



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em
Neuropsiquiatria e Ciências do
Comportamento**



**EXPOSIÇÃO NEONATAL A INIBIDOR DE RECAPTAÇÃO DA
SEROTONINA: ANÁLISE DE COMPONENTES DO SISTEMA
SEROTONINÉRGICO**

DIOGO D'PAULA CUNHA BRASILEIRO DE MELO

RECIFE/2014

DIOGO D'PAULA CUNHA BRASILEIRO DE MELO

**EXPOSIÇÃO NEONATAL A INIBIDOR DE RECAPTAÇÃO DA
SEROTONINA: ANÁLISE DE COMPONENTES DO SISTEMA
SEROTONINÉRGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

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

RECIFE/2014

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Liliane Campos Gonzaga de Noronha, CRB4-1702

M528e Melo, Diogo D'Paula Cunha Brasileiro de
Exposição neonatal a inibidor de recaptação da serotonina :
análise de componentes do sistema serotoninérgico / Diogo
D'Paula Cunha Brasileiro de Melo. – Recife, 2014.
73 f. : il., tab. ; 30 cm

Orientador: Sandra Lopes de Souza
Dissertação (mestrado) – UFPE. Centro de Ciências da
Saúde. Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e
Ciências do Comportamento. Recife, 2014.
Inclui referências.

1. Neuropsiquiatria. 2. Serotonina. 3. Rato - Neonatal.
4. Fluoxetina. I. Souza, Sandra Lopes de (Orientador). II. Título

616.8

CDD (22.ed.)

UFPE (BC2017/004)

**EXPOSIÇÃO NEONATAL A INIBIDOR DE RECAPTAÇÃO DA
SEROTONINA: ANÁLISE DE COMPONENTES DO SISTEMA
SEROTONINÉRGICO**

DIOGO D'PAULA CUNHA BRASILEIRO DE MELO

ORIENTADOR:

Profº Dra. Sandra Lopes de Souza
(Docente UFPE)

EXAMINADORES:

Profª. Dra. Sandra Lopes de Souza
(Docente UFPE)

Profº Dra. Matilde Cesiana da Silva
(Docente UFPE)

Profº Dra. Elizabeth do Nascimento
(Docente UFPE)

Profº Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas (Suplente)
(Docente UFPE)

APROVADO EM, 28 de fevereiro de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação as peças fundamentais ao meu sucesso: meus queridos pais Albérico e Valdete e a minha bela e adorada esposa Paula por me apoiarem em todos os momentos da minha vida. Vocês são muito importantes para mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a capacidade de refletir sobre a essência da vida, me proporcionando momentos de imenso aprendizado. Embora, os obstáculos apareçam confio em um Deus que sempre me ajuda a vencê-las e me surpreende de forma singular com seu amor, cuidado e paciência. Agradeço-te, meu Deus por esse amor incondicional e por tudo que sou, pois tu és a minha fonte de Paz e a força que existe dentro de mim. Meu coração e a minha vida consagram a ti.

Aos meus pais, Valdete e Albérico por me apoiarem exaustivamente, sempre fazendo o seu melhor para me proporcionar uma educação de qualidade, incentivando-me a descobrir novos caminhos. O que sou hoje agradeço a vossas determinações para me ensinar a importância do respeito ao próximo. Por me mostrarem que a vida tem sempre um lado bom, embora o mundo mostre o contrário. Sei que nunca existirão palavras para descrever o quanto vocês são importantes para mim. Amo muito vocês!

A minha esposa querida, Paula pela compreensão e dedicação, sempre me inspirando a ser uma pessoa melhor, mais atenciosa e mais feliz. Você foi/é um presente de Deus em minha vida. Inspiração para a reconstrução do meu Eu. Amo-te minha princesa!

Ao laboratório de anatomia do centro acadêmico de vitória-UFPE, especialmente, a professora Carolina Peixoto Magalhães pela contribuição e atenção dada nos meus primeiros passos na universidade, fazendo-me o professor que sou hoje.

A minha orientadora, professora Sandra Lopes de Souza, pela paciência e confiança, como também pela grande contribuição na minha formação acadêmica. Sou grato pelos ensinamentos sobre a pesquisa, sobre a neurociência e acima de tudo sobre o valor da humildade. A sua entrega, preocupação e comprometimento em fazer uma “ciência de verdade” são admiráveis. Que Deus continue lhe abençoando e capacitando-a, pois, a sabedoria é um presente que poucos recebem.

A minha Co-orientadora, Manuela Figueiroa Lyra de Freitas, pela amizade e confiança. A senhora é uma mulher admirável pela sua inteligência, mas acima de tudo pelo seu humanismo. Obrigado por me acompanhar ao longo da minha formação

acadêmica. A senhora é peça fundamental da minha formação em anatomia e na pesquisa.

A todas as minhas amigas, Livia Almeida, Larissa Almeida, Renata Campina, Matilde Cesiana, Taisy Ferro, Tássia Borba, Juliet Souza, do laboratório de Neuroplasticidade e Comportamento que contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigado pela excelente acolhida em suas vidas, e pela paciência em ensinar-me a rotina do laboratório. Vocês, lideradas pela professora Sandra me mostraram que na vida profissional podemos sim ser uma família. A união do nosso grupo de pesquisa é o alicerce dessa vitória! Obrigado por tornarem os dias de trabalho mais alegres e prazerosos.

Ao programa de pós-graduação em neuropsiquiatria e ciências do comportamento pela oportunidade de enriquecimento da minha aprendizagem. E também a minha turma do mestrado 2012 pelo aprendizado, apoio, companheirismo e diversão.

A Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade e satisfação de compor uma equipe tão comprometida com o desenvolvimento e aperfeiçoamento de uma ciência responsável, inovadora e ética.

A CAPES e a FACEPE pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para minha formação.

*“Talvez não tenha conseguido
fazer o melhor, mas lutei para que o
melhor fosse feito. Não sou o que
deveria ser, mas Graças a Deus, não
sou o que era antes”.*

(Martin Luther King)

RESUMO

MELO, DDCB. **Exposição neonatal a inibidor de recaptação da serotonina: análise de componentes do sistema serotoninérgico.** Dissertação (Mestrado em Neurociências), Programa de pós-graduação em neuropsiquiatria e ciências do comportamento, UFPE, Pernambuco, 2014.

Este estudo avaliou o efeito da inibição seletiva da recaptação de serotonina durante o período neonatal sobre parâmetros morfofuncionais do sistema serotoninérgico nos núcleos da rafe e nas áreas encefálicas de projeção serotoninérgica. Ratos Wistar foram divididos nos grupos Fluoxetina (Flx, Fluoxetina 10mg/Kg p.c.) e Salina (S, NaCl 0,9%, 1mL/Kg p.c.) segundo a manipulação farmacológica diária do 1^o ao 21^o dia de vida. Durante este período foram avaliadas a quantidade de neurônios de 5-HT e a dosagem desse neurotransmissor e do seu metabólito. Os encéfalos foram processados com técnicas de imunohistoquímica contra 5-HT e submetidos à dosagem de serotonina e ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) no 28^o dia de vida. Não houve diferença no número de neurônios 5-HT-IR nos núcleos da rafe entre os grupos. O núcleo DR de animais do grupo Flx ($1153,5 \pm 125,4$; $p < 0.01$) apresentou maior concentração de 5-HT quando comparados ao grupo S ($819,9 \pm 148,3$; $p < 0.01$). O grupo FLx apresentou também, maior concentração de 5-HIAA no CLi/RLi (Flx= $17569 \pm 316,3$ vs S= $931,1 \pm 98,6$; $p < 0.01$), DR (Flx= $3303,4 \pm 156,7$ vs S= $1748,3 \pm 148,3$; $p < 0.001$) e MnR (Flx= $2454,1 \pm 236$ vs S= $1561 \pm 158,9$; $p < 0.01$). Nas áreas de projeção o grupo Flx apresentou menor concentração de 5-HT no hipotálamo (Flx= $295,9 \pm 40,3$ vs S= $478,5 \pm 71,8$; $p < 0.01$) e maior concentração de 5-HIAA na amígdala (Flx= $1636,3 \pm 103,7$ vs S= $890,8 \pm 41,6$, $p < 0.05$) e no hipotálamo (Flx= $2031,3 \pm 316,1$ vs S= $1262,4 \pm 237,7$; $p < 0.05$) quando comparado ao grupo S. Os resultados deste estudo evidenciam que a exposição crônica a fluoxetina durante o período de lactação promove ajustes de componentes do sistema serotoninérgico, sugerindo que tal exposição precoce pode causar alterações no padrão saúde-doença.

Palavras chaves: desenvolvimento, serotonina, fluoxetina, rato neonato.

ABSTRACT

MELO,DDCB. **Neonatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitor: analysis of serotonergic system component.** Dissertation (Master's degree in neuroscience), Programa de pós-graduação em neuropsiquiatria e ciências do comportamento, UFPE, Pernambuco, 2014.

This study evaluated the effect of selective inhibition of serotonin reuptake during the neonatal period on morphofunctional parameters of the serotonergic system in the raphe nuclei and the brain areas of serotonergic projections. *Wistar* rats were divided in Fluoxetine (Flx, Fluoxetina 10mg/Kg p.c.) and Saline groups (S, NaCl 0,9%, 1mL/Kg p.c.) in accordance to daily pharmacological manipulation during 1^o to 21^o days of life. During this period the number of neurons in 5ht and dosage of dopamine were evaluated and its metabolite. The brains were processed by immunohistochemistry technique against 5-HT and submitted to serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA) dosage at 28^o days of life. There was no difference in the number of neurons in the raphe nuclei between groups. The DR nucleus of animals Flx (1153.5 ± 125.4 , $p < 0.01$) showed higher concentration of 5-HT compared to S group (819.9 ± 148.3 , $p < 0.01$). FLX group also showed, higher concentration of 5-HIAA in the CLi/RLi (Flx= $17569 \pm 316,3$ vs S= $931,1 \pm 98,6$; $p < 0.01$), DR (Flx= $3303,4 \pm 156,7$ vs S= $1748,3 \pm 148,3$; $p < 0.001$) e MnR (Flx= $2454,1 \pm 236$ vs S= $1561 \pm 158,9$; $p < 0.01$). In the projection areas FLX group showed lower concentration of 5-HT in the hypothalamus (Flx= $295,9 \pm 40,3$ vs S= $478,5 \pm 71,8$; $p < 0.01$) and higher concentration of 5-HIAA in the amigdala (Flx= $1636,3 \pm 103,7$ vs S= $890,8 \pm 41,6$, $p < 0.05$) and hypothalamus (Flx= $2031,3 \pm 316,1$ vs S= $1262,4 \pm 237,7$; $p < 0.05$) compared to S group. The results of this study show that chronic exposure to fluoxetine during lactation period promotes adjustments in the serotonergic system component, suggesting that this early exposure may cause changes in the patterns of health and disease

Key-Words: development, serotonin, fluoxetine, neonate rat

LISTA DE FIGURA

Figuras da revisão de literatura

Figura 1. Esquema do metabolismo do triptofano no SNC. Figura retirada de RUDDICK, 2006.

