05$. Para analisar o conteúdo de serotonina foi utilizado o Teste *t* Student, para a comparação entre os grupos em cada idade, os dados foram expressos em média e erro padrão da média, com nível de significância em ** $P < 0,006$. Para analisar a expressão gênica do SERT foi utilizado o Teste *t* Student, para a comparação entre os grupos em cada idade, os dados foram expressos em média e erro padrão da média, com nível de significância em * $p < 0,02$ e *** $p < 0,0001$. Para avaliar a quantidade de neurônios SERT foi utilizado o Teste *t* Student, para a comparação entre os grupos em cada idade, os dados estão expressos em média e erro padrão da média, com nível de significância em * $p < 0,05$. Para avaliar a expressão protéica de SERT foi utilizado o Teste *t* Student, para a comparação entre os grupos em cada idade, os dados estão expressos em média e erro padrão da média, com nível de significância em * $p < 0,03$. A análise dos dados foi realizada com o programa estatístico GraphPad Prism ® (Graph Pad Software, Inc, 2007, versão 5.03).

7 RESULTADOS

7.1 Peso Corporal

O grupo fluoxetina apresentou redução no peso corporal a partir do 11^o dia de vida (SAL: 25,7±0,6; n=10; FLU: 22,0±0,6, n=10) até o final da lactação (Figura 9A) quando comparado ao grupo salina. Após o desmame, aos 40 dias de vida, o peso corporal do grupo FLU (120,8±8,3; n=9) continuou menor comparado ao grupo SAL (153,3±8,3; n=10) (Figura 9B).

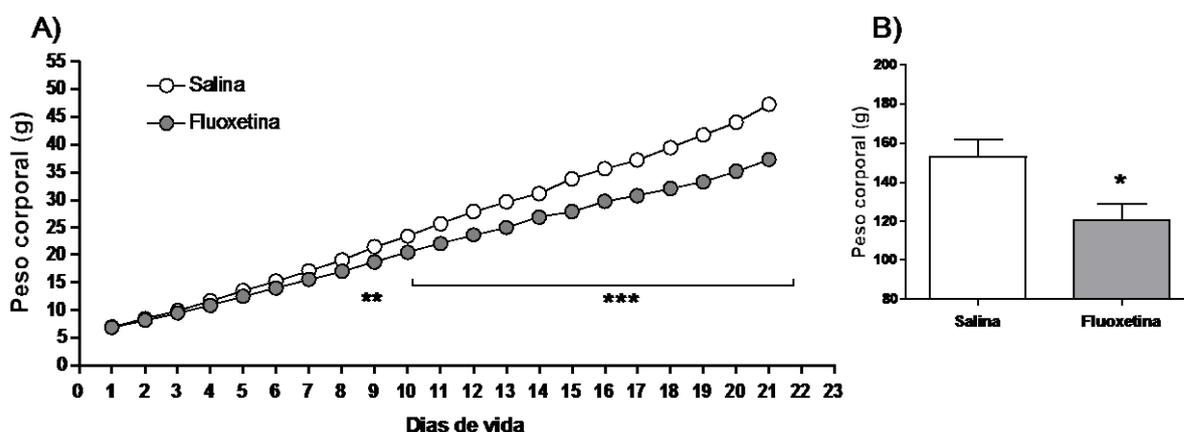


Figura 9: A) Efeito da exposição à fluoxetina durante a lactação sobre o peso corporal de ratos. Os animais receberam diariamente aplicação de solução salina (SAL) (0,9% NaCl 10ml/Kg, s.c. n=9) e fluoxetina (FLU) (10mg/Kg, 10µl/g, s.c. n=10) do 1^o ao 21^o dia de vida. **B)** O peso corporal em gramas foi aferido durante 21 dias de lactação e no 40^o dia de vida. Os dados estão expressos em Média±EP. *p=0,01, **p=0,001, ***p=0,0001, Teste t Student.

7.2 Ingestão Alimentar

7.2.1 Ingestão alimentar diária

Não houve diferença na ingestão alimentar de 24 horas entre os grupos SAL (33^o $16 \pm 1,5$ g; 35^o $16 \pm 1,4$ g, n=11) e FLU (33^o $16,7 \pm 1,8$ g; 35^o $16,2 \pm 1,1$ g, n=16) aos 33^o e 35^o dias de vida (Figura 10).

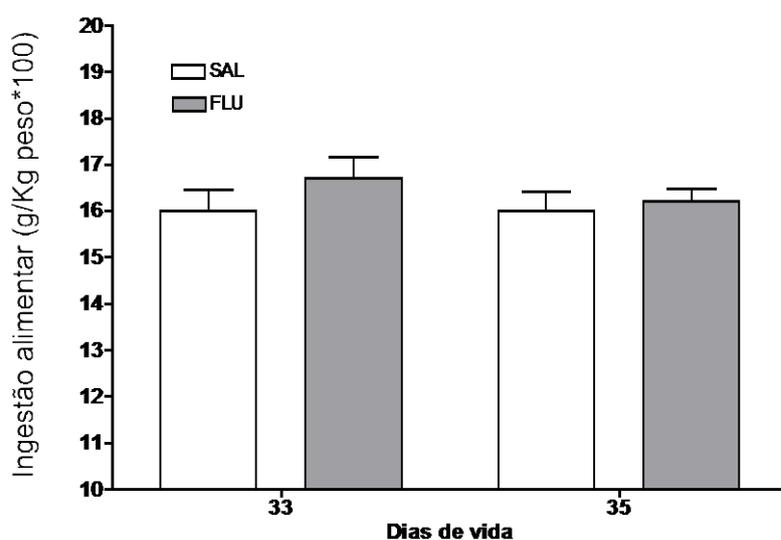


Figura 10: Efeito da exposição à fluoxetina durante a lactação sobre a ingestão alimentar de ratos. Os animais receberam diariamente aplicação de solução salina (SAL) (0,9% NaCl 10ml/kg, s.c., n=11) e fluoxetina (FLU) (10mg/Kg, 10µl/g, s.c. n=16) do 1^o ao 21^o dia de vida. A ingestão alimentar relativa (g/g peso corporal) de 24 horas foi aferida nos dias 33 e 35 de vida. Os dados estão expressos em Média \pm DP. *p < 0,05, Teste *t* Student.

7.2.2 Ingestão Alimentar após Jejum

Não houve diferença na ingestão alimentar entre os grupos SAL e FLU após jejum de 12 horas (SAL: $4,5 \pm 0,7$ g, $n=6$; FLU: $4,7 \pm 0,6$ g, $n=6$) (Figura 11).

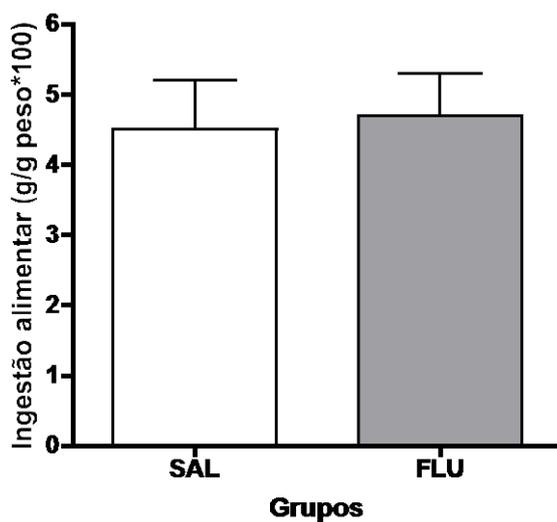


Figura 11: Efeito da exposição à fluoxetina durante a lactação sobre a ingestão alimentar após jejum. Os animais receberam diariamente aplicação de solução salina (SAL) (0,9% NaCl 10ml/kg, s.c. $n=6$) e fluoxetina (FLU) (10mg/Kg, 10 μ l/g, s.c. $n=6$) do 1^o ao 21^o dia de vida. A quantidade de alimento ingerido (g/g peso corporal) foi avaliada após 4 horas do término de jejum de 12 horas no 50^o dia de vida. Os dados estão expressos em Média \pm DP. * $p < 0,05$, Teste *t* Student.

7.2.3 Ingestão Alimentar com aplicação aguda de fluoxetina

Aplicação aguda de fluoxetina ao 41^o dia de vida promoveu redução na ingestão alimentar em ratos do grupo Salina (SAL: 3,01±0,17g; SAL+FLUaguda, 2,31±0,21g), mas não no grupo Fluoxetina (FLU: 3,36±0,22g; FLU+FLUaguda, 3,37±0,26g) (Figura 12).

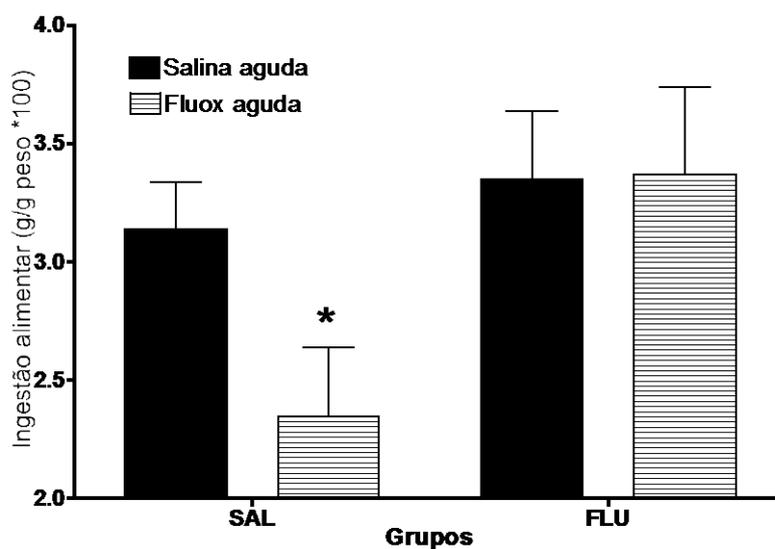


Figura 12: Efeito da fluoxetina em dose aguda sobre a ingestão alimentar de ratos expostos a fluoxetina durante a lactação. Os animais receberam diariamente aplicação de solução salina (SAL) (0,9% NaCl 10mg/kg, s.c., n=18) e fluoxetina (FLU) (10mg/Kg, 10µl/g, s.c., n=19) do 1^o ao 21^o dia de vida. Os grupos experimentais receberam dose aguda de fluoxetina uma hora antes da avaliação da ingestão alimentar no 41^o dia de vida. Os dados são expressos em Média ± EPM. *p <0,05, Teste *t* Student.

7.3 Resultados Moleculares

7.3.1 Conteúdo Protéico de Serotonina

A exposição neonatal a fluoxetina promoveu aumento no conteúdo protéico de serotonina no hipotálamo de ratos machos aos 21 dias de vida (SAL: $4,55 \pm 0,55$; $n=4$; FLU: $7,12 \pm 0,96$; $n=3$). No entanto, aos 40 dias de vida, o conteúdo de 5-HT não apresentou alteração entre os grupos (SAL: $3,87 \pm 0,49$; $n=4$; FLU: $3,55 \pm 0,46$; $n=3$) (Figura 13).

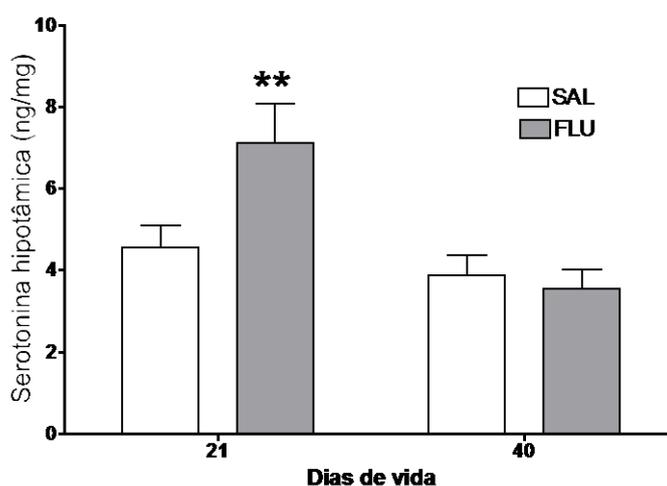


Figura 13: Efeito da exposição à fluoxetina durante a lactação sobre conteúdo protéico de serotonina no hipotálamo de ratos aos 21 e 40 dias de vida. Os animais receberam diariamente aplicação de solução salina (SAL) (0,9% NaCl 10ml/kg, s.c., $n=4$) e fluoxetina (FLU) (10mg/kg, 10 μ l/g, s.c., $n=3$) do 1^o ao 21^o dia de vida. Os dados são expressos em Média \pm EPM. As análises foram realizadas em duplicatas e houve menos de 5% de variação entre os valores obtidos. ** $p < 0,006$, Teste *t* Student.

7.3.2 Expressão Gênica do SERT

A exposição neonatal a fluoxetina promoveu redução na expressão gênica do transportador de serotonina aos 21 de vida quando comparados aos animais salina (SAL: $1,00 \pm 0,03$; $n=5$; FLU: $1,40 \pm 0,03$; $n=5$). Este aumento persistiu mesmo cessada a exposição ao fármaco, aos 40 dias de vida (SAL: $0,82 \pm 0,04$; $n=3$; FLU: $1,01 \pm 0,04$; $n=5$) (Figura 14).

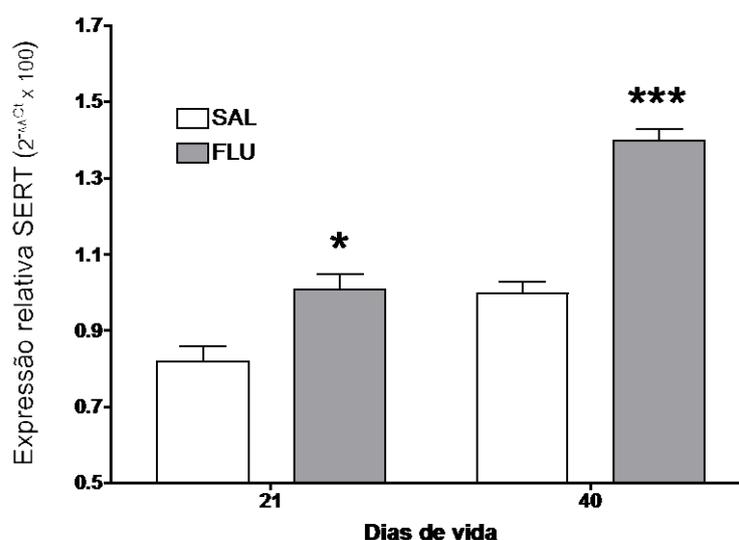


Figura 14: Efeito da exposição à fluoxetina durante a lactação sobre a expressão gênica do SERT no hipotálamo de ratos. Os animais receberam diariamente aplicação de solução salina (SAL) (0,9% NaCl 10ml/kg, s.c., $n=3$ ou 5) e fluoxetina (FLU) (10mg/kg, 10 μ l/g, s.c., $n=4$ ou 5) do 1^o ao 21^o dia de vida. Os pares de colunas representam a expressão dos níveis de mRNA de SERT em relação à β -actina endógena amplificada dentro da mesma amostra sob as mesmas condições experimentais. Os dados estão expressos em Média \pm EPM de 5 diferentes amostras de mRNA. As análises foram realizadas aos 21 e 40 dias de vida. As análises foram realizadas em triplicatas e houve menos de 5% de variação entre os valores obtidos. * $p < 0,02$; *** $p < 0,0001$, Teste t Student.

7.3.3 Densidade Próteica Total do SERT no hipotálamo

O grupo fluoxetina (FLU) apresentou maior conteúdo protéico do SERT no hipotálamo quando comparado aos animais do grupo salina (SAL) aos 21 (SAL: $100 \pm 4,47$; $n=5$; FLU: $119,25 \pm 6,47$, $n=4$) e 40 dias de vida (SAL: $92,29 \pm 3,40$, $n=4$; FLU: $117,96 \pm 8,75$, $n=4$) (Figura 15).

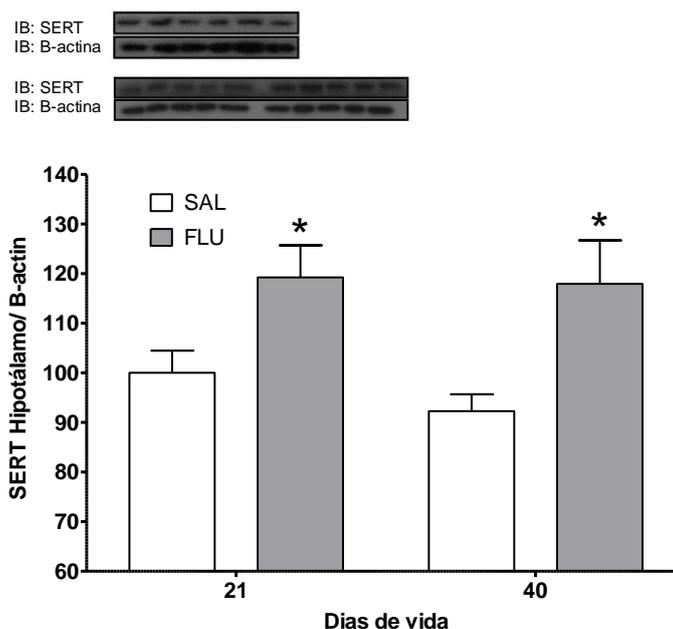


Figura 15: Efeito da exposição à fluoxetina durante a lactação sobre a expressão protéica do SERT no hipotálamo de ratos. Os animais receberam diariamente aplicação de solução salina (SAL) (0,9% NaI 10ml/Kg, s.c., $n=4$) e fluoxetina (FLU) (10mg/kg, 10 μ l/g, s.c., $n=4$) do 1^o ao 21^o dia de vida. Os pares de colunas representam a expressão dos níveis de proteína de SERT em relação à β -actina endógena. Cada par de colunas representa Média \pm EPM de 4 amostras diferentes. As análises foram realizadas em duplicatas e houve menos de 5% de variação entre os valores obtidos. * $p < 0,03$, Teste *t* Student.

7.4 Resultados Morfológicos

7.4.1 Análises quantitativa de neurônios SERT-IR no Hipotálamo

A quantidade dos neurônios imunorreativos ao SERT nos núcleos arqueado (ARC) e paraventricular (PVN) do hipotálamo foi menor nos ratos expostos à fluoxetina neonatal aos 75 dias (ARC SAL: $156,1 \pm 20,1$, $n=3$; FLU: $62 \pm 8,5$, $n=3$ / PVN SAL: $319,3 \pm 23,3$, $n=2$; FLU: $135 \pm 35,2$, $n=3$). Não houve alteração na quantidade de neurônios no núcleo ventromedial (VMH) do hipotálamo quando comparados os animais salina e fluoxetina (VMH SAL: $183,8 \pm 11,5$, $n=3$; FLU: $106,2 \pm 16,8$, $n=3$) (Figura 16).

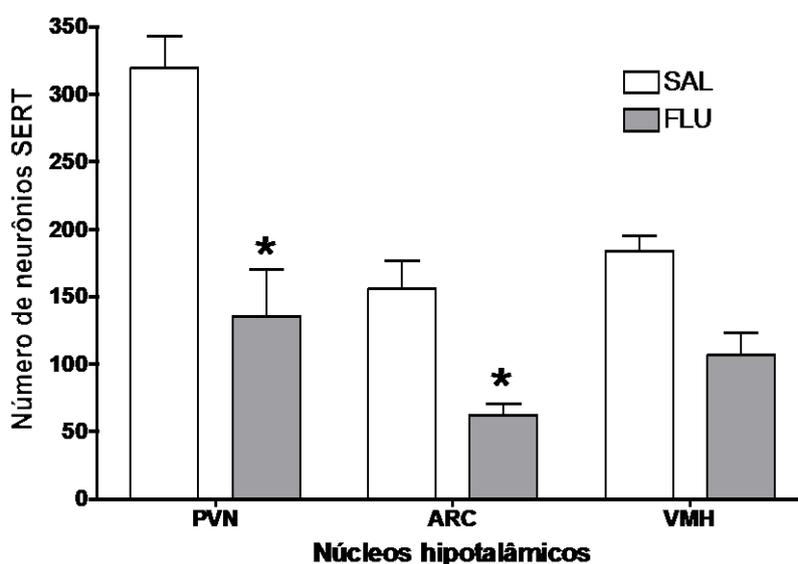


Figura 16: Efeito da exposição à fluoxetina durante a lactação sobre a quantidade de neurônios SERT-IR no hipotálamo de ratos aos 75 dias de vida. Os animais receberam diariamente aplicação de solução salina, SAL (0,9% NaCl 10ml/Kg, s.c., $n=2$ ou 3) e fluoxetina, FLU (10mg/kg, 10 μ l/g, s.c., $n=3$) do 1^o ao 21^o dia de vida. Os pares de colunas representam a quantidade de neurônios SERT. Cada par de colunas representa a Média \pm EPM de 2 ou 3 amostras diferentes. Foi considerado 5% de variação entre os valores obtidos. * $p < 0,05$, Teste *t* Student.