Figura 2. Visão esquemática da síntese de 5-HT no neurônio serotoninérgico. Figura retirada de RUDDICK, 2006.

Figura 3. Receptores serotoninérgicos e suas respectivas ações intracelulares. Retirada de LAM & HESLER, 2007.

Figura 4. Sistema serotoninérgico de roedores organizados em grupos B1-B9. Retirada de LESCH & WAIDER, 2012.

Figura 5. Ação da serotonina sobre o controle homeostático da ingestão alimentar. Retirada de HEISLER, JOBST *et al.*, 2006.

Figura 6. Relação entre o controle homeostático e não-homeostático do balanço energético.

Figuras do artigo

Figura 1- Efeito do tratamento crônico neonatal com fluoxetina sobre o número de neurônios 5-HT-IR nos núcleos da rafe de ratos.

Figura 2- Efeito do tratamento crônico neonatal com fluoxetina sobre os níveis de 5-HT (A) e 5-HIAA (B) nos núcleos da rafe de ratos.

Figura 3- Efeito do tratamento crônico neonatal com fluoxetina sobre os níveis de 5-HT (A) e 5-HIAA (B) nas áreas de projeção do encéfalo de ratos.

Figura 4. Efeito do tratamento crônico neonatal com fluoxetina sobre a taxa de atividade de serotonina (5-HIAA/5-HT) nos núcleos da rafe e nas áreas de projeção do encéfalo de ratos.

LISTA DE ABREVIações

Conforme terminologia anatômica, SBA, 2001

Arc – Núcleo arqueado

Aq – Aqueduto cerebral

CLi – Núcleo caudal Linear

DAB – 3,3 - Diaminobenzidina

DBR – Dieta básica Regional

DR – Núcleo Dorsal da rafe

KPBS – Tampão fosfato potássio

DMH – Hipotálamo dorsomedial

LH – Hipotálamo lateral

NPY – Neuropeptídeo Y

PVN- Núcleo paraventricular do hipotálamo

PnO – Núcleo pontino oral

PnR – Núcleo Pontino da rafe

POMC- Pró- ópiomelanocortina

RMg- Núcleo magno da rafe

Rob- Núcleo obscuro da rafe

RPa – Núcleo Pálido da rafe

5-HT – 5- hidroxitriptamina

5-HT-IR – 5-HT imunoreativo

5HIAA/5-HT- atividade de serotonina

Grupos experimentais:

Flx – Fluoxetina

S- Salina

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Revisão de literatura	16
2.1 Sistema serotoninérgico	16
2.2 Núcleos da rafe	22
2.3 Exposição a inibidores seletivos de recaptação de serotonina durante o desenvolvimento	25
3. Hipótese	29
4. Objetivos	30
5. Material e Método	31
5.1 Animais	31
5.2 Obtenção dos grupos experimentais	31
5.3 Experimentos	33
5.3.1 Perfusão transcardíaca	33
5.3.2 Imunohistoquímica contra Serotonina	34
5.3.3 Análise quantitativa de neurônios 5-HT-IR	35
5.3.4 Dosagem de 5-HT e 5-HIAA	35
6. Análise estatística	37
7. Resultados e Discussão	38
Artigo: Exposição neonatal a inibidor de recaptação da serotonina: análise de componentes do sistema serotoninérgico	39
8. Considerações Finais	61
9. Referência	62

1. INTRODUÇÃO

Os organismos apresentam a capacidade de reagir aos desafios do ambiente alterando a sua forma, estado, movimento ou padrão de atividade, sendo esse fenômeno conhecido como plasticidade fenotípica (West-Eberhard, 1989). Dessa forma, estímulos ambientais durante os períodos de gestação e lactação exercem efeitos profundos sobre o processo de desenvolvimento do sistema nervoso central (Kippin, Szumlinski et al., 2008; Silveira, AK Portella et al., 2008). Essa vulnerabilidade está associada ao intenso processo de diferenciação e maturação sofrido nesse período (McCance and Widdowson, 1974). Esses processos realizam-se com velocidade máxima, provocando um rápido aumento do peso encefálico (Rice and Barone, 2000). Por esse motivo, essa fase é denominada de período de crescimento rápido do encéfalo e é considerada como um dos períodos críticos mais importantes para o desenvolvimento encefálico (Morgane, Mokler et al., 2002).

O ambiente intra-uterino e neonatal tem sido considerados como programadores de variações fenotípicas com consequências de curto e longo prazo (Gluckman and Hanson, 2004; Gluckman, Hanson et al., 2008). Entre os estímulos que induzem a plasticidade fenotípica, a nutrição, às manipulações farmacológicas e o estresse por separação materna merecem destaque. Estes fatores quando incidem nos períodos de gestação e lactação provocam modificações comportamentais e de mecanismos relacionados com o controle da ingestão alimentar (Haupt and Epstein, 1973; Zippel, Heidel et al., 2001; Lopes de Souza, Orozco-Solis et al., 2008). Igualmente, podem influenciar a neurogênese e consequentemente aumentar o risco para alguns transtornos psiquiátricos, como a depressão, ansiedade, esquizofrenia, transtornos de personalidade e uso abusivo de drogas (Barker, 1995; Chocyk, Dudys et al., 2010).

A administração farmacológica durante a gestação e lactação tem sido alvo de estudos, sendo avaliadas várias classes de medicamentos, incluindo antidepressivos, antiasmáticos e anticonvulsivantes. Os efeitos exercidos por antidepressivos nos riscos de malformações congênitas foram analisados pelo

U.S. Food and Drug Administration (FDA), utilizando os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRSs) como modelo (Swanson, Entringer et al., 2009). Estes ISRS aumentam a disponibilidade extracelular de Serotonina (5-HT), interferindo no sistema hipotálamo-Hipófise-Adrenal, na ritmicidade circadiana, importantes no desenvolvimento do feto, bem como a um subtipo de receptores de serotonina (5-HT_{2B}), envolvidos no desenvolvimento do sistema cardiovascular (Kallen and Otterblad Olausson, 2006). Na tentativa de se adaptar a esse ambiente, o feto parece redefinir pontos de ajustes, com o objetivo de maximizar suas chances de sobrevivência (Bellinger, Sculley et al., 2006). Porém, o grau de incompatibilidade entre os ambientes pré e pós-natal é um dos principais determinantes de doenças em longo prazo (Gluckman and Hanson, 2004; Gluckman, Hanson et al., 2008).

Dessa forma, considerando que insumos ambientais durante as “janelas precoces de plasticidade fisiológica” são determinantes para o padrão saúde-doença na vida adulta e que a serotonina está relacionada com o comportamento alimentar torna-se relevante a investigação dos efeitos causados pela manipulação farmacológica em períodos iniciais da vida e suas repercussões sobre o desenvolvimento do sistema serotoninérgico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema serotoninérgico

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor sintetizado em neurônios dos núcleos da rafe, com projeções para várias regiões do sistema nervoso central (Lidov and Molliver, 1982; Wallace and Lauder, 1983; Azmitia and Gannon, 1986; Meister, 2007). Ela foi descoberta por Rapport et al. (Rapport, Green et al., 1948(a); Rapport, Freen et al., 1948(b)) quando investigavam moléculas sanguíneas envolvidas com a hipertensão arterial, isolando uma substância que promovia vasoconstrição denominando-a serotonina. Ela é uma monoamina, pertencente ao grupo das "aminas biogênicas". A maior parte da 5-HT (90%) é encontrada nas células enterocromafins do trato Gastrointestinal. O restante é encontrado em sua maioria nas plaquetas e no sistema nervoso central (2%).

Os primeiros neurônios serotoninérgicos, no rato, aparecem entre o 12^o e o 14^o dias de gestação (Lauder and Bloom, 1974; Lidov and Molliver, 1982b; Wallace and Lauder, 1983; Lautenschlager, Holtje et al., 2000). A maturação desses neurônios 5-HT inicia-se, imediatamente após o término da neurogênese serotoninérgica e continua até a terceira semana pós-natal (Lidov and Molliver, 1982a; Lidov and Molliver, 1982b). Durante este período, os neurônios de 5-HT seguem diferentes vias migratórias para formar os vários núcleos da rafe no mesencéfalo, na ponte e na medula, emitindo projeções axonais originando os grupos de projeção ascendente e descendente de 5-HT, formando conexões sinápticas com os circuitos alvos (Fox and Deneris, 2012). O desenvolvimento dessas projeções serotoninérgicas ocorre em três períodos: período de alongamento axonal (do 13^o ao 16^o dias de gestação); desenvolvimento de vias seletivas (do 15^o ao 19^o dias de gestação) e desenvolvimento do campo terminal (do 19^o dia de gestação ao 21^o dia pós-natal) (Bennett and Giarman, 1965; Wallace and Lauder, 1983; Lautenschlager, Holtje et al., 2000).

Atualmente, fortes evidências têm mostrado que a síntese de serotonina é crucial durante os primeiros estágios do desenvolvimento de mamíferos (Turlejski, 1996; Azmitia and Whitaker-Azmitia, 1997). Nos mamíferos, a 5-HT é o primeiro neurotransmissor a surgir entre todos os sistemas de neurotransmissores monoaminas (Hamon and Bourgoin, 1979; Azmitia, Rubinstein et al., 1995). Recentemente foi descrito a presença dos componentes do sistema serotoninérgico na placenta, sendo esta a responsável pela presença de serotonina no encéfalo do feto antes do desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos (Bonnin, Goeden et al., 2011). O surgimento precoce dos neurônios serotoninérgicos e sua larga distribuição de terminais evidenciam a função essencial desempenhada por esse neurotransmissor no desenvolvimento e crescimento do encéfalo, sinaptogênese e sobrevivência celular (Lauder and Bloom, 1974; Whitaker-Azmitia, 2001; Gaspar, Cases et al., 2003).

A 5-HT é sintetizada a partir do aminoácido precursor triptofano (Trp), adquirido através da dieta. Na periferia, 90 % do triptofano se ligam a albumina plasmática formando o complexo albumina – triptofano (Curzon, Friedel et al., 1973). Para que esse aminoácido entre no SNC é necessário atravessar a barreira hematoencefálica (Figura 1). Para realizar essa passagem, o triptofano se separa da albumina por dois mecanismos: pela interação entre o complexo triptofano- albumina e o glicocálice das células endoteliais da barreira e/ou por uma diminuição na taxa de fluxo sanguíneo (Smith, Momma et al., 1987; Pardridge and Fierer, 1990). O triptofano é transportado através da barreira hematoencefálica por meio do transportador de aminoácidos tipo L (LAT1), competindo com aminoácidos de cadeia ramificada como leucina (Leu), isoleucina (Ile) e valina (Val) (Christensen, Albritton et al., 1994; Matsuo, Tsukada et al., 2000). Quando o triptofano entra no líquido extracelular encefálico torna-se disponível para absorção em todas as células especializadas na síntese de metabolitos neuroativos, incluindo a 5-HT (em neurônios serotoninérgicos e mastócitos), triptamina (possivelmente em neurônios D) e kenureninas (astrócitos, micróglia, macrófagos e células dendríticas) (Ruddick, Evans et al., 2006) (Figura 1).