7.4.2 Análises quantitativa de neurônios SERT-IR no Tronco Encefálico

A quantidade dos neurônios SERT no núcleo dorsal (DR) da rafe no tronco encefálico foi menor em ratos expostos à fluoxetina neonatal aos 75 dias (DR SAL: $139,4 \pm 39,4$, $n=5$; FLU: $47,4 \pm 9,1$, $n=6$). No entanto, não houve diferença no núcleo mediano (MnR) da rafe (MnR SAL: $44,9 \pm 7,4$, $n=5$; FLU: $27,5 \pm 7,2$, $n=5$) quando comparado o animal salina e fluoxetina (Figura 17).

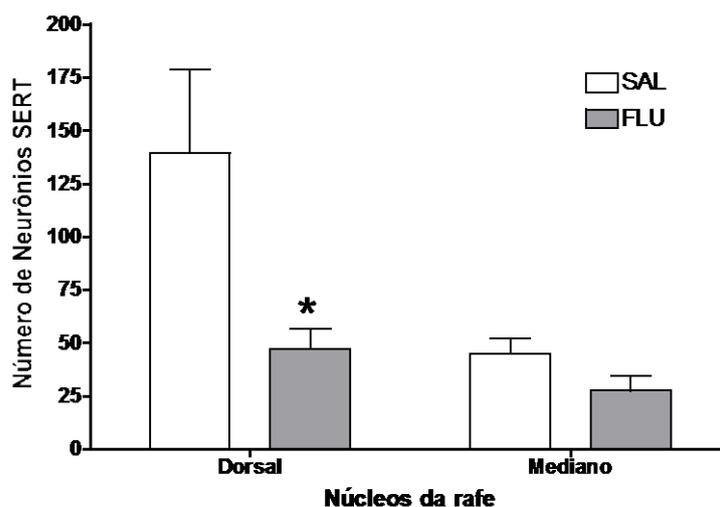


Figura 17: Efeito da exposição à fluoxetina durante a lactação sobre a quantidade de neurônios SERT-IR nos núcleos da rafe tronco encefálico de ratos aos 75 dias de vida. Os animais receberam diariamente aplicação de solução salina, SAL (0,9% NaCl 10ml/Kg, s.c., $n=5$) e fluoxetina, FLU (10mg/kg, 10 μ l/g, s.c., $n=5$ ou 6) do 1^o ao 21^o dia de vida. Os pares de colunas representam a quantidade de neurônios SERT. Cada par de colunas representa a Média \pm EPM de 2 ou 3 amostras diferentes. Foi considerado 5% de variação entre os valores obtidos. * $p < 0,05$, Teste *t* Student.

7.4.3 Análises quantitativa de neurônios SERT-IR no Tronco Encefálico

A quantidade dos neurônios SERT no núcleo do trato solitário (NTS) (NTS SAL: $109,3 \pm 21,4$ $n=3$; FLU: $128,2 \pm 38,0$ $n=4$) no tronco encefálico não sofreu alteração em consequência da exposição à fluoxetina neonatal aos animais com 75 dias de vida (Figura 18).

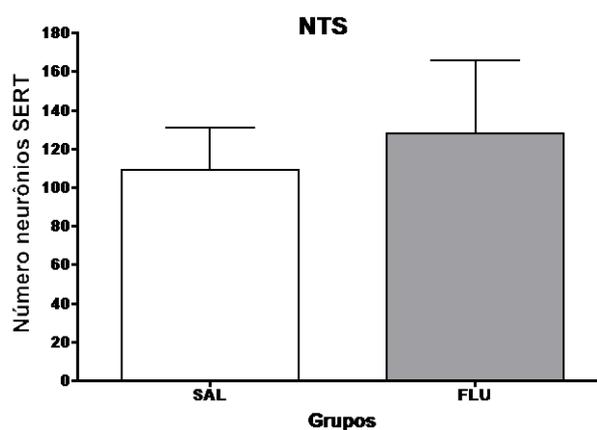


Figura 18: Efeito da exposição à fluoxetina durante a lactação sobre a quantidade de neurônios SERT-IR no núcleo do trato solitário no tronco encefálico de ratos aos 75 dias de vida. Os animais receberam diariamente aplicação de solução salina, SAL (0,9% NaCl 10ml/Kg, s.c., $n=3$) e fluoxetina, FLU (10mg/kg, 10 μ l/g, s.c., $n=4$) do 1^o ao 21^o dia de vida. Os pares de colunas representam a quantidade de neurônios SERT. Cada par de colunas representa a Média \pm EPM de 2 ou 3 amostras diferentes. Foi considerado 5% de variação entre os valores obtidos. * $p < 0,05$, Teste *t* Student.

8 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi utilizada a exposição neonatal a fluoxetina, com a finalidade de compreender os efeitos da alteração do sistema serotoninérgico durante o período crítico de desenvolvimento à longo prazo. Nossos achados demonstram que o bloqueio do SERT durante o período neonatal promoveu um menor peso corporal sem alterar a ingestão alimentar em 24 horas, ou sob o estímulo de jejum e injeção aguda de fluoxetina. Além de promover aumento na expressão gênica e protéica do SERT no hipotálamo e aumento nível de serotonina hipotalâmica retornou a normalidade após a retirada do fármaco. A quantidade de neurônios imunorreativos ao *SERT* foi menor nos núcleos arqueado e paraventricular do hipotálamo, e núcleo dorsal da rafe no tronco encefálico, e não apresentou alteração no núcleo ventromedial do hipotálamo, núcleo do trato solitário e núcleo mediano da rafe no tronco encefálico em animais jovens.

A fluoxetina neonatal induziu ao menor peso corporal a partir do 11^o dia de vida até a idade adulta. Na literatura é bem evidenciado que a exposição à ISRS durante o período neonatal provoca um fenótipo de baixo peso corporal (Manhães de Castro, 2001; Xu *et al.*, 2004; Deiró *et al.*, 2004; Lopes de Sousa, 2008; Mendes da Silva *et al.*, 2002; 2010). Semelhante aos nossos achados, animais expostos a fluoxetina na lactação têm menor peso corporal a partir do 8^o dia pós-natal (Sousa, 2008). O estudo de Mendes da Silva e colaboradores (2010) a fluoxetina neonatal reduziu 22% do peso corporal dos animais. O uso de outro ISRS, citalopram, neste mesmo período também induziu menor peso aos 21 dias de vida (Manhães de Castro, 2001; Deiró *et al.*, 2004). O uso de paroxetina (5mg/Kg) a partir do dia 0 até o dia 8 da lactação também reduz o peso corporal durante a lactação (Xu *et al.*, 2004). Este fenótipo de baixo peso corporal parece continuar presente mesmo após cessada a exposição ao ISRS. Aos 45 dias de vida, ratos com Síndrome de Down (Ts65Dn) apresentaram este fenótipo com uso de fluoxetina (Bianchi *et al.*, 2010). Aos 60, 90 e 120 dias de vida, os animais expostos a fluoxetina ou citalopram encontram-se com menor peso (Mendes *et al.*, 2002; Manhães de Castro, 2001). Aos 150 e 180 dias de vida com o uso de fluoxetina (Galindo *et al.*, 2015). Fica bem evidenciado que o uso de ISRS, mesmo em diferentes doses ou períodos de exposição, provoca uma alteração permanente neste fenótipo.

Manipulações genéticas no SERT também podem induzir alterações no peso corporal. Ratos SERT *overexpression*, animais transgênicos com elevada expressão do transportador de serotonina, apresentaram redução do peso corporal (Pringle *et al.*, 2008). De modo contrário, animais SERT *knockout*, com ausência do mecanismo de recaptação de serotonina, apresentam fenótipo obeso em idade adulta, apesar da característica hipofágica da serotonina (Warden *et al.*, 2005; Murphy e Lesch, 2008). Com o aumento na expressão do SERT, este fenótipo obeso pode ser revertido (Jennings *et al.*, 2006). Camundongos SERT *overexpressing* adultos também não apresentaram diferença na ingestão alimentar. Estes animais são menores e mais leves indicando que podem ter uma menor necessidade energética (Pringle *et al.*, 2008). Apesar da ação hipofágica da 5-HT, que se encontra aumentada nestes animais (Mathews *et al.*, 2004), o mecanismo que provoca este fenótipo obeso ainda não foi totalmente esclarecido. Estes roedores obesos não apresentaram hiperfagia, porém são hipoativos e demonstram reduzida atividade locomotora na gaiola (Holmes *et al.*, 2002). O comportamento de ingestão alimentar nestes animais geneticamente modificados não parece ser o principal responsável pela alteração do peso corporal.

A relação entre a serotonina e o gasto energético ainda não é completamente compreendida, no entanto é possível identificar alguns fatores, além da ação hipofágica da 5-HT, que participam do controle do balanço energético e poderiam ser responsáveis pelo fenótipo de baixo peso corporal observado nos animais. No núcleo arqueado do hipotálamo, neurônios que sintetizam POMC enviam projeções diretas para neurônios simpáticos, estas fibras simpáticas expressam o receptor de melanocortina MC4 e inervam o tecido adiposo marrom e branco (Song *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2008). O aumento da expressão de pomc foi observado após utilização de d-fenfluramina, e agonista de receptor 5-HT_{2C}, mcpp, e da própria serotonina (Heisler *et al.*, 2002). Agonistas serotoninérgicos podem influenciar a atividade locomotora dos animais, embora os efeitos observados parecem depender do tipo de receptor ativado. O mCPP (1-3-clorofenil-piperazina), um agonista do receptor 5HT_{2C/1B}, diminui a atividade (Heisler e Tecott, 2000), enquanto que o RU 24969, agonista do receptor 5HT_{1A/1B}, provoca hiperatividade nos animais (Tricklebank *et al.*, 1986). A administração de 5-HT nos núcleos PVN ou VMH do hipotálamo e o uso de fenfluramina parecem ativar fibras simpáticas que inervam o

tecido adiposo marrom (Sakaguchi e Bray, 1989; Arase *et al.*, 1988). O PVN apresenta conexões pós-sinápticas com o tecido adiposo marrom. O uso de microinjeções de MTHL no PVN aumenta o gasto energético e a temperatura corporal (Fan *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2008). O consumo de oxigênio aumenta após injeções periféricas de serotonina ou fenfluramina, sugerindo um aumento no consumo de oxigênio, taxa metabólica e gasto energético (Le Feuvre *et al.*, 1991; Rothwell e Stock, 1987).

Nossos achados demonstraram que a ingestão alimentar, após 12 horas de jejum, aumentou nos animais salina e fluoxetina neonatal apenas quando comparados com seu estado metabólico basal. Porém a exposição à fluoxetina neonatal não induziu alteração na ingestão alimentar de 24 horas e/ou sob o estímulo de jejum em ratos jovens quando comparados ao animal salina neonatal. Animais SERT *overexpressing* também não apresentaram diferença na ingestão alimentar de 24 horas, mesmo após o período de jejum de 1, 11 e 24 horas (Pringle *et al.*, 2008). Observando a ingestão na lactação durante a exposição a fluoxetina (1º ao 21º dia), os animais também não apresentaram diferença na ingestão alimentar no 3º, 7º e 14º dia pós-natal (Lopes de Souza, 2008). De modo contrário, muitos estudos encontram alterações na ingestão alimentar quando ocorre manipulação no sistema serotoninérgico. A 5-HT reduz a ingestão alimentar por estimular a saciedade em ratos (Blundell e Halford, 1994). A promoção de saciedade é demonstrada pela elevação nos níveis de serotonina como fator estimulante da saciedade (Schreiber *et al.*, 2000) e a redução de 5-HT como estimulante da ingestão (Halford *et al.*, 2005). O uso de agonista do receptor 5-HT_{2c} reduz a ingestão alimentar (Heisler *et al.*, 2006). A aplicação de agonistas do receptor 5-HT_{1B} no núcleo paraventricular e parabraquial do hipotálamo também reduz a ingestão alimentar em ratos (Lee *et al.*, 1998). A dexfenfluramina suprime a ingestão de carboidratos quando injetada nos núcleos ventromedial e dorsomedial do hipotálamo (Weiss *et al.*, 1999). Ao que parece a ação hipofágica da serotonina modifica após um período crônico de exposição a fluoxetina na lactação. É possível que estes animais sofram alterações neuroadaptativas para compensar a elevação da expressão do SERT (Pringle *et al.*, 2008).

Notavelmente, o desenvolvimento das vias regulatórias do apetite, no hipotálamo, ocorre predominantemente após o nascimento (Kagotani *et al.*, 1989;

Grove & Smith, 2003). A exposição perinatal a fluoxetina induziu, ainda no período de desenvolvimento, o aumento na expressão de AgRP e NPY, no hipotálamo, este efeito não foi observado em células controles (Sousa-Ferreira *et al.*, 2014). No entanto, este aumento não foi observado em regiões hipotalâmicas que expressam neuropeptídeos anorexígenos, POMC e CART. Alterações na proliferação durante o neurodesenvolvimento hipotalâmico pode levar a distúrbios entre neurônios orexígenos e anorexígenos (Desai *et al.*, 2011), os neuropeptídeos NPY, AgRP, POMC, CART expressos por estas células progenitoras do hipotálamo participam do controle da ingestão alimentar (Sousa-Ferreira *et al.*, 2011). Em células neuroprogenitoras hipotalâmicas diferenciadas, na presença de fluoxetina, ocorre diminuição nos níveis de mRNA de NPY e CART. Os níveis de AgRP e POMC não apresentaram alterações (Sousa-Ferreira *et al.*, 2014). Aplicação aguda de fluoxetina (10mg/kg) em ratos adultos em jejum de 14 horas promove aumento na expressão de c-Fos nos núcleos ventromedial e paraventricular do hipotálamo nos animais em jejum, aumento na expressão de c-Fos nos núcleos arqueado do hipotálamo, amígdala medial e núcleo dorsal da rafe nos animais alimentados, demonstrando que o estado metabólico do organismo pode influenciar os efeitos da fluoxetina sobre a ingestão alimentar (Fraga *et al.*, 2005).

Como observado em nossos achados, o estímulo agudo de fluoxetina aos 41 dias nos animais expostos a fluoxetina neonatal não promoveu redução na ingestão alimentar. Este achado demonstra uma resistência da ação hipofágica da serotonina em consequência a exposição neonatal crônica à fluoxetina. O efeito hipofágico da fenfluramina (10mg/Kg) é atenuado no camundongo 5-HT_{1B} *knockout*. Apesar da administração de mCPP (agonista dos receptores 5-HT_{2C/1B}) os animais apresentaram um efeito hipofágico reduzido, indicando uma menor sensibilidade a ação hipofágica da fenfluramina e do mCPP (Lee *et al.*, 2004). Camundongos 5-HT_{2C} *Knockout* apresentaram resistência aos efeitos anorexígenos do agonista deste receptor, mCPP, e da D-fenfluramina (Tecott *et al.*, 1995; Vickers *et al.*, 1999). Outras manipulações ambientais no período perinatal também provocam uma menor sensibilidade de receptores serotoninérgicos ou confirmam a participação destes na ação anorexígena da serotonina. A desnutrição perinatal, evento que promove aumento de serotonina encefálica, reduziu a resposta hipofágica serotoninérgica após aplicação aguda de fenfluramina, em animais aos 35 dias de vida. O uso de

agonista do receptor 5-HT_{2C/1B} promove uma menor sensibilidade do receptor 5-HT_{1B} (Sousa *et al.*, 2008). O aumento na expressão do SERT, em animais geneticamente modificados, parece ter uma relação diferente com a resistência a ação anorexígena da serotonina. De modo contrário, animais SERT *overexpressing* também apresentam alteração na sensibilidade do receptor 5-HT_{2A}, o que pode compensar a baixa ação sináptica da serotonina (Pringle *et al.*, 2008). Porém, a injeção aguda de fenfluramina (10mg/Kg), provoca redução na ingestão alimentar (Pringle *et al.*, 2008). Uma melhor resposta anorexígena a fenfluramina no animal transgênico SERT *overexpressing* está relacionada ao fato de que o efeito de liberação da serotonina pela fenfluramina depende de sua ligação na proteína SERT nos terminais neuronais (Fuller *et al.* 1988). Estes achados indicam que uma possível variação na expressão do SERT pode ser considerada um fator de vulnerabilidade para o comportamento alimentar (Pringle *et al.*, 2008).

Observamos que o bloqueio do transportador de serotonina durante o período neonatal aumenta o conteúdo hipotalâmico de serotonina que retornou aos níveis normais após cessada a exposição aos 40 dias de vida. Dose aguda de serotonina no 1º dia pós-natal altera a sensibilidade dos receptores 5-HT e metabolismo serotoninérgico (Bhanja *et al.*, 2010). A administração de 5-HT no 1º dia da lactação diminuiu os níveis de 5-HT e 5-HIAA no núcleo dorsal da rafe aos 21, 45 e 120 dias de vida (Bhanja *et al.*, 2010). A exposição pré-natal a fluoxetina também reduziu o conteúdo de 5-HT no córtex frontal de ratos machos aos 26 dias de vida (Cabrera-Vera *et al.*, 1997). Por outro lado, esta diferença não foi observada no hipotálamo, hipocampo e tronco encefálico (Cabrera-Vera *et al.*, 1997). O bloqueio do SERT por antidepressivos promove maior conteúdo extracelular de serotonina, e resulta em uma redução na liberação de 5-HT pela vesícula, devido a ativação do mecanismo de *feedback* negativo facilitado pelo receptor 5-HT_{1A} (Piñeyro e Blier, 1999). No entanto, a exposição crônica à fluoxetina provoca a dessensibilização dos auto-receptores 5-HT_{1A}, bem como 5-HT_{1B}, dificultando o controle da neurotransmissão serotoninérgica por estes receptores, o que conseqüentemente pode contribuir para o aumento no disparo serotoninérgico e acúmulo de serotonina na fenda sináptica (Hjorth *et al.*, 2000; Stenfors e Ross, 2002). Estes achados demonstram a sensibilidade de determinadas regiões encefálicas a exposição à ISRS em diferentes fases de desenvolvimento do sistema nervoso.

A desnutrição perinatal também induz ao aumento dos níveis encefálicos de serotonina (Manjarrez *et al.*, 1994; Hisatomi e Niyama, 1980). A concentração de serotonina encefálica em animais submetidos à desnutrição no início da vida encontra-se aumentada no período pós-natal e na idade adulta (Manjarrez-Gutiérrez *et al.*, 1988). Este aumento está relacionado a elevada da concentração encefálica do L-triptofano e na atividade da TPH₂ (Hernandez, 1973; Manjarrez *et al.*, 1994). O aumento da serotonina parece ocorrer, a princípio, no corpo celular e dendritos, consideravelmente nos núcleos dorsal e mediano da rafe (Bambrilla *et al.*, 2005).

A recuperação dos níveis de serotonina aos 40 dias de vida pode ser compreendido pela sua relação com a enzima TPH₂, responsável por sua síntese no SNC. A exposição neonatal ao citalopram (5 mg/Kg), reduziu a expressão de mRNA da enzima TPH₂ no núcleo dorsal da rafe dos animais após o desmame, aos 22 dias de vida (Maciaget *et al.*, 2006). A exposição neonatal com clomipramina induz um *downregulation* nos níveis de mRNA do auto-receptor 5-HT_{1A} no núcleo dorsal da rafe, e um aumento na expressão do mesmo receptor em sua versão pós-sináptica (Limón-Morales *et al.*, 2014). Embora estes auto-receptores apresentem uma menor capacidade de resposta, ainda conseguem controlar a neurotransmissão serotoninérgica caso haja um grande aumento nos níveis extracelulares de 5-HT, mesmo após um tratamento prolongado (Hjorthet *et al.*, 2000). A exposição crônica a ISRS na idade adulta não promoveu alteração na TPH₂, demonstrando a vulnerabilidade do período crítico ao padrão da neurotransmissão serotoninérgica (Maciaget *et al.*, 2006). A exposição à ISRS em período do desenvolvimento pode afetar a regulação da serotonina central e conseqüentemente a maturação normal das vias serotoninérgicas centrais pré e pós-sinápticas (Cabrera e Battaglia, 1997; 1998). As repercussões na homeostase do sistema serotoninérgico durante o período precoce do desenvolvimento têm recebido pouca atenção, em contraste ao vasto número de estudos que investigam o uso de ISRS em animais adultos e os efeitos sobre componentes do sistema em questão.

No presente estudo, a exposição neonatal a fluoxetina promoveu alterações no sistema serotoninérgico de animais jovens. Observamos que a expressão gênica e protéica do transportador de serotonina encontra-se aumentada no hipotálamo mesmo após cessada exposição à fluoxetina. Os resultados do uso crônico de antidepressivos são contraditórios. Numerosos estudos sobre ISRS e sua ação

sobre a expressão do SERT encontram aumento, redução e outros nenhuma alteração (Blakely *et al.*, 1994; Ramamoorthy *et al.*, 1998; Cabrera-vera e Battaglia, 1998; Hansen *et al.*, 1998; Benmansour *et al.*, 1999). Em contraste aos nossos achados, o uso neonatal de outro ISRS, citalopram, reduziu a expressão do SERT no córtex aos 22 e 130 dias de vida (Maciag *et al.*, 2006). Ao contrário dos efeitos prolongados da exposição neonatal, o tratamento crônico com ISRS em animais adultos, não apresentou diferenças no SERT (Maciag *et al.*, 2006). O uso de fluoxetina durante a última semana de gestação provocou aumento na densidade do SERT no hipotálamo lateral aos 28 dias de vida (Cabrera-Vera e Battaglia, 1998). Estes animais apresentaram ainda, uma diminuição na densidade do SERT no núcleo dorsomedial, e não houve diferença em outros núcleos hipotalâmicos como, arqueado, paraventricular e ventromedial (Cabrera-Vera e Battaglia, 1998). Esta contradição se dá devido o tipo de fármaco utilizado, a duração, o período do tratamento, e as doses administradas. Estas alterações são relevantes uma vez que estes núcleos têm papel importante no controle do comportamento alimentar e regulação do peso corporal (Grzeskowiak *et al.*, 2012).

Em ratos, a expressão de SERT no encéfalo está intimamente relacionada com a distribuição da triptofano hidroxilase no corpo celular dos neurônios (Hoffman *et al.*, 1998). Mecanismos compensatórios e alterações neuroadaptativas ocorrem em animais SERT *knockout* durante o período embrionário e subsequente neurodesenvolvimento (Bengel *et al.*, 1998). Camundongos SERTKO apresentam concentrações e liberação de 5-HT aumentadas no córtex e no estriado (Mathews *et al.*, 2004). Como resultado de uma reciclagem deficiente de serotonina, estes animais apresentam alterações compensatórias, como o aumento da síntese e turnover da 5-HT em regiões encefálicas (Bengel *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2005). Este resultado demonstra um efeito de controle do sistema serotoninérgico, como uma reação de feedback para o bloqueio da recaptação, a transcrição do gene SERT e tradução em proteína SERT estariam aumentadas mesmo após a supressão do fármaco a fim de permitir um maior controle dos níveis extracelular de 5-HT que encontravam-se aumentados ao final do período de exposição ao fármaco. A utilização de ISRS durante a gestação ou infância pode modificar propriedades de neurônios que expressam SERT através de alterações na sua transcrição específica ou mudanças em sua expressão gênica (Narboux-Nême *et al.*, 2008). Estes dados

indicam que os efeitos da exposição à ISRS durante o período de vulnerabilidade pode promover alterações prejudiciais ao sistema serotoninérgico, além de demonstrar a sensibilidade deste período de crítico do desenvolvimento do sistema nervoso.

Nos resultados morfológicos, a exposição neonatal à fluoxetina promoveu redução de neurônios imunorreativos ao SERT nos núcleos arqueado e paraventricular do hipotálamo, e núcleo dorsal da rafe no tronco encefálico em animais jovens aos 75 dias de vida. No período pré-natal, não houve expressão do SERT nos corpos celulares do hipotálamo e substância negra, uma marcação pouco evidente é observada no córtex pré-natal e uma alta densidade de SERT foi observada nos corpos celulares dos núcleos da rafe no tronco encefálico no período pré-natal (Zhou *et al.*, 2000). O uso de fluoxetina (10mg/Kg) do 13^o ao 20^o dia de gestação provocou aumento na distribuição espacial do SERT, através da técnica de autoradiografia, no núcleo lateral do hipotálamo em ratos jovens aos 28 dias de vida. Estes animais apresentaram ainda, uma diminuição na densidade do SERT no núcleo dorsomedial, e não houve diferença em outros núcleos hipotalâmicos como, arqueado, paraventricular e ventromedial, e nos núcleos dorsal e mediano da rafe no tronco encefálico (Cabrera-Vera e Battaglia, 1998). Estas alterações são importantes uma vez que estes núcleos têm papel importante no controle do comportamento alimentar e regulação do peso corporal (Grzeskowiak *et al.*, 2012). Citalopram do 8 ao 21 dia pós-natal diminui as fibras imunorreativas ao SERT no hipocampo (Maciag *et al.*, 2006). O aumento na atividade serotoninérgica durante o período crítico causa perda de terminais serotoninérgicos em adultos (Whitaker-Azmitia, 2005).

A maturação do SERT é seguida por um perfil transitório de três fases nos núcleos da rafe e no hipotálamo (Galineau *et al.*, 2004). A primeira detecção do SERT no hipotálamo e nos núcleos da rafe foi no 18^o dia gestacional, sendo apenas discriminado entre os núcleos dorsal e mediano da rafe no 14^o dia de vida pós-natal. Nos núcleos da rafe, os valores máximos na densidade do SERT foram observados, entre o 20^o dia gestacional e o 14^o dia de vida pós-natal, seguido por uma diminuição entre os dias 14^o e 21^o da lactação, finalmente atinge um platô até entre o 21^o e o 70^o dia de vida, indicando que o 21^o dia de vida pode representar os níveis de SERT nos núcleos da rafe em animais adultos jovens. No hipotálamo, ocorre um declínio entre os 18 e 20 na gestação, um aumento entre o 7^o e 21^o dia da lactação,

no 21º pós-natal é observado o pico de SERT, com um declínio até o 28º dia pós-natal, este nível de SERT se mantém até o 70º de vida nos ratos (Galineau *et al.*, 2004). Demonstrando que as primeiras semanas pós-natais são um período crítico para o desenvolvimento do sistema 5-HT, sendo particularmente vulnerável a estímulos prejudiciais do ambiente (Galineau *et al.*, 2004). A partir de evidências anatômicas e funcionais indicam a expressão do SERT, não está apenas em terminais axonais, mas podem ser observados transportadores na membrana plasmática ao longo dos axônios (axolema) (Zhou *et al.*, 1998). A extensiva distribuição do SERT nos corpos celulares, dendritos e axônios influencia a liberação e recaptação da serotonina em neurônios-alvo de diversas regiões, atuando na formação de sinapses (Zhou *et al.*, 2000).

Ratos neonatos foram separados das mães a partir do 2º dia até o 14º dia de vida pós-natal, por um período diário de 0, 15 ou 180 minutos. Aos 80 dias de vida, os animais separados na lactação não apresentaram alteração na densidade do SERT nos núcleos hipotalâmicos: arqueado, dorsomedial, paraventricular, lateral e ventromedial (Vicentic *et al.*, 2006). Apenas a porção lateral e ventral do núcleo basolateral da amígdala apresentou um aumento na densidade do SERT nos animais separados por 15 minutos (Vicentic *et al.*, 2006). A densidade do receptor 5-HT1A no hipotálamo também não sofreu conseqüências pela separação materna. Apenas os animais separados por 15 minutos apresentaram um aumento na densidade deste receptor no núcleo basolateral da amígdala (Vicentic *et al.*, 2006). No estudo morfológico de Khozhai (2016), o uso de p-clorofenilalanina (pCPA) agudo, diminui de 50% a 80% o nível endógeno de serotonina por 5 ou 6 dias, no 16º dia gestacional promoveu no 5º dia de vida pós-natal, mudanças na morfologia e organização de neurônios SERT-IR nas porções ventral e dorsal do núcleo dorsal da rafe, estes se apresentam mais espaçados de forma mais compacta em comparação aos animais controle (Khozhai, 2016). Indicando um possível retardo no desenvolvimento do neuropílo, área composta por células nervosas sobrepostas umas as outras. Além disso, houve uma redução no número de neurônios no citoplasma, apesar de apresentarem uma intensa marcação, e na superfície da membrana do corpo celular do neurônio quase não apresentou grânulos imunopositivos (Khozhai, 2016). Estes grânulos são responsáveis pela síntese de proteínas, como as enzimas. No 10º dia pós-natal, aproximadamente 30% dos

neurônios nas porções dorsal e ventral do núcleo dorsal são imunopositivos. Não são observados grânulos positivos na superfície do corpo celular. No 20º dia, é observada uma redução dos neurônios imunorreativos na porção dorsal e ventral do núcleo dorsal quando comparado ao grupo controle. Nos neurônios da porção dorsal apresentam uma deformação do corpo celular, com uma morfologia mais alongada quando comparados com os animais controle (Khozhai, 2016).

A intensidade da expressão de neurônios SERT-IR depende do nível de serotonina endógeno (Khozhai, 2016). Nos animais controles, na parte dorsal do núcleo dorsal da rafe, é possível observar a expressão do SERT em animais aos 5 dias de vida pós-natal. No entanto, nas porções ventral e lateral do núcleo dorsal da rafe, sem expressão do SERT. Em neurópilos (área formada por dendritos compactados, células da glia e ramos de axônios) da parte dorsal e ventral foi observado uma densa rede de terminais delgados onde é detectado vários varicosítios (Khozhai, 2016). Nos animais controle, aos 10 dias de vida, aproximadamente 50% dos neurônios nas partes dorsal, lateral e ventral do núcleo dorsal da rafe é imunopositivo ao SERT. O citoplasma dos dendritos, porém não nos axônios, foram nitidamente marcados. Há uma ausência de grânulos imunorreativos sobre a membrana dos corpos celulares, porém encontram-se sobre dendritos e axônios, embora dispersos. Nos animais controle, aos 20 dias de vida, aproximadamente 80% dos neurônios nas três porções do núcleo dorsal da rafe são imunopositivos. Na superfície da membrana do corpo celular não apresentam grânulos (Khozhai, 2016).

Na rafe, os neurônios imunorreativos ao SERT coincidem com os neurônios imunorreativos a 5-HT. Nas principais trajetórias das fibras serotoninérgicas, as fibras imunorreativas ao SERT estão presentes, assim como, nas fibras imunorreativas ao SERT, a serotonina também encontra-se presente (Zhou *et al.*, 2000). Em axônios é possível observar que a morfologia do SERT se assemelha aos axônios imunorreativos a 5-HT (Zhou *et al.*, 2000). De maneira semelhante aos nossos resultados, a exposição a fluoxetina durante toda a lactação reduziu a quantidade de neurônios 5-HT-IR no núcleo dorsal da rafe, sem alterar o núcleo mediano em animais jovens com 60 dias de vida (Mendes *et al.*, 2010). Além disso, outros parâmetros morfológicos também apresentaram redução, como o diâmetro, a área e o perímetro de neurônios 5-HT-IR nos núcleos dorsal e mediano da rafe. Uma

menor densidade de terminais 5-HT-IR no giro dentado do hipocampo também foi induzida pela fluoxetina neonatal nestes animais (Mendes *et al.*, 2010). No hipotálamo de ratos, os neurônios 5-HT-IR, depois de um pré-tratamento com l-triptofano, é observado no núcleo dorsomedial em animais adultos (Frankfurt *et al.*, 1981).

O excesso de 5-HT em animais MAO-A *Knockout* é responsável pelo surgimento de anormalidades observadas no padrão de projeções de neurônios não-serotoninérgicos que acumulam 5-HT (Vitaliset *al.*, 1998). Durante o desenvolvimento de neurônios não-serotoninérgicos, os níveis de 5-HT são regulados no ambiente extracelular em torno dos terminais neuronais (Gaspar *et al.*, 2003). Acredita-se que os níveis extracelulares de 5-HT sejam regulados nas terminações dos neurônios LSO por meio do SERT (Thompson *et al.*, 2011). O acúmulo de 5-HT em neurônios sensoriais não-serotoninérgicos parece necessário para a formação dos seus campos terminais, assim como a captação de 5-HT pode ser necessária para a organização do padrão das projeções neuronais (Thompson *et al.*, 2011). Animais *knockout* TPH2 apresentam redução da inervação serotoninérgica nos núcleos supraquiasmático e paraventricular do hipotálamo (Magliarini *et al.*, 2013). É observado que o aumento na liberação de serotonina pode afetar a neurogênese no animal adulto, no entanto este mecanismo ainda não está totalmente esclarecido (Vitalis e Parnavelas, 2003). Estes estudos indicam que durante o desenvolvimento, o acúmulo de serotonina em neurônios não-serotoninérgicos depende de uma regulação precisa dos níveis de 5-HT. A partir dos estudos pode ser claramente observado que a exposição a fluoxetina em períodos precoces da vida afetam aspectos morfológicos do sistema serotoninérgico no encéfalo, possibilitando danos aos processos neurais modulados pela serotonina e consequentemente interferindo no desenvolvimento do SNC (Mendes *et al.*, 2010).

Nossos achados expõem que exposição à fluoxetina durante o período de lactação induz aumento nos níveis de serotonina que é atenuado pelo aumento no transportador de serotonina. O sistema serotoninérgico apresenta grande plasticidade neural durante o período de desenvolvimento, esta habilidade é essencial para a sobrevivência do organismo principalmente em um ambiente sob mudanças constantes. Apesar desta tentativa de controle da neurotransmissão serotoninérgica pelo transportador de serotonina, o elevador teor de serotonina

promove danos à quantidade de neurônios SERT-IR semanas após a retirada do fármaco. Estes danos ocorrem em regiões hipotalâmicas e do tronco encefálico, responsáveis pelo controle da ingestão alimentar e peso corporal, e permitem compreender a menor eficiência da serotonina em induzir seu efeito hipofágico nos animais jovens.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que organização do sistema serotoninérgico durante o período crítico de desenvolvimento é fundamental para a programação da ingestão alimentar em roedores. A exposição neonatal a fluoxetina atenua a resposta hipofágica da serotonina em animais jovens. O aumento do conteúdo de serotonina hipotalâmica, promovido pela exposição à fluoxetina neonatal, foi atenuado após a retirada do fármaco em consequência ao aumento dos níveis de transportador de serotonina no hipotálamo, possivelmente como um mecanismo de controle da neurotransmissão serotoninérgica. Apesar deste possível controle, o bloqueio do transportador associado ao aumento de serotonina no período neonatal também promoveu uma redução na quantidade de neurônios imunorreativos ao SERT no núcleo paraventricular e arqueado do hipotálamo, assim como, no núcleo dorsal da rafe em animais quando adultos jovens e sem continuação da exposição ao fármaco. Em suma, estes achados permitem compreender a importância da expressão transitória da serotonina e seu transportador durante o período crítico de desenvolvimento como um fator chave para o adequado desenvolvimento de vias do controle do balanço energético.

REFERÊNCIAS

1. ALENINA, D. et al. Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin, **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences.**, v.106, n.25, p. 10332-10337, 2009.
2. ANTIN, J., GIBBS, J., ET AL. Cholecystokinin elicits the complete behavioral sequence of satiety in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.89, n.7, p. 784-790, 1975.
3. ARASE, K., YORK, D.A., SHIMIZU, H., SHARGILL, N., BRAY, G.A.. Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. **American Journal of Physiology**, v.255, p. 255–259, 1988.
4. AZMITIA, E. C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain Research Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 413-24, nov. 2001.
5. AZMITIA, E.C.. Evolution of serotonin: sunlight to suicide. In: Muller, C.P., Jacobs,B.L. (Eds.), Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin. AcademicPress, Burlington, MA, pp. 3–22, 2010.
6. BENDOTTI, C.; SAMANIN, R.. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OHDPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 147-150, 1986.
7. BENGEL, D. et al. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”) in serotonin transporter-deficient mice. **Molecular Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 649-55, abr. 1998.
8. BENMANSOUR, S.; CECCHI, M. et al. Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level. **Journal of Neuroscience**. Dec. v.19, n. 23, p.10494-501, 1999.
9. BHANJA, S.; MOHANAKUMAR, K.P.. Early-life treatment of antiserotonin antibodies alters sensitivity to serotonin receptors, nociceptive stimulus and serotonin metabolism in adult rats. **International Journal Of Developmental Neuroscience**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.317-324, jun. 2010.
10. BIANCHI, P.; CIANI, E.; GUIDI, S.; TRAZZI, S.; FELICE, D.; GROSSI, G.; FERNANDEZ, M.; GIULIANI, A.; CALZÀ, L.; BARTESAGHI, R.. Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. **Journal of Neuroscience**. v.30, n.26, p. 8769-79, 2010.
11. BLAKELY, R. D. et al. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 66-70, 7 nov. 1991.
12. BLAKELY, R. D.; FELICE, L. J. DE; HARTZELL, H. C. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. **The Journal Of Experimental Biology**, v. 196, p. 263-81, nov. 1994.
13. BLUNDELL, J. E.; et al. Comparison of the time course of the anorectic effect of fenfluramine and amphetamine with drug levels in blood. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, p. 187-192, 1975.
14. BLUNDELL, J. E.; HALFORD, J. C.. Regulation of nutrient supply: the brain and appetite control. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.53, p. 407-418, 1994.

15. BLUNDELL, J.E.. Serotonin and the biology of feeding. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 1992 v. 55, n. 1, p. 155S-159S.
16. BOADLE-BIBER, M.C. Regulation of serotonin synthesis. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**. Mol. v.60, p.1-15, 1993.
17. BOADLE-BIBER, M.C.. Regulation of serotonin synthesis. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**. v. 60, p.1-15, 1993.
18. BOGDANSKI, D.F.; PLETSCHER, A.; BRODIE, B.B.; UDENFRIEND, S.. Identification and assay of serotonin in brain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.117, pp. 82-88, 1956.
19. BONNIN, A.; et al. Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. **Nature Neuroscience**, [s.l.], v. 10, n. 5, p.588-597, 22 abr. 2007.
20. BONNIN, A.; LEVITT, P.. Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. **Neuroscience**, [s.l.], v. 197, p.1-7, dez. 2011.
21. BORUE, X.; CHEN, J.; CONDRON, B. G. Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies. **International Journal Of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 6, p. 341-7, out. 2007.
22. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 7 maio. 1976.
23. BRAMBILLA, P. et al. Side-effect profile of fluoxetine in comparison with other SSRIs, tricyclic and newer antidepressants: a meta-analysis of clinical trial data. **Pharmacopsychiatry**, v. 38, n. 2, p. 69-77, mar. 2005.
24. BROBERGER, C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. **Journal of Internal Medicine**, v. 258, p.301–327, 2005.
25. CABRERA-VERA, T. M.; BATTAGLIA, G. Prenatal exposure to fluoxetine (Prozac) produces site-specific and age-dependent alterations in brain serotonin transporters in rat progeny: evidence from autoradiographic studies. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 286, n. 3, p. 1474-81, set. 1998.
26. CABRERA-VERA, T. M.; et al. Effect of prenatal fluoxetine (Prozac) exposure on brain serotonin neurons in prepubescent and adult male rat offspring. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**. Jan. v.280, p.138–145, 1997.
27. CHUGANI, D.C.; MUZIK, O.; BEHEN, M.; ROTHERMEL, R.; JANISSE, J.J.; LEE, J.; CHUGANI, H.T.. Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. **Annals of Neurology**. v.45, n.3, p.287-95, 1999.
28. CONE, R.D.. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. **Nature Neuroscience**, v. 8, p. 571–578, 2005.
29. CONNELL, Shelley; KARIKARI, Collins; HOHMANN, Christine F. Sex-specific development of cortical monoamine levels in mouse. **Developmental Brain Research**, [s.l.], v. 151, n. 1-2, p.187-191, jul, 2004.
30. CURZON, G.; FRIEDEL, J.; KNOTT, P. J.. The Effect of Fatty Acids on the Binding of Tryptophan to Plasma Protein. **Nature**, [s.l.], v. 242, n. 5394, p.198-200, 16 mar. 1973.