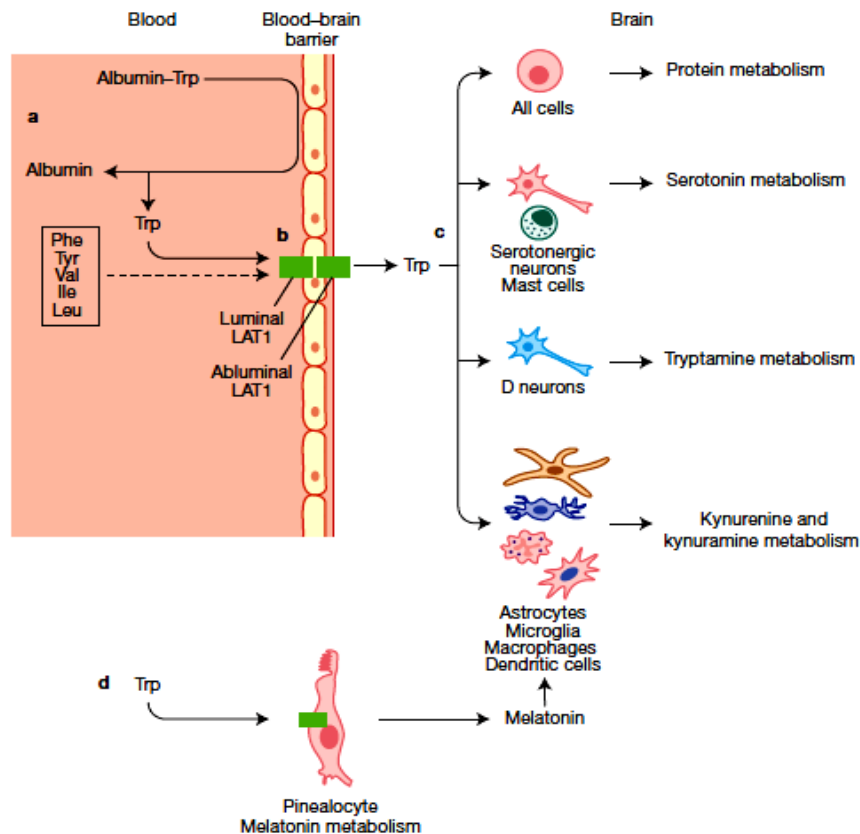


Figura 1. Esquema do metabolismo do triptofano no SNC. *Figura retirada do artigo Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. expert reviews in molecular medicine; Vol. 8; Issue 20; August 2006.*

Quando o triptófano penetra no soma do neurônio serotoninérgico, é imediatamente hidroxilado pela enzima triptofano hidroxilase 2 (Tph2) em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Para essa reação é utilizado o oxigênio molecular (O_2) e o co-fator tetrahidrobiopterina (BH_4) responsável por catalisar a hidroxilação (Ruddick, Evans et al., 2006). O 5-HTP é rapidamente convertido em 5-hidroxitriptamina (Serotonina) através da enzima descarboxilase dos ácidos aromáticos, utilizando como co-fator o piridoxal-5-fosfato (P5P). A serotonina pode ser então: a) metabolizada pela flavoproteína monoamina-oxidase A (localizado na membrana mitocondrial) em 5-hidroxiacetaldeído (5-HIA) e em seguida no seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) através da enzima aldeído desidrogenase. Após ser produzido, o 5-HIAA é excretado da célula por meio de um mecanismo dependente de energia, b) A 5-HT também pode ser empacotada em vesículas sinápticas, através da ação do transportador vesicular de monoamina tipo 2 (VMAT2), encontrado

exclusivamente no SNC, vinculado à proteína transportadora de ligação da serotonina (SBP) podendo ser liberado para o líquido extracelular por exocitose em um processo dependente de cálcio. c) A 5-HT quando liberada pode ser reciclada para o interior do neurônio pré-sináptico através da proteína transportadora de serotonina (SERT) ou pode ser metabolizada a 5-HIAA por células pós-sinápticas contendo monoamina oxidase A (Fuller and Wong, 1990; Erickson, Schafer et al., 1996; Wade, Chen et al., 1996; Ruddick, Evans et al., 2006; Siegel and Douard, 2011; Fidalgo, Ivanov et al., 2012). Esses mecanismos são descritos na figura 2.

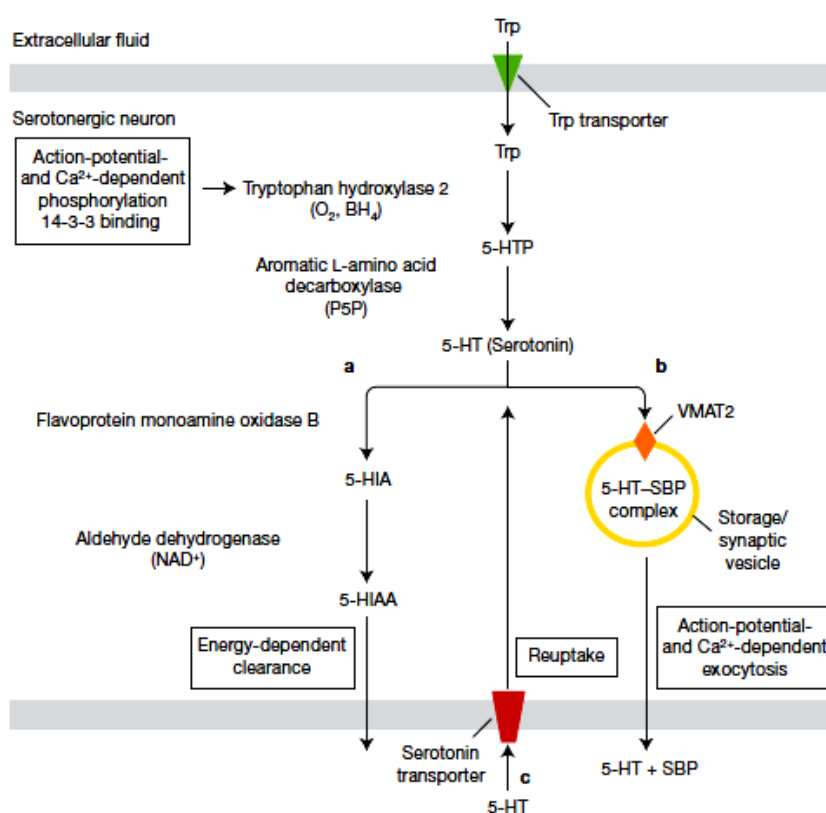


Figura 2. Visão esquemática da síntese de 5-HT no neurônio serotonérgico. *Figura retirada do artigo Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. expert reviews in molecular medicine; Vol. 8; Issue 20; August 2006.*

As ações intracelulares da 5-HT são mediadas por 7 famílias diferentes de receptores (5-HT1- 5-HT7), contendo 14 diferentes subtipos de receptores (Hoyer, Clarke et al., 1994). Estes receptores são classificados em sete grupos (Htr 1-7), definidos de acordo com a sua estrutura e da origem da sinalização (Tohda, Nomura et al., 2006). Todos esses receptores são proteínas- G-

acopladas, com exceção do receptor 5-HT₃, que utiliza um mecanismo ionotrópico (Bockaert, Claeysen et al., 2006)(Figura 3). Embora as funções dos receptores 5-HT_{1A} (Gur, Newman et al., 2003), 5-HT_{1B} (Simansky and Nicklous, 2002), 5-HT_{2A} (Park, Harrold et al., 1999) e 5-HT_{2C} (Hewitt, Lee et al., 2002) ainda não esteja bem compreendida, sua ação serotoninérgica mostra-se estar relacionada com a ingestão alimentar (Meister, 2007).

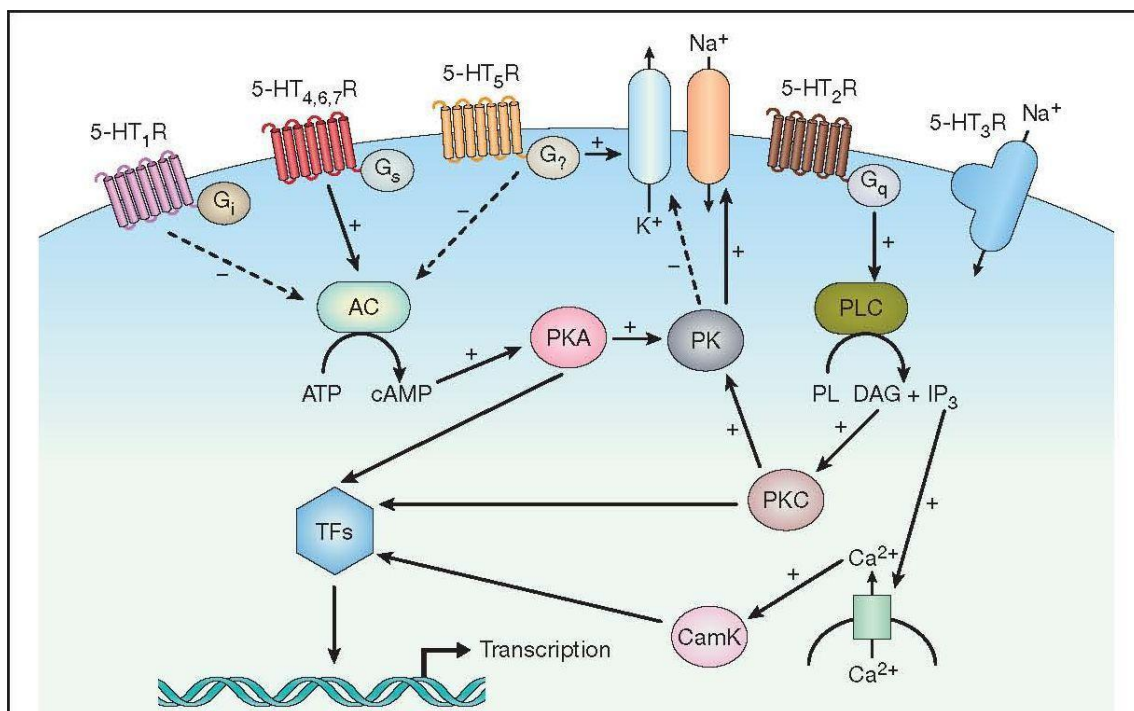


Figura 3. Receptores serotoninérgicos e respectivas ações intracelulares. Linhas pontilhadas indicam efeitos inibitórios (LAM & HESLER, 2007).

Durante a ontogênese a 5-HT modula a proliferação de células neurais e não neurais (Wallace and Lauder, 1983; Chubakov, Gromova et al., 1986). Essa monoamina promove a diferenciação e sobrevivência de neurônios glutamatérgicos no córtex encefálico em desenvolvimento (Dooley, Pappas et al., 1997; Lavdas, Blue et al., 1997). A função da 5-HT como um fator neurotrófico, primariamente, em relação a sua função como neurotransmissor implica que as estruturas essenciais para o seu metabolismo (armazenamento, liberação e recaptação) sejam desenvolvidas muito precocemente durante a ontogenia neuronal (Lautenschlager, Holtje et al., 2000). Embora 5-HT seja principalmente sintetizada a partir de neurônios serotoninérgicos, tem sido

observado durante o período de desenvolvimento, a expressão de proteínas SERT nas fibras talamocorticais, levando à absorção e liberação regulada de serotonina a partir dessas fibras (Lebrand, Cases et al., 1996).