31. D'SOUZA, Manoranjan S.; MARKOU, Athina. Neural Substrates of Psychostimulant Withdrawal-Induced Anhedonia. **Behavioral Neuroscience Of Drug Addiction**, [s.l.], p.119-178, 3 set. 2009.
32. DAHLSTROEM, A.; FUXE K.. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiologica Scandinavica**. v.232, p.1-55, 1964.
33. DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A.. Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. **Neuroreport**, v. 11, p. 2795–2798, 2000.
34. DE SOUZA, E.B.; KUYATT, B.L. Autoradiographic localization of 3H-paroxetine-labeled serotonin uptake sites in rat brain. *Synapse*. v.1, p.488–496, 1987.
35. DE VITRY, F.; HAMON, M.; CATELON, J.; DUBOIS, M.; THIBAUT, J.. Serotonin initiates and autoamplifies its own synthesis during mouse central nervous system development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v.83, n.22, p. 8629-33, 1986.
36. DEIRO, T. ET AL. Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**., São Paulo, v. 66, n. 3b, p. 736-740, 2008 .
37. DEIRÓ, T.C.B.J et al. Neonatal administration of citalopram delays the somatic maturation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 10, p. 1503-9, out. 2004.
38. DESAI, M.; LI, T.; ROSS, M.G.. Hypothalamic neurosphere progenitor cells in low birth-weight rat newborns: neurotrophic effects of leptin and insulin. **Brain Research**. V.1378, p. 29–42, 2011.
39. DOBBING, J. Undernutrition and the developing brain. The relevance of animal models to the human problem. **American Journal Of Diseases Of Children** (1960), v. 120, n. 5, p. 411-5, nov. 1970.
40. ERIKSEN, J.; JØRGENSEN, T. N.; GETHER, U. Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges. **Journal Of Neurochemistry**, v. 113, n. 1, p. 27-41, abr. 2010.
41. FABRE, V.; HAMON, M. Mechanisms of action of antidepressants: new data from Escitalopram. **Encephale**, v. 29, n. 3, p. 259-265, 2003.
42. FAN, J.B.; SKLAR, P.. Meta-analysis reveals association between serotonin transporter gene STin2 VNTR polymorphism and schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 10, n. 10, p. 928-938, 2005.
43. FRAGA, I.C. et al. Acute fluoxetine administration differentially affects brain C-Fos expression in fasted and refed rats. **Neuroscience**, [s.l.], v. 134, n. 1, p.327-334, jan. 2005.
44. FRANKFURT, M.; LAUDER, J.M.; AZMITIA, E.C.. The immunocytochemical localization of serotonergic neurons in the rat hypothalamus, **Neuroscience Letters**, v.24, p. 227-232, 1981.
45. FULLER, R.R.; et al. Single neuron analysis by capillary electrophoresis with fluorescence spectroscopy. **Neuron**, v.20, p. 173- 181, 1998.
46. GALINDO, L.C.M.; et al. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in

- adult rats. **International Journal Of Developmental Neuroscience**, [s.l.], v. 46, p.76-81, nov. 2015.
47. GALINDO, L.C.M.; et al. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 46, p. 76-81, 2015.
 48. GALINEAU, L.; et al. Ontogeny of the dopamine and serotonin transporters in the rat brain: an autoradiographic study. **Neuroscience Letters**, v. 363, n. 3, p. 266-271, 2004.
 49. GAO, Q.; HORVATH, T. L.. Neurobiology of feeding and energy expenditure. **Annual Review of Neuroscience**, v. 30, p. 367–398, 2007.
 50. GARDIER, A.M. et al. Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v.10, n.1, p.16-27, 1996.
 51. GARTSIDE, S. E. et al. Interaction between a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist and an SSRI in vivo: effects on 5-HT cell firing and extracellular 5-HT. **British Journal Of Pharmacology**, v. 115, n. 6, p. 1064-70, jul. 1995.
 52. GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; LOW, F.M.. The role of developmental plasticity and epigenetics in human health. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today**, [s.l.], v. 93, n. 1, p.12-18, mar. 2011
 53. Grinker, J.A.; et al. Effects of d-amphetamine and fenfluramine on feeding patterns and activity of obese and lean Zucker rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 12, p. 265-275, 1980.
 54. GROVE, K.I.; ALLEN, S.; GRAYSON, B.E.; SMITH, M.S.. Postnatal development of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Neuroscience*, [s.l.], v. 116, n. 2, p.393-406, jan. 2003.
 55. GRZESKOWIAK, L. E.; GILBERT, A. L.; MORRISON, J. L. Long term impact of prenatal exposure to SSRIs on growth and body weight in childhood: evidence from animal and human studies. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 34, n. 1, p. 101-9, ago. 2012.
 56. GUR, E.; et al. The Differential Effects of Food Restriction on 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} Receptor Mediated Control of Serotonergic Transmission in the Hippocampus and Hypothalamus of Rats. **Nutritional Neuroscience**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.169-175, maio 2003.
 57. HALES, C. N.; BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. **British Medical Bulletin**, v. 60, p. 5-20, jan. 2001.
 58. HALES, C. N.; BARKER, D. J.. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v.35, n.7, p.595-601, 1992.
 59. HALFORD, J.C.; et al. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. **Current Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 201-213, 2005.
 60. HALFORD, J.c.g.; BLUNDELL, J.e.. Metergoline antagonizes fluoxetine-induced suppression of food intake but not changes in the behavioural satiety sequence. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s.l.], v. 54, n. 4, p.745-751, ago. 1996.
 61. HANSEN, H. H.; MIKKELSEN, J. D. Long-term effects on serotonin transporter mRNA expression of chronic neonatal exposure to a serotonin

- reuptake inhibitor. **European Journal of Pharmacology**, v. 352, n. 2-3, p. 307-15, 10 jul. 1998.
62. HANSSON, S. R.; CABRERA-VERA, T. M.; HOFFMAN, B. J. Infraorbital nerve transection alters serotonin transporter expression in sensory pathways in early postnatal rat development. **Brain research. Developmental Brain Research**, v. 111, n. 2, p. 305-14, 7 dez. 1998.
63. HEISLER, L.K.; et al. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. **Science**, v. 297, p. 609–611, 2002.
64. HEISLER, L.K.; TECOTT L.H.. A paradoxical locomotor response in serotonin 5-HT(2C) receptor mutant mice. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 8 (RC71), 2000.
65. HENSLER, J. G.. Serotonin. In: George J. Siegel, R. Wayne Albers, Brady Scott, Donald D. Price (Hrsg.): **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. Elsevier Academic, Amsterdam 2006.
66. HERNANDEZ, R. J. Developmental pattern of the serotonin synthesizing enzyme in the brain of postnatally malnourished rats. **Experientia**, v. 29, n. 12, p. 1487-8, dez. 1973.
67. HEWITT, K.N.; LEE, M.D.; DOURISH, C.T.; CLIFTON, P.G.. Serotonin 2C receptor agonists and the behavioural satiety sequence in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. V.71, n.4, p.691-700, 2002.
68. HISATOMI, K.; NIIYAMA, Y. Effects of postnatal undernutrition on the catecholamine and serotonin contents of suckling rat brain. **Journal Of Nutritional Science And Vitaminology**, v. 26, n. 3, p. 279-92, jan. 1980.
69. HJORTH, S. et al. Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action. **Journal Of Psychopharmacology**, v. 14, n. 2, p. 177-85, jun, 2000.
70. HOFFMAN, B. J. et al. Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. **Frontiers In Neuroendocrinology**, v. 19, n. 3, p. 187-231, jul. 1998.
71. HOLMES, A.; YANG, R.J.; MURPHY, D.L.; CRAWLEY, J.N.. Evaluation of Antidepressant-related Behavioral Responses in Mice Lacking the Serotonin Transporter. **Neuropsychopharmacology**, [s.l.], v. 27, n. 6, p.914-923, 2002.
72. HOMBERG, J.R.; SCHUBERT, D.; GASPARD, P.. New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. **Trends Pharmacol Sci**, v.31, p.60–65, 2010.
73. HORNUNG, J.P. The neuroanatomy of the serotonergic system. In: Müller CP, Jacobs BL, editors. **Handbook of Behavioral Neurobiology of Serotonin**. Elsevier; 2010.
74. ICETA, R.; MESONERO, J. E.; ALCALDE, A. I. Effect of long-term fluoxetine treatment on the human serotonin transporter in Caco-2 cells. **Life Sciences**, v. 80, n. 16, p. 1517-24, mar. 2007.
75. JENNINGS, K.. Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. **Journal of Neuroscience**. v.26, n.35, p.8955-8964, 2006.
76. KAGOTANI, Y. et al. Development of the neuronal system containing neuropeptide Y in the rat hypothalamus. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 359-74, 1989.

77. KIM, D.-K. et al. Altered serotonin synthesis, turnover and dynamic regulation in multiple brain regions of mice lacking the serotonin transporter. **Neuropharmacology**, v. 49, n. 6, p. 798-810, 2005.
78. KIRYANOVA, V.; MCALLISTER, B.B.; DYCK, R.H.. Long-term outcomes of developmental exposure to fluoxetine: a review of the animal literature. **Developmental Neuroscience**, v.35, p.437–439, 2013.
79. KLOMP, A., ET AL. Effects of Chronic Fluoxetine Treatment on Neurogenesis and Tryptophan Hydroxylase Expression in Adolescent and Adult Rats. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.97603-97603, 14 maio, 2014.
80. KROEZE, W.K.; et al. Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 507-528, 2002.
81. LAUDER, J. M. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. **Trends In Neurosciences**, v. 16, n. 6, p. 233-40, jun. 1993.
82. LAUTENSCHLAGER, M. et al. Serotonin uptake and release mechanisms in developing cultures of rat embryonic raphe neurons: age- and region-specific differences. **Neuroscience**, v. 99, n. 3, p. 519-27, jan. 2000.
83. LE FEUVRE, R.A., et al. Involvement of corticotrophin releasing factor (CRF) in the thermogenic and anorexic actions of serotonin (5-HT) and related compounds. **Brain Research**. v. 555, n. 2, Aug., p. 245-50, 1991.
84. LE POUL, E. et al. Early desensitization of somato-dendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. **Naunyn Schmiedebergs Archives Pharmacology**. v.352, n.2, p. 141-8, 1995.
85. LEE, J.; et al. Chemically Induced Platelet Lysis Causes Vasoconstriction by Release of Serotonin. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [s.l.], v. 149, n. 2, p.235-242, abr. 1998.
86. LEE, M.; et al.. Relationship of a 5-HT transporter functional polymorphism to 5-HT_{1A} receptor binding in healthy women. **Molecular Psychiatry**, v.10, n.8, p.715-6, 2005.
87. LEIBOWITZ, S.F.; ALEXANDRE, J.T.. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. **Biological Psychiatry**. v.44, p. 851-864, 1998.
88. LEUBA, G. e RABONOWICZ, T.. Long-term effects of posnatal undernutrition and maternal malnutrition on mouse cerebral cortex. I. Celular densities, cortical volume and total number of cells. **Experimental Brain. Res.** 37: 283-298, 1979a.
89. LIDOV, H.G.W.; MOLLIVER, M.E.. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in rat: ascending pathways and terminal fields. **Brain Research**, v.8, p. 389-430, 1982.
90. LIMÓN-MORALES, O.; et al. Altered expression of 5-HT_{1A} receptors in adult rats induced by neonatal treatment with clomipramine. **Physiology & Behavior**, [s.l.], v. 124, p.37-44, jan. 2014.
91. LOPES DE SOUSA, S. Sistema serotoninérgico: estudo comportamental e neuroanatômico por manipulação farmacológica e nutricional em ratos neonatos. 2005. 121f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
92. LOPES DE SOUZA, S. et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **The European Journal Of Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1400-8, mar. 2008.

93. LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. Ciba Foundation symposium, v. 156, p. 38-50; discussion 50-5, jan. 1991.
94. MACIAG, D. et al. Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 1, p. 47-57, jan. 2006.
95. MACKAY, H.; ABIZAID, A.; Embryonic development of the hypothalamic feeding circuitry: Transcriptional, nutritional, and hormonal influences. **Molecular Metabolism**, [s.l.], v. 3, n. 9, p.813-822, dez. 2014.
96. MANHÃES DE CASTRO, R. et al. Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 34, n. 1, p. 121-4, jan. 2001.
97. MANHÃES-DE-CASTRO, R. et al. Neonatal treatment with naloxone causes permanent hyperalgesia in rats. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 26, n. 7, p. 747-51, jul. 1993.
98. MANJARREZ, G. G.; CHAGOYA, G. G.; HERNÁNDEZ, J. Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 695-702, dez. 1994.
99. MANJARREZ, G., G. CHAGOYA, et al. Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in utero. **Biol Neonate**, v.54, n.4, p.232-40. 1988.
100. MATEOS, S.S.; et al. Circadian Levels of Serotonin in Plasma and Brain after Oral Administration of Tryptophan in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, n. 1, p. 52-59, 2009.
101. MATHEWS, T. A. et al. Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression. *Journal of neuroscience methods*, v. 140, n. 1-2, p. 169-81, 30 dez. 2004.
102. MCGUIRK, J.; et al. Differential effects of d-fenfluramine, l-fenfluramine and d-amphetamine on the microstructure of human eating behaviour. **Behavioural Pharmacology**, v. 2, p. 113-119, 1991.
103. MCNAMARA, Ilan M. et al. Further studies in the developmental hyperserotonemia model (DHS) of autism: Social, behavioral and peptide changes. **Brain Research**, [s.l.], v. 1189, p.203-214, jan. 2008.
104. MCNAY D.E.; et al. Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 142-152, 2012.
105. MEISTER, B. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. **Physiology & Behavior**, v. 92, n. 1-2, p. 263-271, 2007.
106. MENDES-DA-SILVA, C. et al. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 60, n. 4, p. 928-31, dez. 2002.
107. MIGLIARINI, S.; et al.. Lack of brain serotonin affects postnatal development and serotonergic neuronal circuitry formation. **Molecular Psychiatry**., v.18, n.10, p.1106-18, 2013.

108. MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience And Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 471-83, jun. 2002.
109. MORGANE, P.J. et al. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. v. 2, p. 137 - 230, 1978
110. MORTON, G.; CUMMINGS, D.; BASKIN, D.; BARSH, G.; SCHWARTZ, M..Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**. v.443, n.7109, p.289-295, 2006.
111. MORTON, G.J.; et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289-295, 2006.
112. MURPHY, D.L.; LESCH, K.P.. Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 85-96, 2008.
113. NARBOUX-NÊME, N. et al. Serotonin transporter transgenic (SERTcre) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). **Neuropharmacology**, v. 55, n. 6, p. 994-1005, 2008.
114. NEEL, J.V. Diabetes Mellitus: A “Thrifty” Genotype Rendered Detrimental by “Progress”? **The American Journal of Human Genetics**. v.14, n.4, p.353-362, 1962.
115. OLIVEIRA, Lisiane dos Santos; SOUZA, Sandra Lopes de; MANHÃES-DE-CASTRO, Raul. Behavioral satiety sequence: an experimental model for studying feeding behavior. **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.619-628, ago. 2011.
116. OLIVIER. J.D.; BLOM, T.; ARENTSEN, T.; HOMBERG, J.R.. The agedependent effects of selective serotonin reuptake inhibitors in humans and rodents: a review. *Prog Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry*, v. 35, p.1400–1408, 2011.
117. OVALLE, S.; CASANOVA, E.; GARATE, C.; ALONSO-LLAMAZARES, A.; CHINCHETRU, M.A.; CALVO, P.. Immunodetection of serotonin transporter from mouse brain. **Neuroreport**. v.6, p. 2353-6, 1995.
118. PAXINOS, G.; CHARLES, W.. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Academic Press: London (UK), 2007. 6 ed.
119. PICKEL , V.M. , JOH , T.H. AND REIS , D. A serotonergic innervation of noradrenergic neurons in nucleus locus coeruleus: demonstration by immunocytochemical localization of the transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase . **Brain Research**. v.131, p. 197 – 214, 1977.
120. PIERCE, A.A.; XU, A.W.. De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. **Journal of Neuroscience**, v.30, p.723–730, 2010.
121. PIERCE, A.A.; XU, A.W.. De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 2, p. 723-730, 2010.
122. PIÑEYRO, G.; BLIER, P. Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 3, p. 533-91, set. 1999.
123. PRINGLE, A. et al. Mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter show no alterations in feeding behaviour and increased non-

- feeding responses to fenfluramine. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 200, n. 2, p.291-300, 16 jun. 2008
124. QUITKIN, F.M. et al. Remission rates with 3 consecutive antidepressant trials: effectiveness for depressed outpatients. **Journal of Clinical Psychiatry**. Jun. v. 66, n. 6, p. 670-6, 2005.
 125. RAMAMOORTHY, S. et al. Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 273, n. 4, p. 2458-66, 23 jan. 1998.
 126. RAMAMOORTHY, S.; BLAKELY, R. D. Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. **Science** (New York, N.Y.), v. 285, n. 5428, p. 763-6, 30 jul. 1999.
 127. RAVELLI, Gian-paolo; STEIN, Zena A.; SUSSER, Mervyn W.. Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 295, n. 7, p.349-353, 12 ago. 1976.
 128. RAVNA, A. W. et al. Putative drug binding conformations of monoamine transporters. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 666-75, 1 fev. 2006.
 129. RESNICK, O.; MILLER, M.; FORBES, W.; HALL, R.; KEMPER, T.; BRONZINO, J.; MORGANE, P. J. Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. **Neuroscience Biobehavioral Revist**, v. 3, p. 233-246, 1979.
 130. RIND, H.b; RUSSO, A.f; WHITTEMORE, S.r. Developmental regulation of tryptophan hydroxylase messenger RNA expression and enzyme activity in the raphe and its target fields. *Neuroscience*, [s.l.], v. 101, n. 3, p.665-677, nov. 2000.
 131. RODRIGUEZ-PORCEL, F.; et al. Neonatal exposure of rats to antidepressants affects behavioral reactions to novelty and social interactions in a manner analogous to autistic spectrum disorders. **The Anatomical Record (Hoboken)**, v. 294, n. 10, p. 1726-1735, 2011.
 132. ROGERS, P.J.; BLUNDELL J.E.. Effect of anorexic drugs on food intake and the micro-structure of eating in human subjects. **Psychopharmacology**, v. 66, n. 2, p. 159-165, 1979.
 133. ROTHWELL, N.J., STOCK, M.J. Effect of diet and fenfluramine on thermogenesis in the rat: possible involvement of serotonergic mechanisms. **International Journal of Obesity**. v. 11, p. 319–324, 1987.
 134. SABLIN, S.O.; YANKOVSKAYA, V.; BERNARD, S.; CRONIN, C.N.; SINGER, T.P.. Isolation and characterization of an evolutionary precursor of human monoamine oxidases A and B. **European Journal Of Biochemistry**. V.253, n.1, p.270-279, 1998.
 135. SAKAGUCHI, T.; BRAY, G.A.. Effect of norepinephrine, serotonin and tryptophan on the firing rate of sympathetic nerves. **Brain Research**, v. 492, p. 271-280, 1989.
 136. SÁNCHEZ, S. et al. Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of rats. **Molecular And Cellular Biochemistry**, v. 317, n. 1-2, p. 105-11, out. 2008.
 137. SARKAR, A.; et al. Postnatal fluoxetine-evoked anxiety is prevented by concomitant 5-HT_{2A/C} receptor blockade and mimicked by postnatal 5-HT_{2A/C} receptor stimulation. **Biological Psychiatry**, v. 76, 858-868, 2013.

138. SAWCHENKO, P.E.; et al. Co-localization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 241, p. 138–153, 1985.
139. SCHREIBER, R.; SELBACH, K.; ASMUSSEN, M.; HESSE, D.; DE VRY, J.. Effects of serotonin(1/2) receptor agonists on dark-phase food and water intake in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.67, n.2, p.291-305, 2000.
140. SHOR-POSNER, G.; et al. Hypothalamic serotonin in the control of meal patterns and macronutrient selection. **Brain Research Bulletin**, v. 17, n. 5, p. 663-671, 1986.
141. Shor-Posner, G.; Grinker, J.A.; Marinescu, C.; Brown, O.; Leibowitz, S.F.. Hypothalamic serotonin in the control of meal patterns and macronutrient selection. **Brain Research Bulletin**, v.17, n.5, p.663-71, 1986.
142. SHUEY, D.L.; SADLER, T.W.; TAMIR, H.; LAUDER, J.M.. Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. **Anatomy and Embryology (Berlin)**. v.187, n.1, p.75-85, 1993.
143. SIMPSON, K.L.; WEAVER, K.J.; et al. Perinatal antidepressant exposure alters cortical network function in rodents. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p.18465–18470, 2011.
144. SMRIGA, M.; et al.. Preference for a solution of branched-chain amino acids plus glutamine and arginine correlates with free running activity in rats: involvement of serotonergic-dependent processes of lateral hypothalamus. **Nutritional Neuroscience**, v.5, p.189–99, 2002.
145. SODHI, Monsheel S.k; SANDERS-BUSH, Elaine. Serotonin and brain development. **International Review Of Neurobiology**, [s.l.], p.111-174, 2004.
146. SOUSA-FERREIRA, Lígia. Fluoxetine Induces Proliferation and Inhibits Differentiation of Hypothalamic Neuroprogenitor Cells In Vitro. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. 88917, 2014.
147. SOUZA, S.; et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **The European Journal Of Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1400-8, mar. 2008.
148. SPURLOCK, G. et al. Lack of effect of antidepressant drugs on the levels of mRNAs encoding serotonergic receptors, synthetic enzymes and 5HT transporter. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 3-4, p. 433-40, 1994.
149. STEINBUSCH, H.W.M. Distribution of serotonin immunoreactivity in the central nervous system of the rat. Cell bodies and terminals. **Neuroscience**, v.6, pp. 557 – 618, 1981.
150. STENFORS, C.; ROSS, S. B. Evidence for involvement of 5-hydroxytryptamine(1B) autoreceptors in the enhancement of serotonin turnover in the mouse brain following repeated treatment with fluoxetine. **Life sciences**, v. 71, n. 24, p. 2867-2880, 1 nov. 2002.
151. STONE, Trevor W.; DARLINGTON, L. Gail. Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 1, n. 8, p.609-620, ago. 2002.
152. SUNDSTRÖM, E.; KÖLARE, S.; SOUVERBIE, F.; SAMUELSSON, E.B.; PSCHERA, H.; LUNELL, N.O.; SEIGER, A.. Neurochemical differentiation

- of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Brain Research. Developmental Brain Research*. v.75, n.1, p.1-12. 1993.
153. SUR, C.; BETZ, H.; SCHLOSS, P.. Immunocytochemical detection of the serotonin transporter in rat brain. **Neuroscience**, [s.l.], v. 73, n. 1, p.217-231, jul. 1996.
 154. TAKAHASHI, H.; et al. Distribution of serotonin-containing cell bodies in the brainstem of the human fetus determined with immunohistochemistry using antiserotonin serum. **Brain Developmental**, v. 8, n. 4, p. 355-365, 1986.
 155. TAO, R. et al. Effects on serotonin in rat hypothalamus of D-fenfluramine, aminorex, phentermine and fluoxetine. **European Journal of Pharmacology**, v. 445, n. 1-2, p. 69-81, 2002.
 156. TAO-CHENG, J.H.; ZHOU, F.C.. Differential polarization of serotonin transporters in axons versus soma-dendrites: an immunogold electron microscopy study. **Neuroscience**, v.94, p. 821–830, 1999.
 157. TECOTT, L. H.; SUN, L.M.; et al.. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors. **Nature**, v. 374, n.6522, p. 542-546, 1995.
 158. TÖRK, I.. Raphe nuclei and serotonin containing systems. In: G. Paxinos (Ed.), *The rat nervous system* (pp. 43-78). Sydney: **Academic Press**, 1985.
 159. TURLEJSKI, K.. "Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development." **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v.56, n.2, p. 619-636, 1996.
 160. TWAROG, B.M.; PAGE, I.H.. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. **American Journal of Physiology**. V. 175, pp. 157–161, 1953.
 161. VICENTIC, A. et al. Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. **Neuroscience**, [s.l.], v. 140, n. 1, p.355-365, jan. 2006.
 162. VICKERS, S. P.; CLIFTON, P. G.; DOURISH, C. T.; TECOTT, L. H.. Reduced satiating effect of D-fenfluramine in serotonin 5-HT(2C) receptor mutant mice. **Psychopharmacology**, v.143, p. 309-314, 1999.
 163. VITALIS, T.; PARNAVELAS, J.G.. The role of serotonin in early cortical development. *Developmental neuroscience*, v.25, n.2, p.245-256, 2003.
 164. WALTHER, D. J.. Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. **Science**, [s.l.], v. 299, n. 5603, p.76-76, 3 jan. 2003.
 165. WARDEN, S.J.. Inhibition of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth. **Journal of Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 685-693, 2005.
 166. WEISS, G.F.; ROGACKI, N.; FUEG, A.; BUCHEN, D.; LEIBOWITZ, S.F.. Impact of hypothalamic d-norfenfluramine and peripheral d-fenfluramine injection on macronutrient intake in the rat. **Brain Research Bulletin**. v. 25, n. 6, p. 849-59, 1990.
 167. WELLS, J. C. K.. Adaptive variability in the duration of critical windows of plasticity: Implications for the programming of obesity. **Evolution, Medicine, And Public Health**, [s.l.], v. 2014, n. 1, p.109-121, 5 ago, 2014.
 168. WELLS, Jonathan C.k.. The thrifty phenotype: An adaptation in growth or metabolism?. *American Journal Of Human Biology*, [s.l.], v. 23, n. 1, p.65-75, 2011.