Os mecanismos de auto-regulação através dos auto-receptores 5-HT_{1A} e 5HT_{1B} estão presentes em neurônios serotoninérgicos no 14º dia gestacional na região rostral da rafe (Hery, Boulenguez et al., 1999). Além disso, o armazenamento e liberação de 5-HT foram detectados no 16º dia gestacional em projeções serotoninérgicas para o hipotálamo (Ugrumov, Taxi et al., 1989). Além de seu papel na regulação da maturação das áreas terminais, a serotonina pode definir a sua própria densidade de terminais, fenômeno conhecido como auto-regulação do desenvolvimento (Whitaker-Azmitia, 2001).

No encéfalo, as projeções serotoninérgicas inervam múltiplas regiões corticais estando envolvidas na regulação de atividades que regem o comportamento (Jacobs and Fornal, 1999) e de mecanismos fisiológicos, como a regulação do sono/vigília (Leonard, 1996; Thase, 2000) do humor, do apetite, do ritmo circadiano (Morin, 1999; Jiang, Teshima et al., 2000), de fenômenos cognitivos como aprendizado e memória, além de processos autonômicos (McNamara and Skelton, 1993). Há crescentes evidências de que a susceptibilidade a distúrbios do sono e depressão estaria relacionada com as alterações dependentes de 5-HT (Ansorge, Zhou et al., 2004; Lattimore, Donn et al., 2005; Alexandre, Popa et al., 2006). Além de sua importante função como neurotransmissor, 5-HT desempenha um papel relevante no desenvolvimento de quadros patológicos como transtorno de ansiedade, bulimia nervosa e depressão maior (Randy and Sansone, 2012).

A 5-HT apresenta seus níveis regulados por meio de proteínas transportadoras de serotonina (SERT), que realizam a recaptação e transporte da serotonina até as vesículas secretoras nos terminais pré-sinápticos e por meio da enzima monoamino oxidase (MAO) que degrada a serotonina (Borue, Chen et al., 2007). O SERT determina o tamanho e a duração de respostas serotoninérgicas, desempenhando um papel-chave na neurotransmissão (Lesch and Mossner, 1998) apresentando seus níveis reduzidos nos núcleos da rafe (Vollmayr, Keck et al., 2000). Os inibidores seletivos da recaptação de

serotonina (ISRS) são importantes nas terapias para depressão e ansiedade, pois, aumentam a biodisponibilidade de 5-HT na fenda sináptica (Fuller, 1996).

Alterações nos níveis desta amina biogênica, durante o desenvolvimento, através do tratamento precoce com fármacos ou exposição a diversos fatores ambientais podem induzir modificações morfo-funcionais irreversíveis (de-Castro, Cabral-Filho et al., 1993; Manhaes de Castro, Barreto Medeiros et al., 2001). Experimentos com roedores evidenciaram que a administração de ISRS durante as fases iniciais de desenvolvimento (período crítico) leva a alterações neuronais que acarretam mudanças dos estados comportamentais (Borue, Chen et al., 2007).

2.2 Núcleos da Rafe

Os anatomistas Ramón e Cajal em 1911 descreveram estruturas neuronais grandes, multipolares e de projeções indefinidas que formavam agregados na linha mediana do tronco encefálico e que apresentavam projeções axonais extensas (Ramon and Cajal, 1911). Estudos citoarquitetônicos em gatos, algumas décadas depois, descreveram pela primeira vez os núcleos da rafe (Taber, Brodal et al., 1960). Esses núcleos são em número de oito, assim denominados no sentido rostro-caudal: núcleo linear rostral da rafe (RLi), linear caudal da rafe (CLi), dorsal da rafe (DR), mediano da rafe (MnR), pontino da rafe (PnR), magno da rafe (MgR), pálido (Rpa) e obscuro da rafe (Rob) (Taber, Brodal et al., 1960; Dahlstroem and Fuxe, 1964). A primeira análise histológica de monoaminas foi realizada por técnicas de histofluorescência, que proporcionaram o mapeamento dos neurônios de 5-HT no encéfalo de rato (Dahlstroem and Fuxe, 1964). Essas células apareciam tanto grandes quanto pequenas, apresentando um pericário multipolar ou fusiforme (Dahlstroem and Fuxe, 1964; Steinbusch, 1981). Existem, também, corpos neuronais serotoninérgicos em outras regiões, como na área postrema, no núcleo do trato solitário, no lócus coeruleus e no hipotálamo (Steinbusch, 1981). Os núcleos da rafe contêm populações heterogêneas de neurônios, com diferentes formas e projeções (Azmitia, 1999). No entanto, nem todos os neurônios da rafe contem 5-HT, e a quantidade de neurônios que sintetizam 5-

HT varia consideravelmente dentro de cada núcleo (Tork, 1985; Harding, Paxinos et al., 2004). Entre outras substâncias encontradas podemos citar a substância P, hormônio liberador de tireotropina (TRH), noradrenalina e ácido gama-amino-butírico (GABA), havendo ou não co-localização com a 5-HT (Charara and Parent, 1998). Poucos neurônios 5-HT encontram-se fora dos núcleos da rafe, como por exemplo, aqueles que estão em relação com o lemnisco medial ou em regiões da formação reticular (Jacobs and Azmitia, 1992; Charara and Parent, 1998). Os grupos de neurônios de 5-HT foram classificados alfanumericamente, no sentido caudal-rostral, de B1-B9 em ratos (Dahlstroem and Fuxe, 1964), podendo ser correlacionados com os núcleos da rafe (Figura 4 A e B).

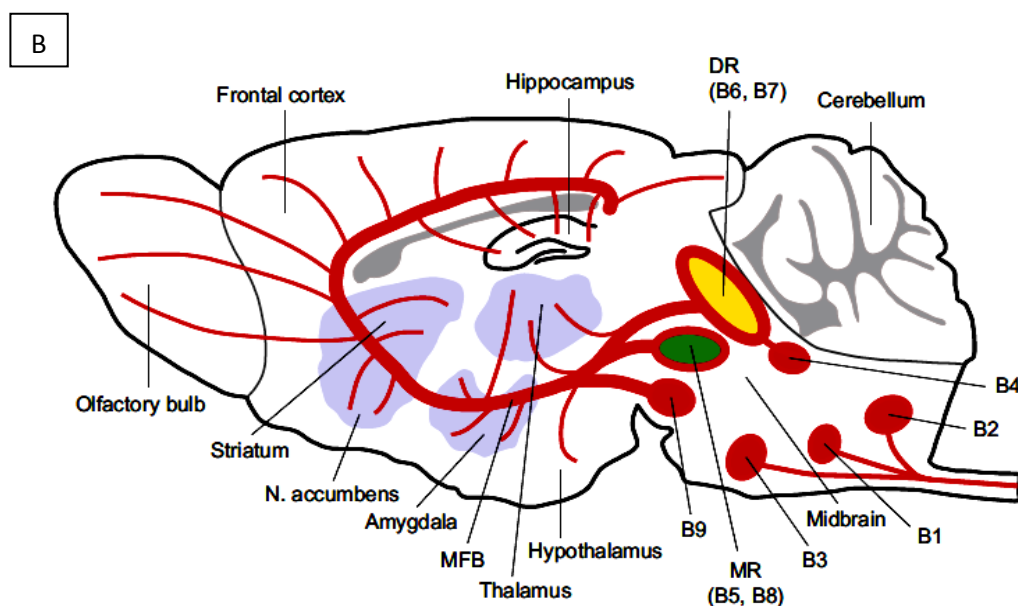
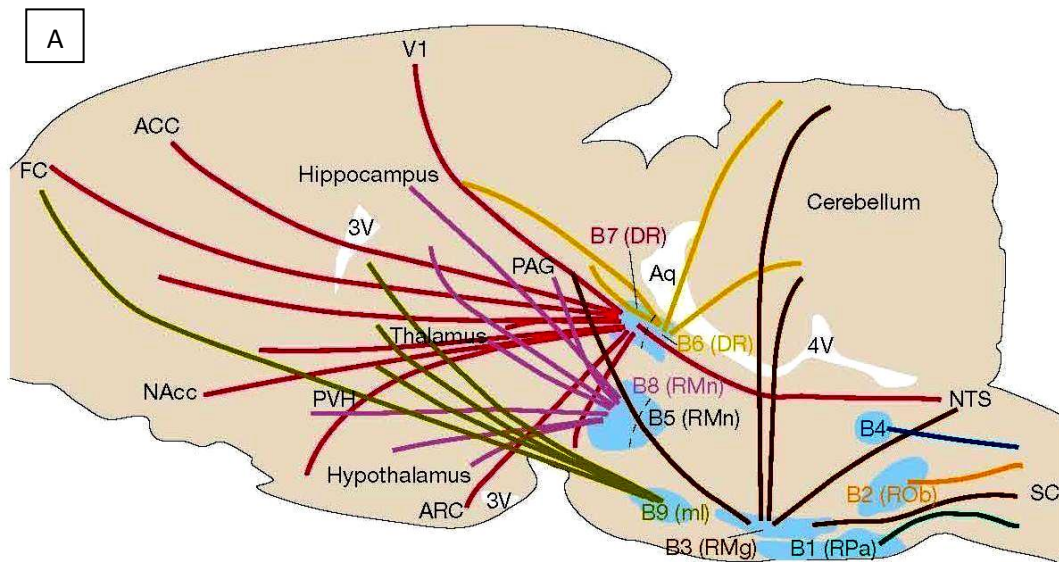


Figura 4. Sistema serotoninérgico de roedores organizados em grupos B1-B9. **A.** A figura mostra fibras representativas indicando vias serotoninérgicas cerebrais do rato em diferentes cores. O grupo celular (B1-9) está representado nas áreas em azul. Abreviações: 3V, terceiro ventrículo; 4V, quarto ventrículo; ACC, córtex anterior cingulado; Aq, aqueduto; ARC, núcleo hipotalâmico arqueado; DR, núcleo dorsal da rafe; FC, córtex frontal; ml, lemnisco medial; NAcc, núcleo accumbens; NTS, núcleo do trato solitário; PAG, substância cinzenta periaquedutal; PVH, núcleo hipotalâmico paraventricular; RMg, núcleo magno da rafe; RMn, núcleo mediano da rafe; Rob, núcleo obscuro da rafe; RPa, núcleo pálido da rafe; SC, medula espinhal; V1, córtex visual primário (Lam & Hesler, 2007). **B** Imagem retirada do artigo: *serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. Neuron. Oct 4;76(1):175-91. 2012.*

Na descrição anatômica clássica, o grupo superior é composto por cinco núcleos principais: o núcleo caudal linear da rafe (B8), núcleo mediano da rafe (B5 e B8), núcleo dorsal da rafe (B6 e B7), núcleo pontino da rafe (Porção mais inferior de B5) e neurônios laterais de B9 dispostos dorsalmente ao lemnisco medial e ao núcleo dorsal da rafe, células lateralmente deslocadas no núcleo pontino centralis oralis (DR; B6 e B7) (Soares, et al, 2012). Já o grupo inferior é composto por quatro núcleos principais: o núcleo obscuro da rafe (B2), núcleo pálido da rafe (B1 e B4), núcleo magno da rafe (B3) e neurônios na medula ventrolateral incluindo o núcleo paragigantocelular lateral e núcleos reticulares intermediários (B1/B3) (Brodal and Walberg, 1960; Jacobs and Azmitia, 1992; Harding, Paxinos et al., 2004).

A partir dos núcleos da rafe, os neurônios serotoninérgicos enviam projeções descendentes para o tronco encefálico e para a medula espinhal, e projeções ascendentes para estruturas prosencefálicas (diencéfalo e telencéfalo), além de circuitos recíprocos locais (Steinbush, 1981; Tork, 1985). As eferências dos neurônios serotoninérgicos estão nas seguintes direções: projeções ascendentes, projeções para o tronco encefálico e cerebelo e projeções descendentes (Steinbush, 1981; Tork, 1985). Neurônios 5-HT da porção ascendente enviam suas fibras para a porção frontal do encéfalo onde a extensa colateralização de seus terminais inervam densamente muitas regiões do encéfalo, estando relacionadas com matrizes de neurônios localizados no córtex, no estriado, no hipocampo e na amígdala (Heisler, Jobst et al., 2006; Calizo, 2011). No entanto, observa-se maior densidade de inervação no córtex perirrinal, occipital, córtex frontal, giro do cíngulo, área entorrinal, corpo amigdalóide e hipocampo (Lesch and Waider, 2012). As áreas subcorticais que recebem fibras serotoninérgicas provenientes da rafe são: núcleo accumbens,

claustrum, amígdala, núcleos septais e núcleo intersticial da estria terminal. No hipotálamo os principais alvos são: núcleos supraquiasmático, supra-óptico, paraventricular, pré-mamilares, região infundibular, área pré-óptica lateral, hipotálamo lateral e hipotálamo posterior (Azmitia and Segal, 1978; Tork, 1985; Vertes, 1991; Jacobs and Azmitia, 1992; Cavalcante, Alves et al., 2002).

As projeções para a medula espinal e cerebelo, estão envolvidas na atividade motora, no controle da dor, e na regulação do sistema nervoso autônomo (Lesch and Waider, 2012). Para o tronco encefálico e cerebelo a inervação serotoninérgica é proveniente do núcleo pontino, e do núcleo magno da rafe (Tork, 1985; Harding, Paxinos et al., 2004). Outras regiões no tronco encefálico que recebem inervação serotoninérgica são a área tegmentar ventral, substância negra, colículo superior, locus ceruleus (Tork, 1985; Harding, Paxinos et al., 2004; Lee, 2009).

Em resumo, os núcleos da rafe constituem um agrupamento de neurônios de morfologias distintas que são organizados inicialmente na linha mediana do tronco encefálico. Em sua maioria são produtores de 5-HT e estão relacionados diretamente com as funções desempenhadas pelas áreas encefálicas que recebem suas fibras. Seus grupos mais rostrais projetam principalmente para o córtex frontal e parte do cerebelo e seus grupos caudais projetam para o próprio tronco encefálico, também para o cerebelo e para medula espinal. Sendo também a classificação de Paxinos & Watson, 2007, bastante utilizada atualmente.

2.3 Exposição a inibidores seletivos de recaptação da serotonina durante o desenvolvimento

Os ISRS estão entre os medicamentos mais amplamente utilizados na psiquiatria (Wang, David et al., 2008; Homberg, Olivier et al., 2011). Eles apresentam, atualmente, um grande número de indicações clínicas para tratamento de transtorno de ansiedade generalizada, transtorno do pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno de ansiedade social, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno disfórico pré-menstrual e bulimia nervosa,

além da depressão maior (Randy and Sansone, 2012). No entanto, apesar de numerosos ensaios demonstrarem uma segurança considerável na administração de ISRS em adultos, os dados referentes à segurança de curto e de longo prazo em crianças e adolescentes são ainda limitados (Homberg, Olivier et al., 2011).

A fluoxetina foi à primeira droga disponibilizada para o tratamento clínico nas Américas e em outros países do mundo dentre as classes dos ISRS (Hiemke; Härtter, 2000). Seu principal mecanismo de ação é o bloqueio da proteína de recaptação o que promove aumento da biodisponibilidade sináptica da serotonina, acentuando a suas funções por meio da interação com os receptores serotoninérgicos (Hiemke; Härtter, 2000).

Estudos mostram que a administração crônica de fluoxetina e outros antidepressivos aumentam a neurogênese no giro denteado (GD) do hipocampo (Malberg, Eisch et al., 2000; Santarelli, Saxe et al., 2003; Wang, David et al., 2008; Marlatt, Lucassen et al., 2010; Kobayashi, Ikeda et al., 2011). Marlatt e colaboradores em 2010 avaliaram a neurogênese no hipocampo e o comportamento em campo aberto de ratas fêmeas após 28 dias de tratamento com fluoxetina, duloxetina ou submetidas ao exercício de corrida. Nesse estudo observou-se que a fluoxetina aumentou a porcentagem de novas células que se tornaram neurônios, o que não foi observado para a duloxetina (Marlatt, Lucassen et al., 2010). No entanto, ainda é desconhecida a forma como a neurogênese pode alterar o funcionamento do hipocampo, levando a alterações importantes no comportamento (Kobayashi, Ikeda et al., 2011). Outros estudos demonstraram que a administração crônica de fluoxetina também pode reverter o estado de maturação de células granulares denteadas em ratos adultos (Kobayashi, Ikeda et al., 2011). Essas alterações manifestam-se através de modificações relevantes nas propriedades funcionais e fisiológicas das células granulares como a excitabilidade neuronal, e de uma expressão precoce do gene que codifica a alfa-CaMKII, o fator neurotrófico derivado do cérebro, ou a subunidade do receptor de glutamato GluK2/GluR6 (Kobayashi, Ikeda et al., 2010). Essa plasticidade neuronal induzida pela fluoxetina, afeta um grande número de grânulos celulares denteados, sendo

provável que ela altere os circuitos neurais do hipocampo tendo um papel relevante sobre a regulação de comportamentos.

Quando administrados em fases precoces da vida, os ISRS causam disfunção na homeostase serotoninérgica alterando a morfogênese neuronal. Diante desse efeito, alguns estudos descrevem alterações das espinhas dendríticas e suas relações com a plasticidade sináptica e desordens neurodegenerativas promovidas por ISRS (Wang, David et al., 2008; Zheng, Xu et al., 2011). Observou-se que tratamentos com fluoxetina e fluvoxamina por 18 dias resulta na redução significativa na densidade da coluna de dendritos basais no dia 22 pós-natal, mas apenas a fluvoxamina causa redução na densidade da coluna de dendritos apicais (Zheng, Xu et al., 2011). Além disso, alguns estudos investigaram se as alterações morfológicas induzidas pela exposição precoce a ISRS estavam associadas com déficits comportamentais em idade adulta (Zheng, Xu et al., 2011). Por meio do teste de campo aberto, os ratos tratados em longo prazo com fluoxetina apresentam uma redução na distância total percorrida. Estes resultados demonstram que a atividade locomotora foi prejudicada pelo uso crônico da fluoxetina. Em relação ao tempo de movimento o grupo fluoxetina apresentou uma redução no tempo, comparado ao grupo fluvoxamina (Zheng, Xu et al., 2011).

Analisando os efeitos do tratamento crônico com ISRS, fluoxetina, Vetencourt et al., 2012 mostraram que esse antidepressivo restaura a plasticidade do sistema visual de ratos adultos. Seus resultados sugerem que o aumento da transmissão serotoninérgica devido à ação da fluoxetina promove mecanismos funcionais e/ou estruturais que modificam o equilíbrio inibitório-excitatório intracortical no córtex visual adulto. O estudo sugere também que a redução da inibição GABAérgica induzida pela Fluoxetina e o aumento da expressão crônica de BDNF são um sinal para os genes que regulam a plasticidade, o que leva a modificações funcionais dos circuitos neurais subjacentes a sensibilidade a privação monocular no adulto e a restauração da ambliopia (Vetencourt, Sale et al., 2008).

Os ISRS também são utilizados no tratamento da ansiedade e depressão em crianças e adolescentes (Kodish, Rockhill et al., 2011). Há benefício clínico de pacientes que foram tratados com sertralina, fluoxetina,

paroxetina ou fluvoxamina (Riddle, Reeve et al., 2001). Apesar de eficiente clinicamente, para essa efetividade é necessário semanas de tratamento com ISRS antes da visualização de resposta aos sintomas (Riddle, Reeve et al., 2001). No entanto, alguns estudos alarmantes relataram que as crianças e adolescentes podem apresentar aumento de ideação suicida, bem como agitação, depressão e ansiedade devido ao tratamento com ISRS (Gibbons, Brown et al., 2007; Usala, Clavenna et al., 2008; Homberg, Olivier et al., 2011).

3. HIPÓTESE

A exposição crônica a inibidor seletivo de recaptação de serotonina durante a lactação promove o aumento na quantidade de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe e na atividade de serotonina em áreas de projeção em ratos desmamados.

4. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito da inibição seletiva da recaptação da serotonina, durante o período neonatal, sobre o número de neurônios serotoninérgicos e concentração de serotonina.

Objetivos Específicos

- Mensurar o número de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe.
- Avaliar a concentração de Serotonina e 5HIAA nos núcleos da rafe, no hipotálamo, amígdala, hipocampo e córtex.
- Avaliar a atividade de serotonina nos núcleos da rafe, hipotálamo, hipocampo, amígdala e córtex.