169. WHITAKER-AZMITIA, P. M.; AZMITIA, E.C.. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors. **Neuroscience Letters**, v. 67, n. 3, p. 307-312, 1986.
170. WHITAKER-AZMITIA, P.. Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.23, p. 75–83, 2005.
171. WHITAKER-AZMITIA, P.M.. Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 1, p.75-83, 2005.
172. WHITAKER-AZMITIA, P.M.. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. **Brain Research Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 479-485, 2001.
173. WHITAKER-AZMITIA, P.M.; DRUSE, M.; WALKER, P.; LAUDER, J.M. Serotonin as a developmental signal. *Behavioral Brain Research*, v.73, p. 19-29, 1996
174. WRIGHT, D.E.; et al. Comparative localization of serotonin1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 351, p. 357-373, 1995.
175. XU, Y.; et al. Selective serotonin reuptake inhibitor disrupts organization of thalamocortical somatosensory barrels during development. **Developmental Brain Research**, v. 150, p. 151–161, 2004.
176. YADAV, V.K.; et al. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. **Cell Press**, v. 138, p. 976-989, 2009.
177. ZAHNISER, N. R.; DOOLEN, S. Chronic and acute regulation of Na⁺/Cl⁻ - dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. **Pharmacology therapeutics**, v. 92, n. 1, p. 21-55, 2001.
178. ZHENG, J.; XU, D. F.; LI, K.; WANG, H.T.; SHEN, P. C.; LIN, M., CAO, X. H.; WANG, R. Neonatal exposure to fluoxetine and fluvoxamine alters spine density in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons. **International Journal Clinical Experimental Pathology**, v. 4, p. 162–168, 2011.
179. ZHOU, F.C. et al. Serotonin transporter antibodies: production, characterization, and localization in the brain. **Molecular Brain Research**, v.43, p. 267–278, 1996.
180. ZHOU, F.C. et al., Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence, **Brain Research**. v.805, p. 241–254, 1998.
181. ZHOU, F.C.; SARI, Y.; ZHANG, J.K.. Expression of serotonin transporter protein in developing rat brain. **Developmental Brain Research**, v. 3, n.119, p. 33-45, Jan, 2000.

APÊNDICE

Apêndice A: Artigo Original 1

Apêndice B: Artigo de Revisão da Literatura

APÊNDICE A: ARTIGO ORIGINAL 1

Artigo Original intitulado: *Neonatal fluoxetine exposure modulates serotonergic neurotransmission and disturb inhibitory action of serotonin on food intake*, foi submetido para apreciação da Revista Behavioral Brain Research (Qualis A2, Fator de Impacto: 3.002).

manuscript BBR_2017_199 received by Behavioural Brain Research

 Behavioural Brain Research <Evisesupport@elsevier.com>
ter 14/02, 11:02
Você 

 Responder | 

Sinalizar para acompanhamento. Início por volta de quarta-feira, 1 de março de 2017. Conclusão por volta de quarta-feira, 1 de março de 2017.

Dear Ms. Pinheiro,

We have received the manuscript 'Neonatal exposure to fluoxetine modulates serotonergic neurotransmission and reduces the inhibitory action of serotonin on food intake.' for consideration for publication in Behavioural Brain Research. You have designated Sandra Lopes de Souza as the Corresponding Author of this manuscript.

The manuscript can now only be accessed by Sandra Lopes de Souza - it no longer appears on your homepage under 'My Submissions'. All further communications related to this submission will be sent to Sandra Lopes de Souza.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Behavioural Brain Research

This message was sent automatically. Please do not reply

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Neonatal fluoxetine exposure modulates serotonergic neurotransmission and disturb inhibitory action of serotonin on food intake.

Pinheiro, I. L.; Silva, A. I.; Reginato, A.; Silva Filho, R. C.; Galindo, L. C. M.; Matos, R. J. B.; Ferraz, J. C.; Toscano, A. E.; Milanski, M.; Manhães-de-Castro, R.; Sousa, S. L..

The neurotransmitter serotonin (5-HT) acts as an important regulator of the critical neurodevelopmental processes and thus alterations in 5-HT signaling early promotes permanent structural and functional changes in brain. The selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), as fluoxetine and citalopram, blocking serotonin transporter (SERT) at the presynaptic neuron, which regulates extracellular 5-HT levels. Evidence suggests that the exposure to SSRIs in the neurodevelopmental period may alters 5-HT signaling sensitivity on food intake control. The aim of the present study was to evaluate the effects of neonatal exposure to fluoxetine on molecular and cellular components of the serotonergic system and food intake control in young animals. Methods: The animals were divided according to experimental manipulation, Fluoxetine Group (FG): male pups received application of fluoxetine (10 mg/kg, 10 μ L/g) and Saline Group (SG): male pups received saline application (0.9% NaCl, 10 μ L/g), both throughout lactation (PND1 to PND21). They evaluated body weight, food intake, SERT gene and protein expression, serotonin content in the hypothalamus. The neonatal exposure to fluoxetine promoted reduction in body weight, disturb the serotonin hypophagic response, and increase the serotonin and SERT hypothalamic in young animals. We conclude that the changes of components of the serotonergic system by neonatal exposure to fluoxetine may be responsible for disturb the inhibitory action of serotonin on food intake.

Keywords: Serotonin, Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), Lactation, Serotonin Transporter (SERT), Phenotypic Plasticity.

1. Introduction

The serotonin (5-HT) regulates developmentally critical processes such as neurogenesis, neuronal differentiation, synaptogenesis and also acts on the self-regulation of serotonergic neurons and the development of target tissues during the critical period [1,2]. In rodents brain, serotonergic neurons are evidents, in raphe nuclei, between the tenth and twelfth day of gestation (E10-E12), with the synthesis of endogenous serotonin was detected one day after arise [3,4]. The placenta synthesizes 5-HT from maternally derived tryptophan precursor. Before 5-HT is synthesized by the brain itself this feature exogenous serotonin produced by the

placenta is required to maintain 5-HT normal levels in the early stage of development [7]. The maturation occurs around to PND21, in the end of the critical period in rats [3,5,6].

In the nervous system, the serotonin levels are regulated by the serotonin transporter (SERT). SERT gene expression is detected in the cell body of serotonergic neurons from the E12 and persists into adulthood in rodents. SERT acts on activation and desensitization of serotonergic receptors such as 5-HT_{1B} and 5-HT_{2C} [8]. Changes in SERT expression may alter serotonin signaling on 5-HT receptors. Neonatal exposure to citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), reduces SERT expression in the cortex of young and adult animals, and tryptophan hydroxylase enzyme (TPH), the rate-limiting enzymes in 5-HT synthesis, in the dorsal raphe nucleus of young animals after weaning [9]. SSRIs block SERT, preventing the return of 5-HT to the intracellular environment, extending its quantity and permanency in the synaptic cleft [10]. In contrast to the prolonged effects of neonatal exposure, chronic SSRI treatment in adults, showed no differences in the expression of SERT and TPH [9]. These data indicate a greater sensitivity to SSRIs during the critical period of development of the nervous system.

Several studies investigating the neonatal exposure to SSRIs and its consequences. In lactation, from PND1 to PND21, the use of SSRIs induced low body weight phenotype in young and adult animals [11,12,13,14]. Serotonin stimulates the reduction of food intake by stimulating satiety in rats [15]. This relationship is confirmed by studies showing an increase in serotonin levels in the hypothalamus to promote satiety [16] and its reduction as a stimulant intake [17]. Changes in serotonin levels during early life caused morphological and behavioral adaptations [18]. In addition, serotonin regulates feeding behavior by promoting depolarization and hyperpolarization of proopiomelanocortin neurons (POMC), via 5-HT_{2C} receptor and neuropeptide Y neurons (NPY) for acting on 5-HT_{1B} receptors, respectively [19]. The persistent increase in serotonin levels in the brain and hyperphagia have been observed in animals that have suffered perinatal malnutrition [20,21]. Exposure to 5-HT_{2C} and 5-HT_{1B} receptors agonists show a reduction in anorectic effects of serotonin in malnourished animals accompanied by a reduced sensitivity of the 5-HT_{1B} receptor [21].

This effect is observed in adult organisms, however, little is known as serotonin plays a hypophagia action in developing organisms. We propose to investigate the neonatal fluoxetine exposure promotes hyporesponsiveness to reduced food intake through changes of components of the serotonergic system in young animals.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

All experiments were performed in accordance to National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and approved by the Ethics Commission on the Use of Animal – CEUA/UFPE (Case No 23076.001483/2010-61). Primiparous female Wistar rats were maintained under standard conditions with a temperature of $23^{\circ}\text{C}\pm 1$, 12h light/dark cycle (dark: 6:00am to 6:00pm/ light: 6:00pm to 6:00am) and access ad libitum to water and food (commercial feed Labina® - Purina S/A).

At 120 days of age the rats were mated in the ratio of two females to one male. Pregnancy was conformed by the presence of sperm in the vaginal smear. One day after birth was considered the first day of life of the pups (P1) and was conducted random randomization of pups with ideal body weight (6g-8g) holding eight pups per dam. Each litter consisted of four pups from two pharmacological manipulation, Fluoxetine (n=4) and Saline (n=4). At weaning (PND21) the pups were allocated in cages with a total of four animals per cage until the time of analysis.

2.2. Experimental Groups

Initially, the experimental groups were randomly selected according to pharmacological manipulation. The Neonatal Saline Group (SG) received saline solution (0.9% NaCl, $10\mu\text{L/g}$) and Neonatal Fluoxetine Group (FG) received fluoxetine (10mg/kg, $10\mu\text{L/g}$), both of them were administered in neonatal period on PND1 to PND21 one hour after the start of the dark cycle (7:00am). The drug was obtained as fluoxetine hydrochloride was dissolved in saline solution (0.9% NaCl).

In Feeding Test days, the animals received an acute fluoxetine or saline dose (10 mg/kg, $10\mu\text{L/g}$) subcutaneously. The experimental groups were formed according to acute fluoxetina or saline dose: Neonatal Saline Group and Acute Saline in feeding test (SG + S), Neonatal Saline Group and Acute Fluoxetine in feeding test (SG + F),

Neonatal Fluoxetine Group and Acute Saline in feeding test (FG + S), and Neonatal Fluoxetine Group and Acute Fluoxetine in feeding test (FG + F).

2.3. Experiments

2.3.1. Body weight and feeding test

At PND1 to PND21 the body weight of the pups was obtained daily. After lactation, was recorded at PND40. At PND33, the animals were separated into individual cages for adaptation to isolation. At PND40, after fasting 3 hours, it was known amount of feed offered and evaluated 1 hour after intake by subtracting the weight of the feed rejected by the offered initial weight (g). Intake was measured again after 24 hours by subtracting the waste found by the initial weight of feed offered. At PND41, to test the action of fluoxetine on food intake, the animals were exposed to 3 hours of fasting and were then acute fluoxetine dose (10mg/kg, 10 μ L/g). After 30 minutes exposure, food intake was supplied and an hour was calculated as described above.

2.3.2. Serotonin Content

The animals of the neonatal saline and fluoxetine groups were sacrificed by decapitation on PND21, four hours after application of neonatal fluoxetine, and on PND40. After opening the skull, the brain was removed from the cranial cavity and dissected the hypothalamus. The tissues were placed in individual tubes and immediately frozen on dry ice, and then placed in freezer -82°C until the time of analysis. The hypothalamus was placed individually in tubes containing 1mL of 25mM Tris-HCl, pH 7.4, 1mM EDTA and 1mM EGTA, and homogenized with an Ultra-Turrax homogenizer (PT 18/10 type, Janke & Kunkel KG, Staufen, Germany). The homogenate was centrifuged at 11,000g at 4°C for 30minutes. The results of the supernatant was aliquoted for determining 5-HT levels. The tissue extract was used to determine the protein concentration [22]. After homogenizing the protein concentration in the hypothalamus it was determined by the Bradford method. This method consists of the formation of a compound of the blue absorption between basic amino acid residues of proteins and Coomassie blue dye. The absorbance depends on the amino acid content present in the tissue protein content [23].

Serotonin was determined by ELISA RE59121 kit (IBL, Hamburg, Germany) according to the instruction manual. This enzyme immunoassay is based on the principle of specific interaction between antigen and antibody. A purified antibody is attached to the inner surface of each well of the microplate. The biotinylated antigen and the non-biotinylated antigen (sample serotonin) compete for a fixed number of antibody binding sites. The amount of biotinylated antigen that binds to the antibody is inversely proportional to the concentration of the sample. When the system is in equilibrium, the free biotinylated antigen is removed by a washing step and the antigen bound biotinylated antibody is determined using an alkaline phosphatase enzyme. The sample quantification is performed by comparing the enzymatic activity with a sample response curve prepared using known standards. The determination was performed in duplicate. The results are expressed in ng/mg protein [22].

2.3.3. Serotonin Transporter Gene expression

Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) experiments were conducted on mRNA extracted from whole hypothalamus. Total RNA was extracted using the Trizol reagent (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) and treated with DNase (RNase free) for 30 minutes at 37°C. Afterwards, 2µL of purified RNA was reverse transcribed using Superscript II RNaseH - Reverse Transcriptase (Invitrogen®) in a total volume of 20µL. The resulting cDNA was diluted to 50µL water free DNase and RNase. Then 4,5µL of each diluted cDNA sample was used for PCR amplification using SYBR Green (Qiagen®, Courtaboeuf, France) as fluorogenic in a thermocycler (Qiagen®). The PCR procedure was an initial denaturation step of 5 min at 95°C followed by 40 cycles of 30s at 95°C and 30s at 60°C. The forward and reverse sequences (forward and reverse) primer used for amplification was: forward, 5'-GGA GGC GAT GAG GAA AGA TGA TG - 3'; Reverse 5'-GGA AGA CAA AGA TGA TGG AGA ACG - 3'. The relative levels of expression of the serotonin transporter mRNA in tissue samples was calculated using the comparative method DCT (Livak and Schmittgen, 2001) and β-actin RNA as normalizing gene [21].

2.3.4. Serotonin Transporter Density

After extraction, tissue samples from the hypothalamus (PND21 and PND40) were homogenized in freshly prepared ice-cold buffer [1% (v/v) Triton X-100,

0.1mol/L Tris, pH 7.4, 0.1mol/L sodium pyrophosphate, 0.1mol/L sodium fluoride, 0.01mol/L EDTA, 0.01mol/L sodium vanadate, 0.002mol/L PMSF and 0.01mg/mL aprotinin]. Insoluble material was removed by centrifugation (11,000g) for 30 min at 4°C. The protein concentration of the supernatant was determined using the Bradford dye-binding method. The supernatant was suspended in Laemmli sample buffer and boiled for 5 min before separation by SDS-PAGE using a miniature gel apparatus (BioRad, Richmond, CA, USA). Following electrophoresis, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were treated with a blocking buffer (5% nonfat dried milk, 10mM Tris, 150nM NaCl and 0.02% Tween 20) and were subsequently incubated overnight at 4°C with specific antibodies (anti-SERT, sc-33724, Santa Cruz, 1:1000). The membranes were then incubated with peroxidase Goat anti-mouse secondary antibodies (Jackson Immunoresearch, 1:40000). The proteins recognized by the secondary antibodies were detected by chemiluminescence (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate System – Pierce Biotechnology) and visualized by exposing the blot to Kodak XAR film. Band intensities were quantified by optical densitometry of developed autoradiographs (Scion Image software, ScionCorp, Walkersville, MD, USA) and the intensities of the bands were normalized to the loading of control β -actin (ab8227). All analyses were done using three to five animals per group [47].

3. Data Analysis

The data of body weight, food intake, serotonin hypothalamic, gene and protein expression SERT hypothalamic were analyzed by Student's t-test. In all evaluations, the level of significance was $p \leq 0.05$. All data were analysed using GraphPad Prism5 software (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA).

4. Results

4.1. Weight Body

The fluoxetine group had a lower body weight gain from PND11 (SG, 25.7 ± 0.6 , $n=10$ vs FG, 22.0 ± 0.6 , $n=10$) until the end of lactation and persisted up to PND40 (SG, 153.3 ± 8.3 , $n=10$ vs FG, 120.8 ± 8.3 , $n=9$) (Figure 1).

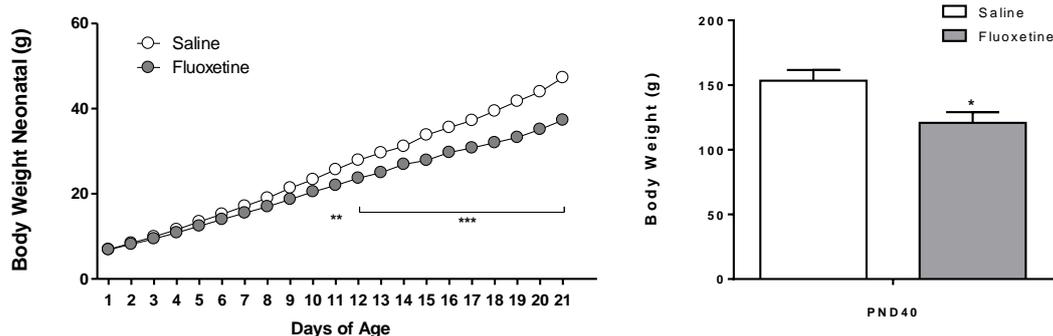


Figure 1: Effect of neonatal fluoxetine exposure on Body Weight in lactation and at PND40. The pups received saline solution (SG, n=10, 0.9% NaCl, 10 μ L/g) or fluoxetine (FG, n=10, 10mg/kg, 10 μ L/g) from PND1 to PND21. The data are represented in MEAN \pm SEM. *P=0.01, **P=0.001, ***P=0.0001, Student's t-test.

4.2. Postnatal Food Intake

No difference was found in relative dietary intakes when compared to saline groups (SG, 3.01 \pm 0.17g, n=11) and fluoxetine (FG, 3.36 \pm 0.22g, n=12). However, when we block SERT with an acute dose of fluoxetine, we see a reduction in the intake of saline group (SG, 3.01 \pm 0.17g, SG+FA, 2.31 \pm 0.21g, p=0,0142) but not for those in the fluoxetine group (FG, 3.36 \pm 0.22g, FG+FA 3.37 \pm 0.26g, p=0.9767) (Figure 2).

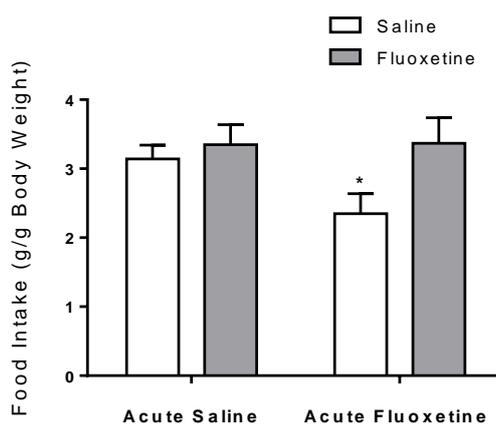


Figure 2: Effect of neonatal fluoxetine exposure on Food Intake at PND40 and PND41. The pups received saline solution (SG, n=18, 0.9% NaCl, 10 μ L/g) or fluoxetine (FG, n=19, 10mg/kg, 10 μ L/g) from PND1 to PND21. The experimental groups received an acute saline dose (SG + S; FG + S, 0.9% NaCl, 10 μ L/g) and an

acute fluoxetine dose (SG + F; FG + F, 10mg/kg, 10 μ L/g) one hour before the feeding test. The data are represented in MEAN \pm SEM. *P<0.05, Student's t-test.