5. MATERIAL E MÉTODO

Delineamento experimental

5.1 Animais

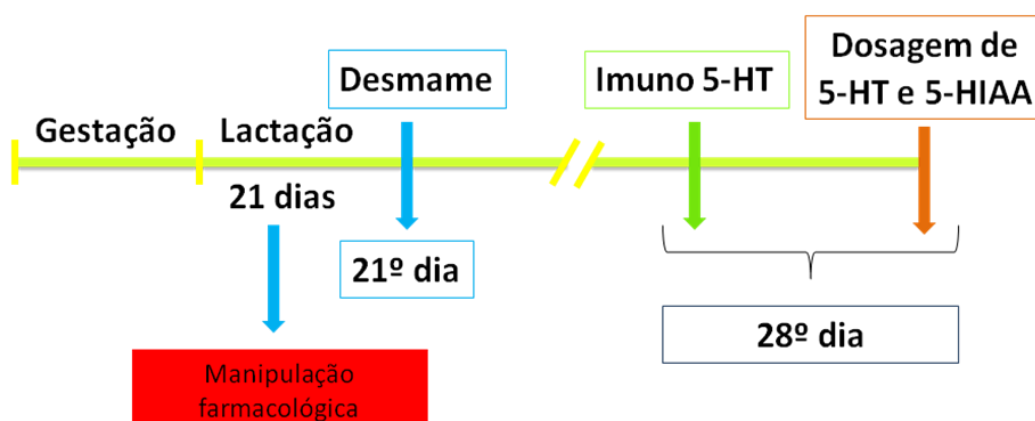
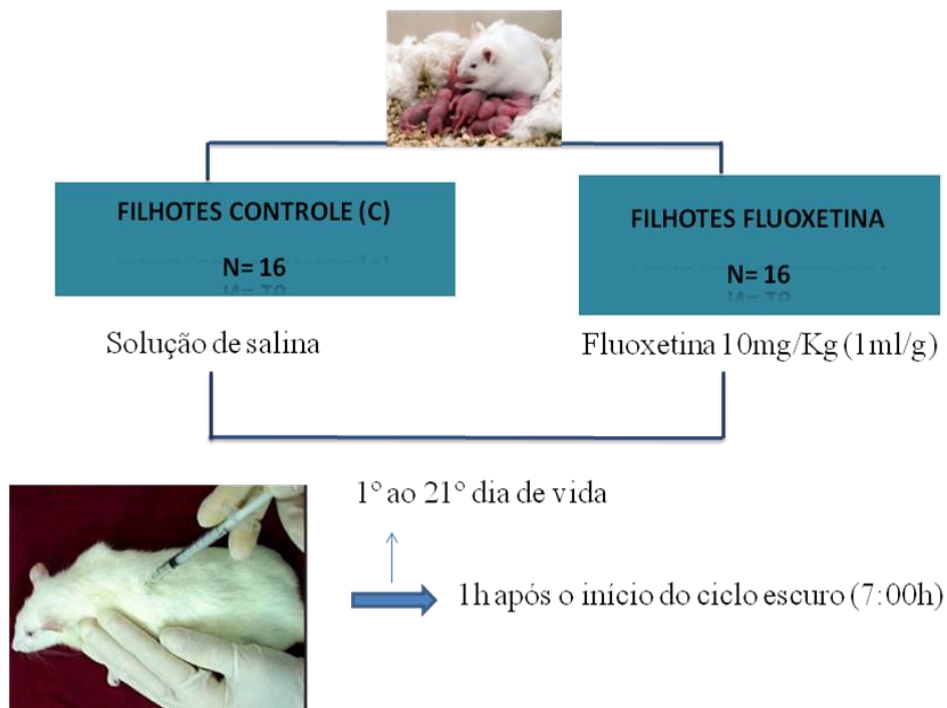
Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição – UFPE. Fêmeas primíparas foram mantidas sob condições padrão de biotério com temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas invertido (escuro: 6:00h às 18:00h / claro: 18:00h às 6:00h) e livre acesso à água *ad libitum* e à alimentação (dieta Labina – Purina S/A durante todo experimento). Após a adaptação, as ratas em período estral acasalaram na proporção de duas fêmeas para um macho. Durante o período de prenhez, as ratas foram alocadas em gaiolas individuais e continuaram em condições padrão de biotério até o nascimento dos filhotes. As ninhadas foram compostas no primeiro dia pós-natal (1º DPN) dos filhotes pela nutriz e seis ratos neonatos machos escolhidos aleatoriamente.

O manejo e os cuidados com os animais seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). 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).

5.2 Obtenção dos Grupos Experimentais

Foi utilizado um inibidor seletivo de recaptação de serotonina, a fluoxetina, na concentração de 10 mg/Kg de peso corporal durante a lactação (Wong et al., 1995; Qu et., 2009). O fármaco foi obtido na forma de cloridrato de fluoxetina (Bristol-USA) e dissolvido em solução salina, NaCl 0.9% (Silva, Goncalves et al., 2010). Os ratos neonatos receberam o tratamento uma hora após o início do ciclo escuro (7:00h), devido ao pico de liberação de 5-HT (Sanchez, Sanchez et al., 2008). Os grupos experimentais foram formados segundo tratamento farmacológico:

- Fluoxetina (F): formado por filhotes (n= 16) submetidos a tratamento com fluoxetina (10mg/Kg pc., sc, dissolvida em solução salina, NaCl 0.9%, 1ml/kg).
- Salina (S): constituído por filhotes (n= 16) que receberam solução salina (NaCl 0.9%, 1ml/kg, sc).



5.3 Experimentos

5.3.1 *Perfusão transcardíaca*

Ao 28^o dia de vida, os animais foram perfundidos transcardiacamente após serem anestesiados profundamente com hidrato de cloral¹ 35% (400mg/Kg). Para a perfusão, o animal foi posicionado em superfície apropriada com imobilização da cabeça. Esta foi realizada com um suporte específico que permitisse a deposição de gelo sobre a cabeça do animal durante o período da passagem do fixador (Nogueira et al., 1997). Para o acesso ao ventrículo esquerdo, onde foi introduzida cânula para perfusão, foi realizado inicialmente um corte na parede do abdome expondo-se o processo xifóide. Este foi realizado em forma de “V” na musculatura e costelas, permitindo assim, a exposição do coração na cavidade torácica. Para impedir que a perfusão alcançasse a aorta descendente, e como consequência toda sua área de irrigação, o pulmão esquerdo foi afastado e a aorta descendente pinçada. Em seguida, uma cânula acoplada a uma bomba peristáltica² foi introduzida no ventrículo esquerdo do coração e presa na área por um keller. A bomba foi acionada em velocidade compatível com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Inicialmente foi infundida 150ml de solução salina (NaCl, 0,9%) a temperatura ambiente para remoção do sangue dentro dos vasos. Este procedimento previne a formação de coágulos e propicia a correta penetração do fixador nos tecidos. A perfusão com salina foi seguida com a infusão de solução fixadora (4% de paraformaldeído em 4^o C). Quando foi observada a contração dos membros superiores, indicando a chegada do fixador nesta região, foi adicionado gelo sobre a cabeça do animal, para minimizar a degradação protéica.

Ao final da passagem do fixador, os encéfalos foram retirados do crânio, e pós-fixados na mesma solução fixadora mais sacarose (20%) durante 4 horas. Após esse período, foi armazenado em solução crioprotetora (Tampão fosfato de potássio – KPBS - mais sacarose 20%) por 6-24 h. Os encéfalos foram crio-seccionados em cortes coronais de 40µm de espessura utilizando-

¹ Reagen

² Masterflex, Cole-Parmer, Niles, IL, EUA

se criomicrotomo de congelamento³. Cinco séries de cortes foram coletadas, para cada animal, em placa de acrílico (25 cavidades) com solução anticongelante e armazenadas a -20°C.

5.3.2 Imunohistoquímica contra serotonina

Três séries de cortes foram submetidas a reações de imunohistoquímica contra serotonina. Ao serem removidos da solução anticongelante onde estavam armazenados, os cortes coronais de uma série, foram lavados em KPBS (3 x 10 min). Em seguida foram incubados em solução com anticorpo primário contra serotonina⁴ por 48h. Esta solução foi formada por KPBS, Triton⁵ (0,3 %), soro normal de cabra⁶ (NGS 5%) e anticorpo primário anti-5-HT feito em coelho (Diluição 1:5000). Durante a incubação os cortes permaneceram em recipientes de 1,5 mL posicionados em agitador protegido da luz. Após a incubação os cortes foram submetidos a lavagens em KPBS (3 x 10 min) e posteriormente incubados em solução com anticorpo secundário⁷, feito em cabra contra coelho, por 90 min. Esta solução foi composta por Triton (0,3%), KPBS e anticorpo secundário biotilado (diluição 1:200). Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens com KPBS (3 x 10 min) e outra incubação (90 min) com complexo avidina-biotina-peroxidase 1 %⁸. Esta solução foi composta por KPBS, triton (0,3 %) e cloreto de sódio⁹ (NaCl). Os cortes foram submetidos a lavagens com KPBS (2 x 10 min) e acetato de sódio (2X 10 min). Em seguida foi realizada, por 5 minutos, a reação de imunoperoxidase com 3,3-diaminobenzidina (DAB)¹⁰ diluído em solução de água destilada, níquel sulfato amônio (NAS)¹¹, acetato de sódio (0.2 M), cloreto

³ SM 2000 R, Leica, Alemanha

⁴ Protos Biotech Corporation, New York, NY, EUA

⁵ Amresco, Sólón, OH, EUA

⁶ Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA

⁷ Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA

⁸ ABC Kit Vectastain Elite Standard, Vector laboratories, Burlingame, CA, EUA

⁹ Merk Laboratories, Darmstadt, Alemanha

¹⁰ Sigma, St Louis, MO, EUA

¹¹ Sigma, St Louis, MO, EUA

de amônio¹² e Beta d Glucose¹³. Após esta reação foi acrescentada a solução anterior Glucose oxidase¹⁴ e incubação dos cortes até obterem cor marrom claro/púrpura. Para neutralizar esta reação, os cortes foram submetidos a lavagens com acetato de sódio (2 x 10 min) e, em seguida, com KPBS (3 x 10 min).

5.3.3 Análise quantitativa de neurônios 5-HT-IR

A análise foi realizada em microscopia óptica de campo claro. Foram quantificadas células com marcação evidente nos núcleos da rafe. Para cada núcleo da rafe foram considerados na análise todos os cortes coronais de uma série nos quais este núcleo foi evidenciado. Foram quantificadas todas as células em cada corte para cada núcleo. Para delimitação dos núcleos foi utilizado Atlas estereotático (Paxinos & Watson, 2007) e séries de cortes coradas em tionina, técnica de Nissl.

5.3.4 Dosagem de 5-HT e 5-HIAA

Os animais foram sacrificados no 28^o dia de vida por decapitação, sendo o encéfalo removido e congelado. Em seguida, para obtenção das áreas a serem analisadas, os encéfalos foram crio-seccionados em fatias de 300 µm utilizando micrótomo de congelamento e atlas para identificação dos níveis de corte. Após a microdissecção, as amostras foram pesadas e armazenadas a – 70°C. Para medir a concentração de serotonina e 5-HIAA foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (CLAE). Esta é uma técnica quantitativa pela qual compostos passíveis de oxidação ou redução podem ser dosados com alta precisão. O cromatógrafo é equipado com uma bomba injetora com 'loop' de 20 µL, coluna c18 de fase reversa (150 x 3,9 mm, com partícula esférica de 5 µm) e um detector eletroquímico com

¹² Amresco, Sólton, OH, EUA

¹³ Sigma, St Louis, MO, EUA

¹⁴ Sigma, St Louis, MO, EUA

potencial de 80 V. As amostras foram homogeneizadas em 120 μ L de uma solução de ácido perclórico¹⁵ (0,1M) acrescido de 0,02% de ácido tetra-acético etileno diamina (EDTA). Em seguida o material foi centrifugado a 10.000 x por 3 min. Foi injetado 20 μ l do sobrenadante no cromatógrafo para a realização da dosagem da 5-HT e do 5-HIAA. A relação 5HIAA/5-HT é considerada como medida da atividade serotoninérgica.