4.3. Serotonin Hypothalamic

The fluoxetine group presented an increase in the hypothalamic concentration of 5-HT at 21 days of life when compared to the saline group (SG, 4.55 \pm 0.55; n=4 vs FG, 7.12 \pm 0.96; n=3). However, after nineteen days without drug exposure at 40 days of age, 5-HT levels did not show any change between groups (SG, 3.87 \pm 0.49, n=4 vs FG, 3.55 \pm 0.46, n=3) (Figure 3).

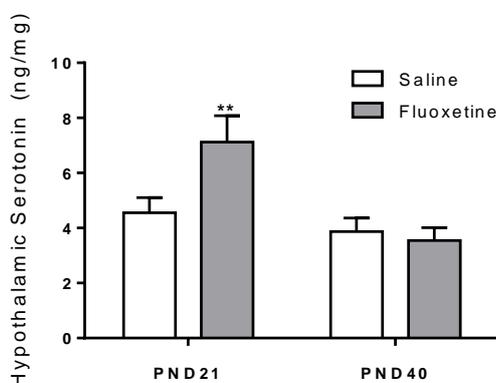


Figure 3: Effect of neonatal fluoxetine exposure on Serotonin Hypothalamic at PND21 and PND40. The pups received saline solution (SG, n=4, 0.9% NaCl, 10 μ L/g) or fluoxetine (FG, n=3, 10mg/kg, 10 μ L/g) from PND1 to PND21. The data are represented in MEAN \pm SEM. **P<0.06, Student's t-test.

4.4. SERT gene and protein expression in Hypothalamus

The fluoxetine group presented an increase SERT gene in hypothalamus at PND21 (SG, 0.82 \pm 0.04, n=3 vs FG, 1.01 \pm 0.04 n=5) and PND40 (SG, 1,00 \pm 0.03, n=5 vs FG, 1.40 \pm 0.03, n=5) when compared to the saline group (Figure 4). It was also observed higher protein content of the SERT in the hypothalamus of the fluoxetine group when compared to the saline group at PND21 (SG, 100,00 \pm 4.47, n=5 vs FG, 119.25 \pm 6.47 n=4), and PND40 (SG, 92.29 \pm 3.40 n=4 vs FG, 117.96 \pm 8.75 n=4) (Figure 5).

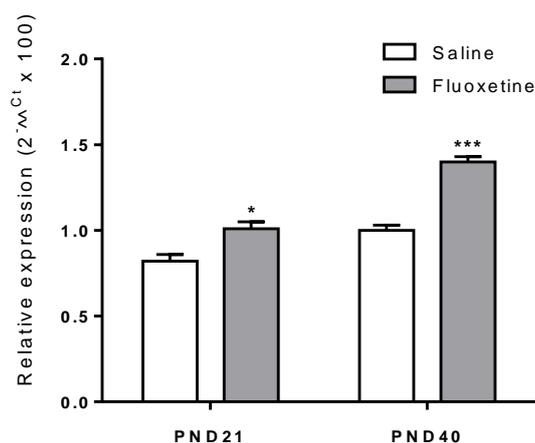


Figure 4: Effect of neonatal fluoxetine exposure on SERT gene expression in Hypothalamus at PND21 and PND40. The pups received saline solution (SG, n=3 or 5, 0.9% NaCl, 10 μ L/g) or fluoxetine (FG, n=4 or 5, 10mg/kg, 10 μ L/g) from PND1 to PND21. Column pairs represent the expression of SERT mRNA levels relative to the amplified endogenous β -actin within the same sample under the same experimental conditions. The data are analyzed were performed in triplicates and represented in MEAN \pm SEM. *P<0,02; ***p<0,0001, Student's t-test.

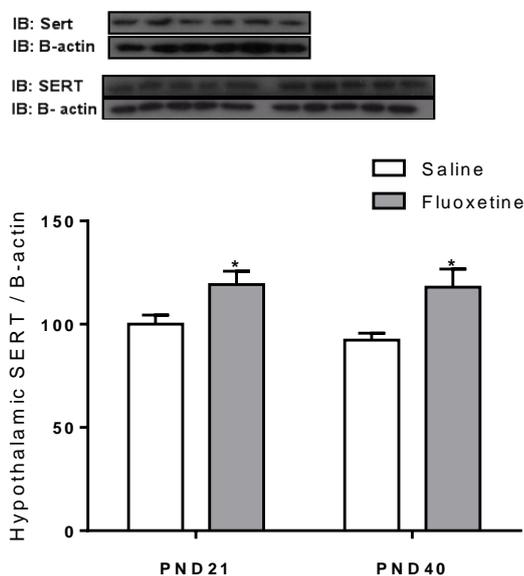


Figure 5: Effect of neonatal fluoxetine exposure on SERT protein expression in Hypothalamus at PND21 and PND40. The pups received saline solution (SG, n=4, 0.9% NaCl, 10 μ L/g) or fluoxetine (FG, n=4, 10mg/kg, 10 μ L/g) from PND1 to PND21. Column pairs represent the expression of SERT protein levels relative to

endogenous β -actin. The data analyses were performed in duplicates and represented in MEAN \pm SEM. *P<0,03, Student's t-test.

5. Discussion

In the present study, the neonatal exposure to fluoxetine promoted reduction of the body weight of the animals from the 11th day of lactation, remaining after the withdrawal of the drug until the PND40. Increased serotonin and serotonin transporter concentration in the hypothalamus was also observed at PND21. The increase of the serotonin transporter was maintained after PND40, promoting a reestablishment of the serotonin levels of these animals. Associated with these results, acute stimulation with fluoxetine at PND41 demonstrated the hyporesponsiveness of the inhibitory action of serotonin on food intake.

In the literature it is well evidenced that the exposure to SSRI during lactation induces a phenotype of low body weight and a reduction in food intake [11,12,13,14]. Fluoxetine exposure promoted a 22% reduction in body weight at PND21 [13]. Citalopram exposure also induced lower body weight when given at that time [12]. The low body weight phenotype remained until the adulthood of the animals exposed to neonatal fluoxetine [14]. The increased synaptic availability of serotonin in the CNS promoted by fluoxetine cause weight loss in rodents as a consequence of its inverse relationship with energy consumption, as it promotes a reduction in food intake by stimulating satiety in rats [15]. Inhibition of serotonin reuptake is related to hypophagia [24]. This effect is observed in mature organisms, however, little is known about how serotonin acts on energy balance regulation during growth and development. Since during the period of development of the nervous system serotonin does not appear to have its hypophagic action completely matured.

As observed in our findings, with the acute fluoxetine stimulus at PND41 the animals did not present a reduction in food intake. This finding demonstrates a hyporesponsiveness of the hypophagic action of serotonin as a consequence of the neonatal exposure to fluoxetine. The perinatal malnutrition, an event that promotes an increase in brain serotonin, also reduced the serotonergic hypophagic response after acute application of fenfluramine in animals at PND35 [21]. The 5-HT_{2C} Knockout mice exhibited resistance to the anorectic effects of the agonist of this receptor, mCPP, and of D-fenfluramine [25,26]. Some findings in the literature indicate that the inhibitory action of serotonin and also of fenfluramine on food intake

can be mediated through a mechanism of interaction by the 5-HT_{1B} and 5-HT_{2C} receptors [14,19,21,27]. However, chronic exposure to SSRI favors the desensitization of serotonergic receptors function as a consequence of prolonged high 5-HT levels [28,29]. These evidences indicate that the postnatal period is important for the programming of food intake in rodents. Notably, for the development of appetite regulatory pathways in the hypothalamus, they occur predominantly after birth [30,31].

We observed that chronic neonatal fluoxetine exposure increases the hypothalamic serotonin content at the end of lactation, which returning to control levels weeks after drug withdrawal. Studies with SSRIs show that blockade of serotonin reuptake increases the synaptic 5-HT availability, similarly in SERT knockout (SERTKO) animals [32]. In addition, serotonergic manipulation during the perinatal period promotes changes in the components of this system [32,33,34,35]. It was found that prenatal exposure to fluoxetine reduced 28% of 5-HT content in the frontal cortex of male rats at PND26 [33]. Though, this difference was not observed in the hypothalamus, hippocampus and brainstem [33]. These data demonstrate the sensitivity of certain brain regions to SSRI exposure during the developmental phase of the nervous system. MAO inhibitor-treated animals, a 5-HT degradation enzyme, showed a reduction in the density of serotonergic terminals in the cortex on the PND5, being more impaired at PND30 [36]. Exposure to SSRIs in the developmental period may affect the regulation of central serotonin and consequently the normal maturation of the pre and post-synaptic central serotonergic pathways [33]. The repercussions on serotonergic system homeostasis during the early developmental period have received little attention, in contrast to the vast number of studies investigating the use of SSRIs in adult animals and the effects on components of the system in question.

The chronic neonatal fluoxetine exposure induced increased gene and protein expression of the SERT in the hypothalamus during and after exposure to the drug. This result demonstrates the control of serotonergic system. Such as a feedback reaction for blockade of the reuptake, the SERT transcription gene and SERT translation into protein would be increased even after suppression of the drug in order to allow a greater control of high 5-HT extracellular levels at PND21. The use of SSRIs during gestation or childhood can modify properties of neurons expressing

SERT through changes in their specific transcription or changes in their gene expression [37].

The results of long-term antidepressant use on SERT are contradictory. Many studies on SSRIs and their action on the expression of SERT find increase, reduction and other no changes [38,39,40,41,42]. This contradiction is due to the type of drug used, the duration, the period of treatment, and the doses administered. Fluoxetine exposure at last week of gestation caused an increase in SERT density in the lateral nucleus of the hypothalamus at PND28 [40]. These animals also presented a decrease in SERT density in the dorsomedial nucleus, and there was no difference in arcuate, paraventricular and ventromedial hypothalamic nuclei [40]. These changes are relevant since these nuclei play an important role in controlling eating behavior and regulating body weight [43].

In mice, SERT expression brain is closely related to the distribution of TPH in neuronal cell body [44]. Compensatory mechanisms and neuroadaptive changes occur in SERTKO mice during the embryonic period and subsequent neurodevelopment [34]. SERTKO mice have increased concentrations and release of 5-HT in the cortex and striatum [32]. As a result of poor recycling of serotonin, these animals present compensatory alterations, such as increased synthesis and turnover of 5-HT in brain regions [34,35]. The control of 5-HT levels during the critical period is important for the development of the nervous system. The high level of 5-HT found during exposure to fluoxetine implies an increase in SERT activity and stimulates the synthesis of new SERT proteins, promoting the increase of the gene and protein expression of this transporter [45]. Substrate uptake and/or maintenance of SERT activity allows retention of this transport protein on the surface of the plasma membrane [46]. However, after discontinuation of drug administration, inhibition of 5-HT uptake disappears [45]. From these data we conclude that the prolonged increase of the serotonergic activity in the brain, by chronic neonatal fluoxetine exposure, induced a permanent adaptation on the homeostasis of serotonergic neurotransmission and a disturb in inhibitory action of serotonin on food intake.

Acknowledgement to CNPQ to financial support of the projects: The influence of the perinatal environment on mechanisms regulating eating behavior: an approach to the serotonergic system and Nutritional and pharmacological programming of the

serotonergic system: an integrated approach to possible molecular, epigenetic, metabolic, physiological and behavioral mechanisms.

6. Reference List

- [1] J. M. Lauder. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci*, 16 (1993), pp. 233-240
- [2] P. Whitaker-Azmitia, M. Druse, P. Walker, J. Lauder. Serotonin as a developmental signal. *Behavioural Brain Research*, 73 (1995), pp. 19-29
- [3] H. G. W. Lidov, M. E. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain research*, 8 (1982), pp. 389-430
- [4] P. Gaspar, O. Cases, I. Maroteaux. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Neuroscience*, 4 (2003), pp. 1002–1012
- [5] H. W. Steinbusch. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6 (1981), pp. 557-618
- [6] M. Lautenschlager, M. Holtje, B. von Jagow, R. W. Veh, C. Harms, A. Bergk, U. Dirnagl, G. Ahnert-Hilger, H. Hortnagl. Serotonin uptake and release mechanisms in developing cultures of rat embryonic raphe neurons: age- and region-specific differences. *Neuroscience*, 99 (2000), PP. 519–527
- [7] A. Bonnin, N. Goeden, K. Chen, M. Wilson, J. King, J. Shih, R. D. Blakely, E. S. Deneris, P. Levitt. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature*, 472 (2011), PP. 347-350
- [8] S. R. Hansson, T. M. Cabrera-Vera, B. J. Hoffman. Infraorbital nerve transection alters serotonin transporter expression in sensory pathways in early postnatal rat development. *Developmental brain research*, 111 (1998), pp. 305-14
- [9] D. Maciag, K. L. Simpson, D. Coppinger, Y. Lu, Y. Wang, R. C. Lin, I. A. Paul. Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry. *Neuropsychopharmacology*, 31 (2006), pp. 47-57
- [10] A. W. Ravna, I. Sylte, K. Kristiansen, S.G. Dahl. Putative drug binding conformations of monoamine transporters. *Bioorg Med Chem*, 14 (2006), pp. 666-675
- [11] R. Manhães de Castro, J.M. Barreto Medeiros, C. Mendes da Silva, L. M. P. Ferreira, R. C. A. Guedes, J. E. Cabral Filho, J. A. Costa. Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. *Braz J Med Biol Res*, 34 (2001), pp. 121-124
- [12] T. C. B. J. Deiró, R. Manhães de Castro, J. E. Cabral-Filho, S. L. Souza, S. R. Freitas-Silva, L. M. P. Ferreira, R. C. A. Guedes, C. R. V. Câmara, K. M. F. T. Barros. Neonatal administration of citalopram delays the somatic maturation. *Braz J Med Biol Res*, 37 (2004), pp. 1503-1509
- [13] C. M. Silva, L. Gonçalves, R. Manhaes de Castro, M. I. Nogueira. Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. *Neurosci Lett*, 483 (2010), pp. 179-183

- [14] L. C. Galindo, M. L. Barros, I. L. Pinheiro, R. V. Santana, R. J. Matos, C. G. Leandro, S. L. Souza, R. M. Castro. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. *Int J Dev Neurosci*, 46 (2015), pp. 76-81
- [15] J. E. Blundell, J. C. Halford. Regulation of nutrient supply: the brain and appetite control. *Proc Nutr Soc*, 53 (1994), pp. 407-418
- [16] R. Schreiber, K. Selbach, M. Asmussen, D. Hesse, J. de Vry. Effects of serotonin(1/2) receptor agonists on dark-phase food and water intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 67 (2000), pp.291-305
- [17] J. C. Halford, J. A. Harrold, C. L. Lawton, J. E. Blundell. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets*, 6 (2005), pp. 201-213
- [18] I. M. McNamara, A. W. Borella, L. A. Bialowas, P. M. Whitaker-Azmitia. Further studies in the developmental hyperserotonemia model (DHS) of autism: social, behavioral and peptide changes. *Brain Res*, 1189 (2008), pp. 203-214
- [19] L. K. Heisler, E. E. Jobst, G. M. Sutton, L. Zhou, E. Borok, Z. Thornton-Jones, H. Y. Liu, J. M. Zigman, N. Balthasar, T. Kishi, C. E. Lee, C. J. Aschkenasi, C. Y. Zhang, J. Yu, O. Boss, K. G. Mountjoy, P. G. Clifton, B. B. Lowell, J. M. Friedman, T. Horvath, A. A. Butler, J. K. Elmquist, M. A. Cowley. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron*, 51 (2006), pp. 239-249
- [20] G. Manjarrez, L. Manuel-A, R. Mercado-C, J. Hernandez-R. Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. *Int J Dev Neurosci*, 21 (2003), pp. 283-289
- [21] S. L. de Souza, R. Orozco-Solis, I. Grit, R. M. de Castro, F. Bolaños-Jiménez. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci*, 27 (2008), pp. 1400-1408
- [22] S. S. Mateos, C. L. Sánchez, S. D. Paredes, C. Barriga, A. B. Rodríguez. Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 104 (2009), pp. 52-59
- [23] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72 (1976), pp. 248-254
- [24] I. Angel, M. A. Taranger, Y. Claustre, B. Scatton, S. Z. Langer. Anorectic activities of serotonin uptake inhibitors: correlation with their potencies at inhibiting serotonin uptake in vivo and 3H-mazindol binding in vitro. *Life Sci*, 43 (1988), pp. 651-658
- [25] L. H. Tecott, L. M. Sun, S. F. Akana, A. M. Strack, D. H. Lowenstein, M. F. Dallman, D. Julius. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2C} serotonin receptors. *Nature*, 374 (1995), pp. 542-546
- [26] S. P. Vickers, P. G. Clifton, C. T. Dourish, L. H. Tecott. Reduced satiating effect of D-fenfluramine in serotonin 5-HT_{2C} receptor mutant mice. *Psychopharmacology*, 143 (1999), pp. 309-314

- [27] L. K. Heisler, M. A. Cowley, L. H. Tecott, W. Fan, M. J. Low, J. L. Smart, M. Rubinstein, J. B. Tatro, J. N. Marcus, H. Holstege, C. E. Lee, R. D. Cone, J. K. Elmquist. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science*, 297 (2002), pp. 609-611
- [28] S. Hjorth, H. J. Bengtsson, A. Kullberg, D. Carlzon, H. Peilot, S. B. Auerbach. Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action. *J Psychopharmacol*, 14 (2000), pp. 177-185
- [29] E. C. Azmitia. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull*, 56 (2001), pp. 413-424
- [30] Y. Kagotani, T. Hashimoto, Y. Tsuruo, H. Kawano, S. Daikoku, K. Chihara. Development of the neuronal system containing neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Int J Dev Neurosci*, 7 (1989), pp. 359-374
- [31] K. L. Grove, M. S. Smith. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav*, 79 (2003), pp. 47-63
- [32] T. A. Mathews, D. E. Fedele, F.M. Coppelli, A. M. Avila, D. L. Murphy, A. M. Andrews. Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression. *J Neurosci Methods*, 140 (2004), pp. 169-181
- [33] T. M. Cabrera-Vera, F. Garcia, W. Pinto, G. Battaglia. Effect of prenatal fluoxetine (Prozac) exposure on brain serotonin neurons in prepubescent and adult male rat offspring. *J Pharmacol Exp Ther*, 280 (1997), pp. 138-145
- [34] D. Bengel, D. L. Murphy, A. M. Andrews, C. F. Wichems, D. Feltner, A. Heils, R. Mössner, H. Westphal, K. P. Lesch. Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol*, 53 (1998), pp. 649-655
- [35] D. K. Kim, T. J. Tolliver, S. J. Huang, B. J. Martin, A. M. Andrews, C. Wichems, A. Holmes, K. P. Lesch, D. L. Murphy. Altered serotonin synthesis, turnover and dynamic regulation in multiple brain regions of mice lacking the serotonin transporter. *Neuropharmacology*, 49 (2005), pp. 798-810
- [36] P. M. Whitaker-Azmitia, M. Druse, P. Walker, J. M. Lauder. Serotonin as a developmental signal. *Behav Brain Res*, 73 (1996), pp. 19-29
- [37] N. Narboux-Nême, L. M. Pavone, L. Avallone, X. Zhuang, P. Gaspar. Serotonin transporter transgenic (SERT^{cre}) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). *Neuropharmacology*, 55 (2008), pp.994-1005
- [38] R. D. Blakely, L. I. De Felice, H. C. Hartzell. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J Exp Biol*, 196 (1994), pp.263-281
- [39] S. Ramamoorthy, E. Giovanetti, Y. Qian, R. D. Blakely. Phosphorylation and Regulation of Antidepressant-sensitive Serotonin Transporters. *J Biol Chem*, 273 (1998), pp. 2458–2466
- [40] T. M. Cabrera-Vera, G. Battaglia. Prenatal exposure to fluoxetine (Prozac) produces site-specific and age-dependent alterations in brain serotonin transporters

in rat progeny: evidence from autoradiographic studies. *J Pharmacol Exp Ther*, 286 (1998), pp.1474-1481

[41] H. H. Hansen, J. D. Mikkelsen. Long-term effects on serotonin transporter mRNA expression of chronic neonatal exposure to a serotonin reuptake inhibitor. *Eur J Pharmacol*, 352 (1998), pp. 307-315

[42] S. Benmansour, M. Cecchi, D. A. Morilak, G. A. Gerhardt, M. A. Javors, G. G. Gould, A. Frazer. Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level. *J Neurosci*, 19 (1999), pp. 10494-10501

[43] L. E. Grzeskowiak, A. L. Gilbert, J. L. Morrison. Long term impact of prenatal exposure to SSRIs on growth and body weight in childhood: evidence from animal and human studies. *Reprod Toxicol*, 34 (2012), pp.101-109

[44] B. J. Hoffman, S. R. Hansson, E. Mezey, M. Palkovits. Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. *Front Neuroendocrinol*, 19 (1998), pp. 187-231

[45] R. Iceta, J. E. Mesonero, A. I. Alcalde. Effect of long-term fluoxetine treatment on the human serotonin transporter in Caco-2 cells. *Life Sci*, 80 (2007), pp. 1517-1524

[46] N. R. Zahniser, S. Doolen. Chronic and acute regulation of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. *Pharmacology & therapeutics*, 92 (2001), pp. 21-55

[47] J. Zhang, Y. Fan, Y. Li, H. Zhu, L. Wang, M.Y. Zhu.