¹⁵ Merk, Alemanha

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após serem aplicados os testes de homogeneidade de variância e de normalidade, a comparação entre os diferentes grupos, foi dada pela Análise de Variância (*ANOVA-Two Way*) seguido do teste de *Bonferroni para medidas repetidas*, admitindo-se um nível de confiança de 95%. A análise dos dados foi realizada por meio do programa estatístico GraphPad Prism ® (Graph Pad Software, Inc, 2007).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O artigo original deste estudo é intitulado: **exposição neonatal a inibidor de recaptação da serotonina: análise de componentes do sistema serotoninérgico** e será submetido ao periódico Brain Research, Fator de impacto 2.89, Qualis A2 pela CAPES.

Neste artigo foi verificado o papel da manipulação farmacológica precoce com inibidor seletivo de recaptação de serotonina sobre o número de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe e sobre a dosagem de serotonina e de seu metabólito 5HIAA em diferentes estruturas encefálicas.

Exposição neonatal a inibidor de recaptação da serotonina: análise de componentes do sistema serotoninérgico

Diogo D'Paula Cunha Brasileiro de Melo¹, Luciana Pinato², Raul Manhães de Castro³, Maria Inês Nogueira², Sandra Lopes de Souza⁴

1. Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento – Universidade Federal de Pernambuco. – Recife- PE, Brazil.
2. Departamento de Anatomia – Universidade de São Paulo
3. Departamento de Nutrição
4. Departamento de Anatomia – Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brazil.

Autor correspondente: Sandra Lopes de Souza

Universidade Federal de Pernambuco- Departamento de Anatomia – UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária CEP:50670901- Recife-PE- Brasil

Fone: 55 81 2126 8567

Fax: 55 81 21268554

E-mail: sanlopesufpe@gmail.com

Resumo

Este estudo avaliou o efeito da inibição seletiva da recaptação de serotonina durante o período neonatal sobre parâmetros morfofuncionais do sistema serotoninérgico nos núcleos da rafe e nas áreas encefálicas de projeção serotoninérgica. Ratos Wistar foram divididos nos grupos Fluoxetina (Flx, Fluoxetina 10mg/Kg p.c.) e Salina (S, NaCl 0,9%, 1mL/Kg p.c.) segundo a manipulação farmacológica diária do 1^o ao 21^o dia de vida. Durante este período foram avaliadas a quantidade de neurônios de 5-HT e a dosagem desse neurotransmissor e do seu metabólito. Os encéfalos foram processados com técnicas de imunohistoquímica contra 5-HT e submetidos à dosagem de serotonina e ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) no 28^o dia de vida. Não houve diferença no número de neurônios 5-HT-IR nos núcleos da rafe entre os grupos. O núcleo DR de animais do grupo Flx ($1153,5 \pm 125,4$; $p < 0.01$) apresentou maior concentração de 5-HT quando comparados ao grupo S ($819,9 \pm 148,3$; $p < 0.01$). O grupo FLx apresentou também, maior concentração de 5-HIAA no CLi/RLi (Flx= $17569 \pm 316,3$ vs S= $931,1 \pm 98,6$; $p < 0.01$), DR (Flx= $3303,4 \pm 156,7$ vs S= $1748,3 \pm 148,3$; $p < 0.001$) e MnR (Flx= $2454,1 \pm 236$ vs S= $1561 \pm 158,9$; $p < 0.01$). Nas áreas de projeção o grupo Flx apresentou menor concentração de 5-HT no hipotálamo (Flx= $295,9 \pm 40,3$ vs S= $478,5 \pm 71,8$; $p < 0.01$) e maior concentração de 5-HIAA na amígdala (Flx= $1636,3 \pm 103,7$ vs S= $890,8 \pm 41,6$, $p < 0.05$) e no hipotálamo (Flx= $2031,3 \pm 316,1$ vs S= $1262,4 \pm 237,7$; $p < 0.05$) quando comparado ao grupo S. Os resultados deste estudo evidenciam que a exposição crônica a fluoxetina durante o período de lactação promove ajustes de componentes do sistema serotoninérgico, sugerindo que tal exposição precoce pode causar alterações no padrão saúde-doença.

Palavras-chave: desenvolvimento, serotonina, fluoxetina, rato neonato, núcleos da rafe.

Introdução

Os inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS) são eleitos no tratamento da depressão devido aos seus menores efeitos adversos (Källén 2004). O bloqueio da proteína de recaptação da serotonina (SERT) aumenta a concentração extracelular de serotonina potencializando a neurotransmissão serotoninérgica (Fuller, 1994). Os efeitos dos ISRS podem ser dependentes da idade do organismo alvo (para revisão ver: Olivier et al., 2010). Quando o bloqueio do SERT é realizado no período de desenvolvimento do sistema nervoso, pode modificar a neuroquímica serotoninérgica com repercussões permanentes sobre morfologia e função do sistema nervoso. Ao contrário do que ocorre na vida adulta, Camundongos knockout SERT apresentam ansiedade e depressão (Lira, Zhou et al., 2003). Assim, muitos efeitos adversos do tratamento perinatal com ISRS são descritos em roedores e humanos (Chambers, Johnson et al., 1996; Laine, Heikkinen et al., 2003; Moses-Kolko, Bogen et al., 2005; Sanz, De-las-Cuevas et al., 2005; Borue, Chen et al., 2007; Noorlander, Ververs et al., 2008). Em humanos, houve aumento de nascimentos pré-maturos e do risco para hipertensão pulmonar quando o tratamento com fluoxetina iniciou no terceiro trimestre de gestação (Chambers, Johnson et al., 1996). Exposição no útero a ISRS promove sinais de abstinência nas primeiras semanas de vida (Sanz, De-las-Cuevas et al., 2005). Apresentam também alterações do desenvolvimento e controle motor (Costei, Kozar et al., 2002; Casper, Fleisher et al., 2003). Em roedores, o tratamento durante a lactação com ISRS resulta em padrões comportamentais mal-adaptativos que permanecem após a utilização do fármaco (Hansen, Sanchez et al., 1997; Ansorge, Zhou et al., 2004). Entre as alterações comportamentais pode-se citar a redução da atividade sexual, aumento no consumo de etanol, aumento do comportamento de ansiedade e depressão e redução do comportamento agressivo (Hilakivi, Sinclair et al., 1984; Hansen, Sanchez et al., 1997; Maciag, Simpson et al., 2006). Poucos são os dados que descrevem as alterações neuroquímicas do sistema serotoninérgico promovidas por ISRS durante períodos de desenvolvimento do sistema nervoso (Maciag, Simpson et al., 2006; Berg, Backstrom et al., 2013).

A serotonina exerce papel crucial no desenvolvimento do sistema nervoso modulando a proliferação celular e migração neuronal durante o desenvolvimento fetal e pós-natal precoce. Corroborando com seu papel, foi descrita recentemente a produção placentária de serotonina para suprir a demanda fetal e garantir seu papel nos eventos do desenvolvimento do sistema nervoso (Bonnin, Goeden et al., 2011). Sendo assim, eventos que venham a modificar a neurotransmissão serotoninérgica durante este período podem promover respostas adaptativas em diferentes componentes deste sistema. Assim, foi observado que o ISRS neonatal reduz a expressão de triptofano hidroxilase, enzima limitante para síntese de serotonina, nos núcleos Dorsal e Mediano da rafe (Maciag, Simpson et al., 2006). O tratamento neonatal com ISRS em roedores promove prejuízo no padrão axonal do córtex somatossensorial (Cases, Vitalis et al., 1996; Young-Davies, Bennett-Clarke et al., 2000; Xu, Sari et al., 2004). Eferências do tálamo para o córtex somatossensorial de ratos que receberam fluoxetina durante a primeira semana pós-natal, correspondente ao último trimestre de gestação, apresentaram menor número de ramificações na camada IV (Lee, 2009). Fluoxetina neonatal promoveu redução de tamanho do corpo celular serotoninérgico nos núcleos Dorsal e Mediano da rafe (Silva, Goncalves et al., 2010) e redução na complexidade da árvore dendrítica de neurônios corticais associada a presença de receptores 5-HT₃ (Smit-Rigter, Noorlander et al., 2012). A SERT, quando bloqueada cronicamente no período neonatal, apresentou imunoreatividade reduzida no córtex pré-frontal medial e primário somatossensorial (Maciag, Simpson et al., 2006). Quando analisado nos núcleo dorsal da rafe, a expressão do mRNA para o SERT foi aumentado um dia após tratamento crônico com ISRS do 8 ao 14 dia pós-natal, mas foi reduzido na vida adulta após 69 dias do término do tratamento (Hansen and Mikkelsen, 1998).

Uma simples injeção de ISRS aumenta os níveis extracelulares de serotonina e diminui os níveis de 5HIAA em várias regiões encefálicas (Invernizzi et al., 1992). Em ratos, este aumento ocorre com intensidades diferentes a depender da região encefálica, com maior concentração nos núcleos da rafe quando comparado ao hipocampo e córtex (Malagie, Trillat et

al., 1995). Considerando o papel do sistema serotoninérgico no desenvolvimento do sistema nervoso, e as alterações observadas em indivíduos que foram submetidos à ISRS durante o desenvolvimento, o presente estudo tem como objetivo descrever os níveis de serotonina e seu metabólito em diferentes regiões encefálicas após exposição crônica a ISRS durante a vida neonatal. Muitas discussões foram realizadas sob o ponto de vista de que essa exposição promoveria os efeitos sobre os níveis de serotonina observadas em organismo adulto. Aqui nós hipotetizamos que após o tratamento neonatal com um ISRS, ocorrerá o aumento na quantidade de neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe e nos níveis de serotonina e de seu principal metabólito, o ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA), estão elevados em áreas de projeção, mas não nos núcleos da rafe em ratos desmamados.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar do biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Um dia após o nascimento, as ninhadas foram ajustadas para seis filhotes (machos), pesando entre 6-7g cada. Segundo o tratamento farmacológico foram obtidos os seguintes grupos: Fluoxetina (Flx), formado por filhotes submetidos a tratamento com fluoxetina (10mg/Kg pc., sc) ou Salina (S) (NaCl 0.9%, 1ml/kg, sc) durante os primeiros 21 dias de vida. Cada ninhada foi composta por animais salina e fluoxetina na mesma proporção. Apenas um animal de cada ninhada foi utilizado nos experimentos para cada tratamento a fim de se evitar o efeito ninhada. Os procedimentos experimentais com os animais estão de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), obedecendo às normas de manuseio e cuidado com os animais (protocolo nº 103/03).

Imunohistoquímica contra serotonina

Ao 28^o dia de vida, os animais foram perfundidos transcardiacamente após serem anestesiados profundamente com hidrato de cloral 35% (400mg/Kg). A infusão de solução salina (NaCl, 0,9%) foi seguida de solução

fixadora (4% de paraformaldeído). Ao final da passagem do fixador, os encéfalos foram retirados do crânio, e pós-fixados na mesma solução fixadora mais sacarose (20%). Os encéfalos foram criosseccionados em cortes coronais de 40µm de espessura utilizando-se criomicrotomo de congelamento (SM 2000 R, Leica, Alemanha). Cinco séries de cortes foram coletadas, para cada animal, e armazenadas a -20°C.