Chronic social defeat up-regulates expression of the serotonin transporter in rat dorsal raphe nucleus and projection regions in a glucocorticoid-dependent manner.

Journal of Neurochemistry, 123 (2012), pp. 1054-1068

APÊNDICE B: ARTIGO DE REVISÃO DA LITERATURA

Artigo de Revisão intitulado: *Atividade Serotoninérgica Perinatal: um fator decisivo para o controle da ingestão alimentar*, foi recomendado para publicação e atualmente encontra-se sob a apreciação dos revisores da Revista de Nutrição - ISSN 1678-9865 (Qualis B2, Fator de Impacto: 0,445).

23-Jan-2017

Dear Miss Pinheiro:

Por gentileza, ver anexos e confirmar recebimento deste e-mail.

Manuscript ID RN-2016-0277 entitled "**Atividade Serotoninérgica Perinatal: um fator decisivo para o controle da ingestão alimentar.**" which you submitted to the Revista de Nutrição, has been reviewed. The comments of the reviewer(s) are included at the bottom of this letter.

The reviewer(s) have recommended publication, but also suggest some revisions to your manuscript. Therefore, I invite you to respond to the reviewer(s)' comments and revise your manuscript.

To revise your manuscript, log into <https://mc04.manuscriptcentral.com/rn-scielo> and enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision." Your manuscript number has been appended to denote a revision.

You will be unable to make your revisions on the originally submitted version of the manuscript. Instead, revise your manuscript using a word processing program and save it on your computer. Please also highlight the changes to your manuscript within the document by using the track changes mode in MS Word or by using bold or colored text.

Once the revised manuscript is prepared, you can upload it and submit it through your Author Center.

When submitting your revised manuscript, you will be able to respond to the comments made by the reviewer(s) in the space provided. You can use this space to document any changes you make to the original manuscript. In order to expedite the processing of the revised manuscript, please be as specific as possible in your response to the reviewer(s).

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to the Revista de Nutrição, your revised manuscript should be submitted by 03-Feb-2017. If it is not possible for you to submit your revision by this date, we may have to consider your paper as a new submission.

Once again, thank you for submitting your manuscript to the Revista de Nutrição and I look forward to receiving your revision.

Sincerely,
Editor-in-Chief, Revista de Nutrição

Revista de Nutrição



Atividade Serotoninérgica Perinatal: um fator decisivo para o controle da ingestão alimentar.

Journal:	<i>Revista de Nutrição</i>
Manuscript ID	RN-2016-0277
Manuscript Type:	Experimental Nutrition
Keyword – Click here .	Serotonina, Ingestão Alimentar, Desenvolvimento, Plasticidade Celular

Atividade Serotoninérgica Perinatal: um fator decisivo para o controle da ingestão alimentar.

Isabeli Lins Pinheiro, Bárbara Juacy Rodrigues Costa de Santana, Lígia Cristina Monteiro Galindo, Raul Manhães de Castro e Sandra Lopes de Sousa.

Resumo

O sistema serotoninérgico apresenta funções no controle de eventos biológicos fundamentais para o desenvolvimento adequado do sistema nervoso. A serotonina (5-HT) e o Transportador de Serotonina (SERT) são indispensáveis para esta função de controle. A disponibilidade destes componentes é precisamente regulada durante o período de desenvolvimento, e podem sofrer interferências provindas do ambiente alterando sua ação sobre o sistema nervoso. A desnutrição, a inibição da recaptação da serotonina a partir de fármacos e mudanças na expressão de gênica do transportador de serotonina na gestação e lactação podem induzir o aumento de serotonina alterando sua ação anorexígena. As respostas fisiológicas desempenhadas pela serotonina no controle da ingestão exibem uma resistência quando requisitadas por estímulos ou estresses agudos, demonstrando que os animais ou indivíduos desenvolvem adaptações de acordo com as agressões ambientais sofridas no período de desenvolvimento. Patologias como, ansiedade e obesidade, parecem estar associadas à resposta do organismo a um estresse ou estímulo, necessitando de uma maior ação do sistema serotoninérgico. Estes achados demonstram a importância do conteúdo da serotonina no período perinatal ao desenvolvimento de aspectos moleculares e morfológicos do controle da ingestão alimentar, e sua função determinante para a compreensão das possíveis influências ambientais causadoras de patologias na vida adulta.

Termos de indexação: Serotonina, Ingestão alimentar, Crescimento e desenvolvimento, Desnutrição, Inibidores da Captação de Serotonina.

Perinatal Serotonergic Activity: a decisive factor in the control of food intake.

Isabeli Lins Pinheiro, Bárbara Juacy Rodrigues Costa de Santana, Lígia Cristina Monteiro Galindo, Raul Manhães de Castro e Sandra Lopes de Sousa.

Abstract

The serotonergic system controls key events related to adequate nervous system development (e.g. neurogenesis, sinaptogenesis, axonal myelination). The neurotransmitter Serotonin (5-HT) and the Serotonin Transporter (SERT) plays a critical role control in the biological events. The availability of these components is precisely regulated during the development period, and they may undergo interferences from the environment by altering their action on the nervous system. Environmental factors as undernutrition and selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) may increase the availability of serotonin in the synaptic cleft and alters its anorectic action. The physiological responses performed by the intake control serotonin exhibit resistance when requested by or acute stress stimuli, showing that animals or individuals develop adjustments in accordance with the environmental aggressions in the development period. Pathologies such as anxiety and obesity appear to be associated with the body response to a stress or stimulus and require a greater action of the serotonergic system. These findings demonstrate the importance of serotonin content in perinatal period to the development of molecular and morphological aspects of the control of food intake, and its decisive role in understanding the possible environmental influence cause diseases in adulthood.

Keywords: Serotonin, Food Intake, Growth and Development, Malnutrition, Serotonin Uptake Inhibitors.

Atividade Serotoninérgica Perinatal: um fator decisivo para o controle da ingestão alimentar.

O sistema serotoninérgico é primordial para o desenvolvimento adequado do sistema nervoso. A serotonina (5-HT) e o transportador de serotonina (SERT) são essenciais à ontogênese e maturação do sistema nervoso¹. Influências ambientais como a desnutrição, a inibição seletiva da recaptação da serotonina e a alteração na expressão gênica do transportador de serotonina durante estágios precoces do desenvolvimento podem induzir o aumento na disponibilidade central de serotonina favorecendo o atraso no disparo da saciedade associado à hiperfagia e a redução de seus efeitos anorexígenos em organismos adultos²⁻⁴. No entanto, apesar do volume de pesquisas realizadas nos últimos anos, a origem dos mecanismos fisiológicos e moleculares controlados pelo sistema serotoninérgico ainda não foi totalmente esclarecida. Este artigo de revisão destaca a influência da atividade serotoninérgica durante o período de desenvolvimento no controle da ingestão alimentar.

Período crítico do desenvolvimento e Plasticidade Fenotípica

A plasticidade fenotípica é estabelecida para desempenhar a função central na etiologia de doenças crônico-degenerativas, associada à hipótese da origem desenvolvimentista da saúde e da doença. O risco do surgimento de doenças crônicas demonstra estreita relação com o ambiente no qual o indivíduo se desenvolveu e o estilo de vida em que se encontra na vida adulta. A plasticidade fenotípica é considerada um processo adaptativo que permite refinar os padrões e mecanismos de desenvolvimento do organismo de acordo com o ambiente em que o mesmo se encontra. Na perspectiva adaptativa, o indivíduo será beneficiado por sua capacidade de se adaptar às condições do ambiente⁵.

Evidências destas adaptações estudadas ao longo dos anos em humanos foram demonstradas em 1970, com o estudo de Ravelli⁶. A Fome Holandesa (*Dutch famine*) foi denominada o período de escassez alimentar sofrido por mulheres gestantes na 2ª Guerra Mundial (1944-1945). Aproximadamente 300.000 homens exibiram na vida adulta, diferentes padrões na composição corporal a depender do período na qual haviam sido expostos à desnutrição materna na gestação. Se a

desnutrição ocorresse no último trimestre da gestação, esses indivíduos apresentavam baixa incidência de obesidade. No entanto, se ocorresse no primeiro trimestre, os indivíduos apresentavam uma maior incidência de obesidade⁶.

Na década de 60, Neel⁷ descreveu a “hipótese do genótipo poupador”, propondo que algumas populações apresentavam maior susceptibilidade a desenvolver resistência à insulina, podendo esta patologia estar associada a fatores ambientais ou genéticos. Esta adaptação do organismo poderia trazer benefícios para indivíduos que foram expostos a ambientes de escassez alimentar⁷. Algumas hipóteses foram exploradas a partir do estudo de Neel⁷, levando a uma maior compreensão sobre a importância do período de gestação e aleitamento para a susceptibilidade ao surgimento de patologias na vida adulta. Temas como programação metabólica e período crítico do desenvolvimento, atrelados a estes conhecimentos permitiram uma maior compreensão sobre patologias como diabetes e obesidade.

O período crítico representa uma janela de desenvolvimento que não pode ser invertida ou repetida em um momento posterior. Os processos de organização são modificados ou interrompidos mais facilmente durante o momento em que ocorrem mais rapidamente⁸. Durante o desenvolvimento, em oposição ao período de manutenção, os processos fisiológicos não apresentam uma taxa uniforme de surgimento e duração. Todos os processos exibem períodos críticos cuja importância e duração dependerá de suas taxas de variação. No encéfalo embrionário, muitos eventos fisiológicos apresentam uma aceleração, diminuição ou término de suas atividades em um curto período de tempo. O conceito de vulnerabilidade implica que o processo de organização é sujeito às perturbações que influenciam sua taxa de surgimento ou duração⁹.

O período de desenvolvimento do sistema nervoso é composto por eventos biológicos como proliferação e diferenciação celular, migração de neurônios, mielinização e sinaptogênese que atuam na organização e especialização de diversas estruturas cerebrais⁹. Durante esta janela temporal, são extremamente sensíveis aos estímulos provindos do ambiente⁸. Em humanos, o período crítico compreende a fase pré-natal, em particular o último trimestre da gestação e tem seguimento até os cinco primeiros anos de vida. Em roedores, esta fase perdura até as três primeiras semanas de vida pós-natal, o período de aleitamento⁹.

Estudos epidemiológicos demonstraram a existência da correlação entre o período crítico do desenvolvimento com o surgimento de patologias metabólicas na vida adulta. Um dos primeiros sugerido por Hales e Barker¹⁰, denominado Hipótese do Fenótipo Pougador (*Thrifty Phenotype Hypothesis*), propôs que estímulos ou insultos ocorridos durante o período perinatal, gestação e aleitamento, poderiam promover adaptações fisiológicas e metabólicas. Estas adaptações poderiam privilegiar o aporte nutricional para o desenvolvimento de órgãos vitais, como o encéfalo, em detrimento de outros órgãos. A curto prazo, o organismo teria a capacidade de se adaptar ao meio ambiente a fim de permitir sua sobrevivência, no entanto, a longo prazo, estas adaptações tornariam o organismo susceptível ao aparecimento de patologias. Os estudos da hipótese do Fenótipo Pougador associam o pobre crescimento fetal e na infância com o maior risco de desenvolvimento de tolerância à glicose diminuída e síndrome metabólica na vida adulta. Uma questão chave para a discussão da hipótese é a proporção na qual os mecanismos subjacentes são genéticos ou ambientais¹⁰.

Em meio ao estudo das hipóteses do Genótipo Pougador, Fenótipo Pougador e Programação Metabólica surge um novo modelo teórico proposto por Wells⁵, que associa a trajetória de crescimento desde a infância até a maturidade ao risco de doenças cardiovasculares na idade adulta. Nesta hipótese, o peso ao nascer é considerado como um índice de “capacidade metabólica”, na qual a estrutura e função dos órgãos durante a vida fetal e infância são promotores da manutenção da homeostase. De acordo com este modelo, o aumento no tamanho do corpo e o maior acúmulo de tecido adiposo são preditores do aumento da carga metabólica, da mesma maneira que o baixo peso ao nascer é preditor de uma capacidade metabólica reduzida⁵.

Os modelos teóricos estão inseridos na Hipótese da Origem Fetal de Doenças da Vida Adulta ou Plasticidade Fenotípica. Segundo Gluckman e Hasson¹¹, a predisposição genética associada à estímulos ambientais durante o desenvolvimento do organismo influenciam as respostas adaptativas do mesmo ao ambiente atual e favorecem o aparecimento de patologias na vida adulta. Sendo assim, a Plasticidade Fenotípica representa as respostas de organismos a diferentes condições ambientais que geram uma série de fenótipos distintos (estados morfológicos ou fisiológicos) potencialmente expressos por um genótipo¹¹. Para

ajustar os processos celulares de acordo com alterações das condições ambientais, a programação epigenética permite modificação hereditária e reversível da expressão gênica sem alteração na sequência do DNA¹². A regulação epigenética pode “programar” a informação genética e o destino celular, e determinar a funcionalidade do organismo, incluindo o cérebro. Estes mecanismos permitem respostas adaptativas às alterações do ambiente e otimizam as chances de sobrevivência e reprodução¹². Em mamíferos, os sinais que induzem a plasticidade do desenvolvimento são mediados durante o período fetal e neonatal¹². A indução de fenótipos alterados nos filhotes através das mães pode envolver alterações no epigenoma devido a alterações na atividade da DNA metiltransferase e estruturas de histonas¹². Nesta revisão, destacamos influências ambientais como a desnutrição, a inibição seletiva da recaptação da serotonina e a alteração na expressão gênica do transportador de serotonina durante o período desenvolvimento associados ao conteúdo de serotonina no Sistema Nervoso Central neste período como eventos ambientais promotores de modificações estruturais, fisiológicas e comportamentais, especialmente no controle da ingestão alimentar.

Sistema Serotoninérgico e Desenvolvimento

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma monoamina amplamente distribuída no sistema nervoso central. Durante o desenvolvimento, atua como sinalizador celular, neuromodulador, hormônio e neurotransmissor, e sua função pode variar a depender da região que está localizada e da fase de desenvolvimento e maturação na qual o organismo se encontra. A atividade desta molécula influencia a indução de neurogênese, diferenciação neuronal, sinaptogênese e também permite a auto-regulação de neurônios serotoninérgicos e desenvolvimento de tecidos-alvos¹³. O controle destes eventos biológicos é fundamental para o desenvolvimento adequado do sistema nervoso central. Os primeiros estudos puderam identificar o conteúdo central de serotonina, morfologia de seus neurônios, assim como, componentes deste sistema de neurotransmissão, a enzima triptofano hidroxilase (TPH), o transportador de serotonina (SERT) e a presença da própria serotonina^{1,14-16}.

No encéfalo humano, os neurônios 5-HT são evidenciados pela primeira vez no tronco encefálico a partir da 5ª semana de gestação¹⁴. Os níveis encefálicos de

5-HT aumentam ao longo da gestação até os dois primeiros anos de vida, com o pico aos cinco anos de vida¹⁷. Em roedores, o aparecimento de neurônios serotoninérgicos ocorre entre o 10^o a 12^o dia de vida do embrião, com síntese de serotonina detectada um dia após este surgimento e sua maturação completa ocorre ao final do período crítico^{1,15}. Após seu surgimento, os neurônios serotoninérgicos emergem a partir dos núcleos da rafe a fim de modular o desenvolvimento e maturação de circuitos neuronais no Hipotálamo, NTS, Córtex Cerebral^{15,18,19}.

A serotonina apresenta característica hidrofílica e não ultrapassa a barreira hemato-encefálica (BHE), para que atue no SNC é necessário que sua síntese ocorra no mesmo, a partir do aminoácido essencial triptofano. Este aminoácido deve ser adquirido através do alimento na dieta, pois não é sintetizado pelo organismo²⁰. A síntese de serotonina central ocorre principalmente em neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe. Uma vez digerido, triptofano apresenta-se numa forma livre ou ligado a albumina no plasma. Após sua entrada no neurônio, o triptofano é hidrolisado a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima TPH-2, presente no sistema nervoso central¹⁶. Em seguida, o 5-HTP é descarboxilado pela enzima l-aminoácido aromático descarboxilase para formar serotonina.

Após sua síntese nos neurônios da rafe, a serotonina é armazenada em vesículas presentes nos neurônios pré-sinápticos. Quando livre na fenda sináptica, a 5-HT pode atuar em seus receptores, entretanto, após esta interação, sua ação é encerrada. Uma das vias de degradação da serotonina é realizada por ação das enzimas monoamino oxidase A e B. Sua ação gera o ácido 5-hidroxiindolacético²¹. Um segundo mecanismo de degradação da serotonina se dá através de sua recaptação pelo seu transportador, localizado na membrana pré-sináptica²². O SERT é o principal responsável pela regulação dos níveis de 5-HT na fenda sináptica. Esta proteína de membrana plasmática tem a função de recaptar a 5-HT, não degradada pela MAO na fenda sináptica, de volta ao interior dos neurônios pré-sinápticos²². A remoção ativa reduz os níveis de neurotransmissor na fenda sináptica mais rapidamente, restringe os efeitos da liberação da 5-HT para áreas menores e permite que pelo menos uma parte da liberação química possa ser reciclada para o uso posterior²². O SERT apresenta uma mudança em sua conformação e move uma ou mais moléculas de serotonina por ciclo, ao contrário de canais, que ficam abertos ou fechados, isto permite a saída de moléculas através da membrana bicamada.

Os níveis de serotonina durante o desenvolvimento do sistema nervoso são precisamente regulados, sendo detectada precocemente uma intensa imunorreatividade serotoninérgica¹. Na gestação, a placenta demonstra a habilidade de sintetizar e transportar serotonina a partir de um complexo sistema de conversão do triptofano materno, aminoácido precursor da serotonina, em serotonina liberando-a na circulação fetal²³. Um possível mecanismo pode prevenir a hiperinervação de neurônios serotoninérgicos ocorre através do aumento pré-natal na disponibilidade de triptofano, este aumento retarda o desenvolvimento de axônios serotoninérgicos e reduz a síntese de 5-HT²⁴. A inervação serotoninérgica passa por fases de hiperinervação ou expressão temporária de alguns receptores serotoninérgicos, os quais podem ser decisivos para a participação da serotonina no desenvolvimento e plasticidade do sistema nervoso central. Em mamíferos, a densidade final e distribuição de terminais serotoninérgicos são moldadas durante a maturação pós-natal do sistema nervoso central¹. O excesso de 5-HT durante a embriogênese em animais SERT Knockout diminui rEVERSIVELMENTE a velocidade de migração radial de neurônios piramidais corticais, afetando a arborização destes circuitos neurais. E o receptor 5-HT₆ expresso em progenitores de neurônios piramidais quando ativados, replicam os efeitos da estimulação serotoninérgica¹⁹. Estes achados suportam a hipótese que a desregulação na homeostase serotoninérgica durante o desenvolvimento pode afetar a formação do circuito neocortical e contribuir para o aumento da vulnerabilidade de desordens psiquiátricas¹⁹. Porém, a inibição do crescimento e inervação de neurônios serotoninérgicos pode ser um importante indutor de anormalidades estruturais e comportamentais.

Os neurônios serotoninérgicos estão amplamente distribuídos no encéfalo de roedores. Suas projeções originam-se a partir dos núcleos da rafe, localizados ao longo da linha média do tronco encefálico, e consistem em numerosos e distintos grupos de neurônios que se organizam emitindo projeções ascendentes e descendentes^{1,25}. Dois grupos de neurônios serotoninérgicos parecem ter um padrão de maturação e migração distintos. O grupo rostral formado pelos núcleos Dorsal (DR), Caudal Linear (CLi), Mediano (MnR) enviam projeções predominantemente rostrais para o tálamo e hipotálamo. Enquanto o grupo caudal formado pelos núcleos Pálido (RPa), Núcleo Obscuro (ROb), Núcleo Magno (RMg) projetam-se mais caudal e ventralmente para inervar a medula espinhal e o cerebelo^{1,25}. Em função de sua

grande distribuição no SNC, a serotonina influencia diversas esferas fisiológicas dos mamíferos, desde a regulação cardiovascular, respiratória, gastrointestinal, sensibilidade a dor e termogênese, além da manutenção do apetite, ritmo circadiano, comportamento alimentar e sexual, humor, locomoção, sono, aprendizado e memória²⁶.

O desenvolvimento das propriedades serotoninérgicas dos neurônios da rafe, como síntese, recaptação, e armazenamento de serotonina, dependem de um sistema de feedback positivo, por meio da presença de pequenas quantidades de 5-HT, a fim de iniciar sua própria síntese e estimular o desenvolvimento destas propriedades mesmo em neurônios que normalmente não produzem 5-HT²⁷. Este mecanismo pode ser responsável pelo rápido desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos e pela presença transitória da 5-HT em alguns neurônios durante o desenvolvimento¹⁵. A síntese da 5-HT, a partir do triptofano, é aumentada em resposta à frequência de estimulação elétrica do corpo celular serotoninérgico^{16,22}. Requerimentos a curto prazo para o aumento da síntese de 5-HT podem ocorrer através de alterações nas propriedades cinéticas da TPH, sem necessitar o aumento do conteúdo da própria enzima TPH²⁸. O equilíbrio da neurotransmissão serotoninérgica pode apresentar um aumento em seus processos metabólicos a fim de se adaptar às demandas exigidas pelos estímulos e agressões ambientais.

Serotonina e Ingestão Alimentar

A alimentação pode ser primariamente considerada um comportamento regulatório com a função de suprir a necessidade energética dos tecidos corporais, sendo um processo crítico para a sobrevivência²⁹. O núcleo do trato solitário (NTS) e o hipotálamo são considerados centros para detecção e resposta a sinais de fome e de saciedade. O NTS é a primeira região do SNC a receber informações viscerosensoriais da cavidade oral e de regiões periféricas, principalmente via nervo vago e controla o início e término da ingestão alimentar e o tamanho das refeições²⁹. As informações que chegam a este núcleo são processadas e transmitidas a outras áreas encefálicas como hipotálamo e complexo parabraquial através de conexões diretas ou recíprocas³⁰⁻³². O núcleo parabraquial lateral recebe aferências do NTS que podem estar envolvidas nas respostas viscerosensoriais³². Essas projeções neuronais são uma importante via para a supressão da ingestão alimentar. A estimulação de fibras no Núcleo Parabraquial Lateral promoveu uma redução na

ingestão de alimentos³². Ainda, o NTS repassa tais informações viscerais para centros de controle homeostático do hipotálamo e recebe projeções descendentes do hipotálamo lateral e núcleo paraventricular (PVN)^{30,31}. Os núcleos arqueado, ventromedial, dorsomedial, paraventricular e a área do hipotálamo lateral estão associados à regulação do balanço energético¹⁸. O hipotálamo recebe aferências vagais provindas do trato gastrointestinal, pâncreas, fígado e tecido adiposo e integra com informações centrais de fome e saciedade¹⁸.

A serotonina está intimamente relacionada à ingestão alimentar, e parece ter uma relação inversa com o consumo energético, pois promove redução da ingestão alimentar por estimular a saciedade em ratos³³. No hipotálamo, a elevação dos níveis de serotonina promove a saciedade e sua redução estimula a ingestão³³. Os neurônios serotoninérgicos, a partir dos núcleos da rafe, enviam projeções para o hipotálamo a fim de controlar aspectos da ingestão alimentar como a seleção de macronutrientes e o tamanho da refeição, e o balanço energético na manutenção do peso corporal^{18,33}. O NTS e o hipotálamo exibem populações neuronais que expressam Neuropeptídeo Y (NPY), Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina (CART), Proteína Relacionada ao Agouti (AgRP) e Proopiomelanocortina (POMC). Os neurônios POMC do NTS são ativados por aferências vagais e sinais saciogênicos que contribuem para limitar a ingestão³². A estimulação de neurônios AgRP e NPY favorece a ingestão alimentar e reduz o gasto energético, enquanto que a estimulação dos neurônios POMC e CART sinaliza para redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético¹⁸. Estas respostas podem ser mediadas por receptores serotoninérgicos³⁴. Divididos em sete classes (5HT₁ a 5HT₇) e 14 subtipos²⁸, os receptores 5-HT_{1A}³⁵, 5-HT_{1B}³⁴ e 5-HT_{2C}³⁴ apresentam ação serotoninérgica sobre a ingestão alimentar. A aplicação central de 8-OH-DPAT, agonista do 5-HT_{1A}, induziu hiperfagia³⁵. Os receptores 5HT_{1B} expressos em neurônios serotoninérgicos atuam como autoreceptores inibindo a adenilato ciclase, hiperpolarizando o neurônio e diminuindo a liberação de serotonina³⁴. Os receptores 5HT_{2C} parecem modular o tamanho da refeição e duração do comportamento de alimentação³³. No núcleo arqueado do hipotálamo, 5-HT hiperpolariza e inibe os neurônios AgRP, promovendo redução na inibição das células POMC através dos receptores 5-HT_{1B}. Ao mesmo tempo, esta monoamina age sobre os receptores 5-HT_{2C} promovendo ativação dos neurônios POMC, modulando reciprocamente a

ingestão alimentar através dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}³⁴. O ritmo de atividade serotoninérgica, em relação ao comportamento alimentar, possui relação com a transição do ciclo de luz dia e noite, como refletido por mudanças temporais em resposta a estimulação do receptor 5-HT_{1B} no hipotálamo medial e na liberação e utilização da 5-HT endógena. Uma maior atividade serotoninérgica inicia no começo da ativação do período de alimentação, justamente na transição do ciclo claro e escuro de luz³⁶. No início do ciclo escuro, o período ativo para alimentação livre dos roedores, a estimulação serotoninérgica é mais efetiva em suprimir a ingestão alimentar e em particular, a ingestão de carboidratos³⁶. Genes responsáveis pela regulação da ação serotoninérgica, como o gene *SLC6A14*, que codifica transportadores de aminoácidos dependentes de sódio e cloreto, e o gene *5-HTR2C*, que codifica o receptor 5-HT_{2C}, podem ser determinantes ao controle da ingestão alimentar e estado nutricional de crianças. O gene *SLC6A14* regula a disponibilidade de triptofano para a síntese de serotonina. Crianças de 7 e 8 anos de idade com polimorfismos *SLC6A14* (rs2312054) e *SLC6A14* (rs12391221) analisados em leucócitos apresentam maior ingestão alimentar⁴. Este achado pode indicar uma possível associação destes polimorfismos ao desenvolvimento de obesidade em adultos.

A interação entre a nutrição no período crítico do desenvolvimento, a ação da serotonina e repercussões na vida adulta tem sido documentada por diversos pesquisadores^{2,9,37,38,39,40}. A desnutrição perinatal representa um dos fatores ambientais responsáveis por alterações estruturais e funcionais no desenvolvimento do sistema nervoso central, como redução do número e forma dos neurônios, quantidade de neurotransmissores^{2,41}. Em especial, o sistema serotoninérgico apresenta grande sensibilidade às influências provindas da desnutrição perinatal². Observa-se o aumento dos níveis encefálicos de serotonina no período pós-natal e na idade adulta de animais submetidos à desnutrição protéica perinatal. Estas alterações podem estar relacionadas ao aumento na concentração de triptofano encefálico e na atividade da 5-triptofano-hidroxilase, afirmando a necessidade de um controle refinado na disponibilidade de 5-HT encefálica durante o período crítico do desenvolvimento². Estas modificações podem ocorrer em consequência às mudanças na resposta da neurotransmissão da serotonina.

A desnutrição protéica perinatal parece promover uma redução na evolução ponderal e ingestão alimentar em ratos^{37,38,39,40}. Os animais apresentam menor ganho de peso corporal ao longo do crescimento, além de um menor peso corporal na idade adulta. Apesar deste menor peso corporal, a desnutrição protéica perinatal promove aumento na ingestão alimentar dos animais^{37,38}. No período neonatal, a desnutrição protéica reduziu a eficiência mastigatória, diminuindo, enfraquecendo e retardando a maturação de músculos mastigatórios e o circuito neuronal associado³⁹. Uma alteração funcional associada à desnutrição neonatal e a ingestão de alimentos parece estimular uma resistência aos efeitos inibitórios do triptofano sobre a ingestão alimentar na idade adulta⁴⁰. Esta resistência aos efeitos inibitórios da serotonina também foi observada em animais desnutridos na gestação e lactação, quando submetidos a uma aplicação aguda de fenfluramina³⁷. A ação da 5-HT sobre o controle da ingestão parece falhar com a redução do aporte protéico durante o período crítico de desenvolvimento.

A compreensão da regulação da expressão de genes, como mecanismo de indução de diferentes fenótipos proporcionados pela nutrição materna durante o período crítico, permite uma maior compreensão da relação da serotonina com o controle da ingestão alimentar. A ausência do mecanismo de recaptação de serotonina, em animais SERT *knockout*, promove aumento nas concentrações extracelulares de serotonina⁴². Apesar da característica hipofágica da 5-HT, estes animais apresentam um fenótipo obeso em idade adulta⁴³. O mecanismo pelo qual este fenótipo obeso se apresenta nestes animais ainda não foi totalmente compreendido. Estes roedores obesos não apresentaram hiperfagia, porém demonstram um comportamento exploratório alterado, são hipoativos e demonstram reduzida atividade locomotora na gaiola⁴³. Este fenótipo obeso pode ser revertido em animais SERT *upregulation*, demonstrando uma possível consequência da diminuição dos níveis extracelulares de serotonina encefálica através da maior expressão do SERT. Este animal apresenta peso corporal reduzido e não possui alteração na ingestão alimentar^{44,45}.

Alguns fármacos como a fenfluramina, podem aumentar as concentrações de 5-HT por um mecanismo estimulatório da liberação vesicular e inibição de sua recaptação, promovendo hipofagia, redução do tamanho da refeição e aumento nos intervalos entre as refeições em roedores³⁷. A fenfluramina tem como função

suprimir a ingestão de alimentos e facilitar a perda de peso corporal por aumentar a taxa metabólica³⁷. A manipulação farmacológica ou genética através da inibição do SERT também apresenta evidências sobre a inibição da ingestão alimentar. Estudos com o aumento induzido de serotonina com Inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) demonstraram redução na ingestão alimentar. A fluoxetina promove aumento de serotonina no hipotálamo e amplia sua ação hipofágica³³.

A exposição à ISRS durante a lactação induz redução no peso corporal e na ingestão alimentar^{46,3}. O uso de citalopram na lactação promoveu a redução do crescimento corporal e retardo na maturação de características físicas em roedores⁴⁷. A exposição à fluoxetina promoveu redução de 22% do peso corporal aos 21 dias de vida⁴⁶. O fenótipo de baixo peso corporal permaneceu até a idade adulta dos animais expostos à fluoxetina neonatal³. A fluoxetina aumenta a serotonina estimulando a saciedade, redução da ingestão alimentar e do peso corporal em roedores³³. No hipotálamo, o desenvolvimento das vias regulatórias do apetite ocorrem predominantemente após o nascimento⁴⁸. Estas evidências indicam que o período pós-natal tem importância para a programação da ingestão alimentar em roedores.

As respostas fisiológicas apresentam uma resistência quando são requisitadas em estímulos ou estresses agudos, demonstrando que estes organismos desenvolvem adaptações de acordo com as manipulações sofridas nos períodos de desenvolvimento ou períodos críticos que não são capazes que solucionar a depender das demandas de um novo ambiente. O desenvolvimento de ansiedade, obesidade e outras patologias parecem estar associadas à necessidade do organismo responder a um estresse ou estímulo que requer uma maior atuação dos sistemas de controle do organismo, como o sistema serotoninérgico. Estes achados demonstram a importância da serotonina perinatal ao desenvolvimento de componentes moleculares e morfológicos do controle da ingestão alimentar, e sua função determinante para a compreensão das possíveis influências ambientais causadoras de patologias na vida adulta.

Referências

1. Lidov H, Molliver M. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: Ascending pathways and terminal fields. *Brain Res Bull.* 1982;8(4):389-430. [http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90077-6](http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230(82)90077-6)
2. Manjarrez G, Chagoya G, Hernández R J. Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. *Int J Dev Neurosci.* 1994;12(8): 695-702. [http://dx.doi.org/10.1016/0736-5748\(94\)90049-3](http://dx.doi.org/10.1016/0736-5748(94)90049-3)
3. Galindo LCM, Barros MLD, Pinheiro IL, Santana RVC, Matos RJB, Leandro CG et al. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. *Int J Dev Neurosci.* 2015; 46:76-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.07.004>
4. Miranda R, Vetter S, Genro J, Campagnolo P, Mattevi V, Vitolo M et al. SLC6A14 and 5-HT2C polymorphisms are associated with food intake and nutritional status in children. *Clin Biochem.* 2015;48(18):1277-1282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.07.003>
5. Wells J. Adaptive variability in the duration of critical windows of plasticity: Implications for the programming of obesity. *Evol Med Public Health.* 2014;2014(1):109-121. <http://dx.doi.org/10.1093/emph/eou019>
6. Ravelli G, Stein Z, Susser M. Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. *N Engl J Med.* 1976;295(7):349-353. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM197608122950701>
7. Neel JV. Diabetes Mellitus: A “Thrifty” Genotype Rendered Detrimental by “Progress”? *Am J Hum Genet.* 1962;14(4):353-362.
8. Dobbing J. Undernutrition and the Developing Brain: The relevance of animal models to the human problem. *Am J Dis Child.* 1970;120(5):411.
9. Morgane P, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R et al. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev.* 1978;2(3):137-230. [http://dx.doi.org/10.1016/0149-7634\(78\)90059-3](http://dx.doi.org/10.1016/0149-7634(78)90059-3)
10. Hales C. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 2001;60(1):5-20. <https://doi.org/10.1093/bmb/60.1.5>
11. Gluckman P, Hanson M, Low F. The role of developmental plasticity and epigenetics in human health. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2011;93(1):12-18. <http://dx.doi.org/10.1002/bdrc.20198>
12. Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reprod Toxicol.* 2011;31:337-343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.10.012>
13. Whitaker-Azmitia PM, Druse M, Walker P, Lauder JM. Serotonin as a developmental signal. *Behav Brain Res.* 1996;(73):19–29.
14. Sundstrom E, Kolare S, Souverbie F, Samuelsson EB, Pschera H, Lunell NO, et al. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Brain research. Dev Brain Res.* 1993; (75): 1–12

15. Gaspar, P, Cases, O, Maroteaux, I. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(12):1002-1012. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1256>
16. Walther D, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, et al. Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. *Science.* 2003;299(5603):76-76. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1078197>
17. Chugani DC, Muzik O, Behen M, Rothermel R, Janisse JJ, Lee J, et al. Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Ann Neurol.* 1999;45(3):287-295.
18. Morton G, Cummings D, Baskin D, Barsh G, Schwartz M. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature.* 2006;443(7109):289-295. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05026>
19. Riccio O, Jacobshagen M, Golding B, Vutskits L, Jabaudon D, Hornung et al. Excess of serotonin affects neocortical pyramidal neuron migration. *Transl Psychiatry.* 2011;1(10):e47-. <http://doi.org/10.1038/tp.2011.49>
20. Azmitia EC. Evolution of serotonin: sunlight to suicide. In: Muller, C.P., Jacobs, B.L. (Eds.), *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin.* 2010; Academic Press, pp. 3–22.
21. Sablin S, Yankovskaya V, Bernard S, Cronin C, Singer T. Isolation and characterization of an evolutionary precursor of human monoamine oxidases A and B. *Eur J Biochem.* 1998;253(1):270-279.
22. Sghendo L, Mifsud J. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. *J Pharm Pharmacol.* 2012; 64(3):317-325. <http://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01384.x>
23. Bonnin A, Levitt P. Fetal, Maternal and Placental Sources of Serotonin and New Implications for Developmental Programming of the Brain. *Neuroscience.* 2011;197:1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.005>
24. Huether G, Thornke F, Adler L. Administration of tryptophan-enriched diets to pregnant rats retards the development of the serotonergic system in their offspring. *Dev Brain Res.* 1992;68(2): 175-181.
25. Wallace JA, Lauder JM. Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res Bull.* 1983;10(4):459-479.
26. Sodhi MS, Sanders-Bush E. Serotonin and brain development. *Int Rev Neurobiol.* 2004; (59):111-174. [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742\(04\)59006-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742(04)59006-2)
27. De Vitry F, Hamon M, Catelon J, Dubois M, & Thibault J. Serotonin initiates and auto-amplifies its own synthesis during mouse central nervous system development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;(83): 8629–8633.
28. Hensler JG. Serotonin. In: Siegel GJ, R. WA, Scott B, Price DD (Hrsg.): *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.* San Diego: Academic Press; 2006; 227-248.
29. Schwartz GJ. Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006; 361(1471): 1275-1280. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2006.1862>

30. Jiang C, Fogel R, Zhang X. Lateral hypothalamus modulates gut-sensitive neurons in the dorsal vagal complex. *Brain Res.* 2003; 980(1): 31-47. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02844-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02844-0)
31. Zhang X, Cui J, Tan Z, Jiang C, Fogel R. The central nucleus of the amygdala modulates gut-related neurons in the dorsal vagal complex in rats. *J Physiol.* 2003; 553(Pt 3): 1005-1018. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.045906>
32. Rinaman L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Res.* 2010; 1350: 18-34. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.059>
33. Halford JC, Harrold JA, Lawton CL, Blundell JE. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets.* 2005;6(2):201-213. <http://doi.org/10.2174/1389450053174550>
34. Heisler L, Jobst E, Sutton G, Zhou L, Borok E, Thornton-Jones Z et al. Serotonin Reciprocally Regulates Melanocortin Neurons to Modulate Food Intake. *Neuron.* 2006;51(2):239-249. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.004>
35. Bendotti C, Samanin R. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons. *Eur J Pharmacol.* 1986;121(1): 147-150.
36. Weiss GF, Rogacki N, Fueg A, Buchen D, Leibowitz SF. Impact of hypothalamic d-norfenfluramine and peripheral d-fenfluramine injection on macronutrient intake in the rat. *Brain Res Bull.* 1990; 25(6):849-859.
37. Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur. J. Neurosci.* 2008;27(6):1400-1408. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06105.x>
38. Lira L, Almeida L, da Silva A, Cavalcante T, de Melo D, de Souza J et al. Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. *Int J Dev Neurosci.* 2014;38:23-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.07.007>
39. Ferraz-Pereira K, da Silva Aragão R, Verdier D, Toscano A, Lacerda D, Manhães-de-Castro R et al. Neonatal low-protein diet reduces the masticatory efficiency in rats. *Br J Nutr.* 2015;114(09):1515-1530.
40. Carvalho-Santos J, Queirós-Santos A, Morais GL, Santana LH, Brito MG, Araújo RCS et al. Efeito do tratamento com triptofano sobre parâmetros do comportamento alimentar em ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal. *Rev. Nutr.* 2010; 23(4): 503-511. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732010000400001>
41. Resnick O, Miller M, Forbes W, Hall R, Kemper T, Bronzino J et al. Developmental protein malnutrition: Influences on the central nervous system of the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 1979;3(4):233-246.
42. Mathews T, Fedele D, Coppelli F, Avila A, Murphy D, Andrews A. Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with

- reduced serotonin transporter expression. *J Neurosci Methods*. 2004;140(1-2):169-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.05.017>
43. Holmes A, Murphy DL, Crawley JN. Evaluation of Antidepressant-related Behavioral Responses in Mice Lacking the Serotonin Transporter. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27(6):914-923. [http://dx.doi.org/10.1016/S0893-133X\(02\)00374-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0893-133X(02)00374-3)
44. Jennings K. Increased Expression of the 5-HT Transporter Confers a Low-Anxiety Phenotype Linked to Decreased 5-HT Transmission. *J Neurosci*. 2006;26(35):8955-8964. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5356-05.2006>
45. Pringle A, Jennings K, Line S, Bannerman D, Higgs S, Sharp T. Mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter show no alterations in feeding behaviour and increased non-feeding responses to fenfluramine. *Psychopharmacology*. 2008;200(2):291-300. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-008-1206-8>
46. Silva CM, Gonçalves L, Manhaes-de-Castro R, Nogueira MI. Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. *Neurosci Lett*. 2010; 483(3):179-183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.003>
47. Deiró T, Manhães-de-Castro R, Cabral-Filho J, Souza S, Freitas-Silva S, Ferreira L et al. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(10). <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2004001000009>
48. Grove KL, Smith MS. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav*. 2003; 79(1):47-63. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00104-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00104-5)

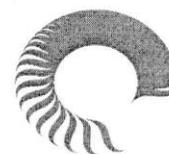
ANEXOS

ANEXO A: Aprovação do estudo em comitê de ética.

ANEXO A: COMITÊ DE ÉTICA

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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



Recife, 14 de agosto de 2012.

Ofício nº 466/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª. Sandra Lopes de Souza**
Departamento de Anatomia – CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.008725/2012-18

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Fases do desenvolvimento de componentes do sistema serotoninérgico em ratos Wistar submetidos à desnutrição ou inibição do transportador de serotonina durante a lactação”**.

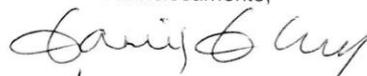
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals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

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

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

<p>Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição - UFPE; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: machos; Idade: neonatos (1º ao 21º dia); Peso: 6-8 gramas; Número de animais previsto no protocolo: 160</p>

Atenciosamente,


 P/  Prof.ª Maria Tereza Lencina
 Presidente do CEEA