Os cortes foram incubados em solução com anticorpo primário contra serotonina (Protos Biotech Corporation, New York, NY, EUA) por 48h. Esta solução foi formada por KPBS, Triton (Amresco, Sólton, OH, EUA) (0,3 %), soro normal de cabra (NGS 5%) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e anticorpo primário anti-5-HT (Diluição 1:5000). Posteriormente, foram incubados em solução com anticorpo secundário biotinilado (diluição 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), por 90 min. Após incubação (90 min) com complexo avidina-biotina-peroxidase 1 % (ABC Kit Vectastain Elite Standard, Vector laboratories, Burlingame, CA, EUA) a revelação foi realizada com a reação de imunoperoxidase com 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St Louis, MO, EUA).

Análise quantitativa de neurônios 5-HT-IR

A análise foi realizada em microscopia óptica de campo claro. Foram quantificadas células com marcação evidente nos núcleos da rafe. Para cada núcleo da rafe foram considerados na análise todos os cortes coronais de uma série nos quais este núcleo foi evidenciado. Foram quantificadas todas as células em cada corte para cada núcleo. Para delimitação dos núcleos foi utilizado atlas estereotático (Paxinos & Watson, 2007).

Dosagem de 5-HT e 5-HIAA

Os animais foram sacrificados no 28^o dia de vida por decapitação, sendo o encéfalo removido e congelado. Em seguida, para obtenção das áreas a serem analisadas, os encéfalos foram criosseccionados em fatias de 300 µm utilizando microtomo de congelamento e atlas para identificação dos níveis de corte. Após a microdissecção, as amostras foram pesadas e armazenadas a -70°C. Para medir a concentração de serotonina e 5-HIAA foi utilizada a técnica

de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (CLAE). O cromatógrafo é equipado com uma bomba injetora com “loop” de 20 µL, coluna c18 de fase reversa (150 x 3,9 mm, com partícula esférica de 5 µm) e um detector eletroquímico com potencial de 80 V. As amostras foram homogeneizadas em 120 µL de uma solução de ácido perclórico (0,1M) (Merk, Alemanha) acrescido de 0,02% de ácido tetra-acético etileno diamina (EDTA). Em seguida o material foi centrifugado a 10.000 x por 3 min. Foi injetado 20 µl do sobrenadante no cromatógrafo para a realização da dosagem da 5-HT e do 5-HIAA. A relação 5HIAA/5-HT é considerada como medida da atividade serotoninérgica.

Análise de dados

A comparação entre os diferentes grupos foi dada pela Análise de Variância (*ANOVA-Two Way*) seguido do teste de *Bonferroni para medidas repetidas*, admitindo-se o um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). A análise dos dados foi realizada por meio do programa estatístico GraphPad Prism ® (Graph Pad Software, Inc, 2007).

Resultados

Números de neurônios 5-HT-IR nos núcleos da rafe

A análise quantitativa de neurônios 5-HT-IR nos núcleos da rafe não revelou diferenças entre os grupos FLx e S (Figura 1).

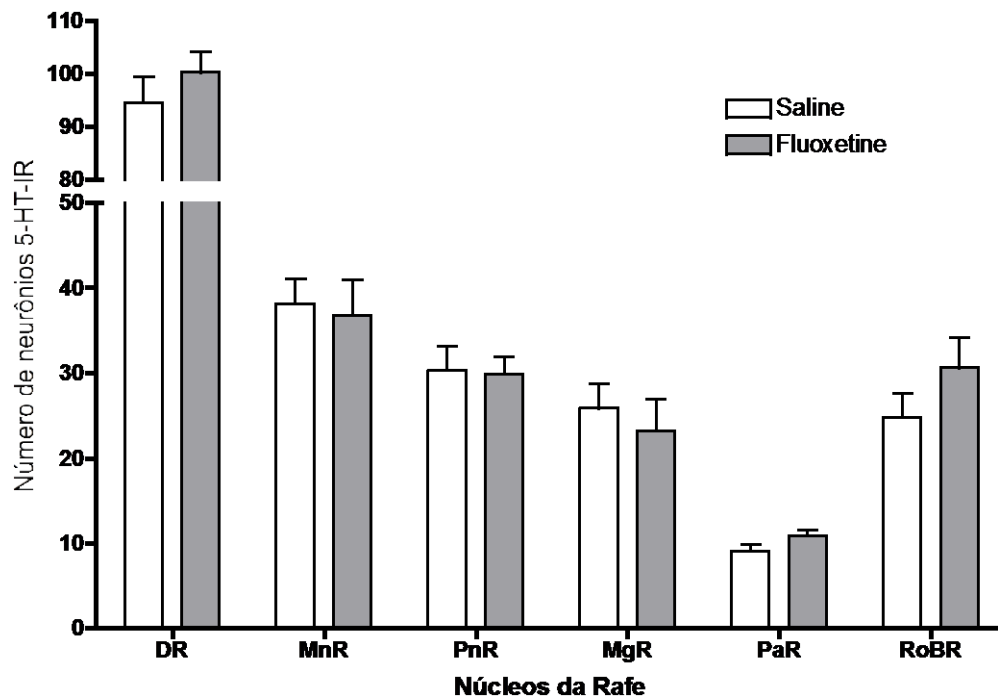


Figura 1- Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina sobre o número de neurônios 5-HT-IR nos núcleos da rafe de ratos. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina (n=6, 10mg/Kg p.c, s.c.) ou solução salina (n=6, NaCl 0,9%, 1ml/kg p.c, s.c.) do 1º ao 21º dia de vida. Os dados estão representados em média ± EP.

Dosagem de serotonina e 5-HIAA nos núcleos da rafe

Anova Two-way identificou efeito da interação droga x região ($F_{(49,6)}=2.6$) e efeito da região ($F_{(49,6)}=46.2$) em relação aos níveis de 5-HT. Elevados níveis de 5-HT foram observados no núcleo DR de animais do grupo Fluoxetina comparado ao Salina (FLx= $1153,5 \pm 125,4$ vs Sal= $819,9 \pm 148,3$, $p < 0.01$). Nos outros núcleos da rafe não houve diferença na concentração de 5-HT entre os grupos (Figura 2A).

Na análise da concentração do metabólito 5-HIAA, a *Anova Two-Way* identificou efeito da interação droga x região ($F_{(49,6)}= 6.3$) e efeito da região de análise ($F_{(49,6)}= 47.4$). O grupo FLx apresentou, quando comparado ao grupo S, maior concentração de 5-HIAA no CLi/Cri (FLx= $17569 \pm 316,3$ vs Sal= $931,1 \pm 98,6$; $p < 0.01$), DR (FLx= $3303,4 \pm 156,7$ vs Sal= $1748,3 \pm 148,3$; $p < 0.001$) e MnR (FLx= $2454,1 \pm 236$ vs Sal= $1561 \pm 158,9$; $p < 0.01$). Não foi observada diferença entre os grupos FLx e S nos outros núcleos da rafe (Figura 2B).

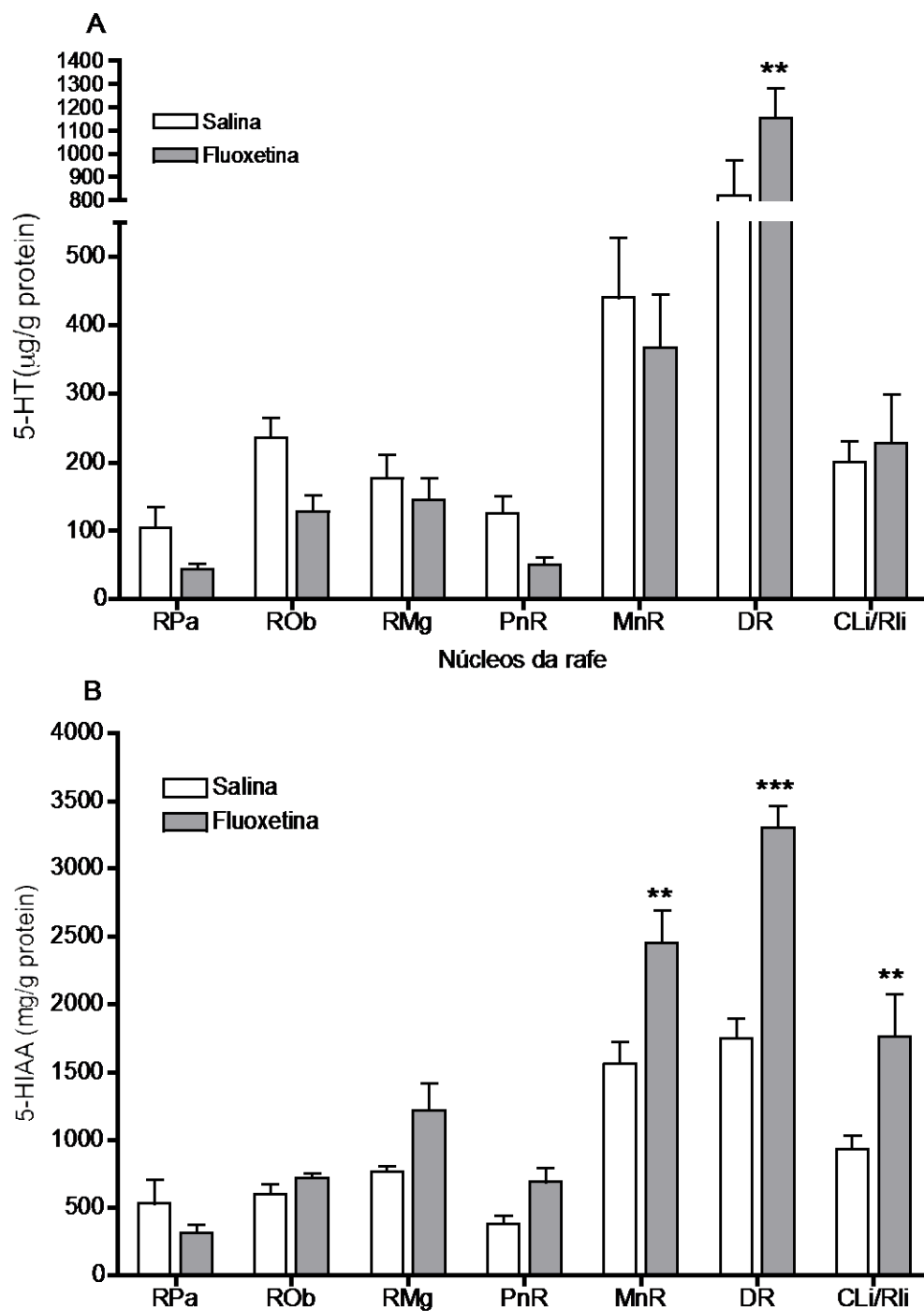


Figura 2- Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina sobre os níveis de 5-HT (A) e 5-HIAA (B) nos núcleos da rafe de ratos. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina (n=10, 10mg/kg p.c, s.c.) ou solução salina (n=10, nacl 0,9%, 1ml/kg p.c, s.c.) do 1º ao 21º dia de vida. Os dados estão representados em média $\pm$ ep. * indica diferença entre os grupos.

Dosagem de serotonina e 5-HIAA em áreas de projeção

Nas áreas de projeção de neurônios serotoninérgicos analisadas no presente estudo, a Anova Two-way identificou efeito da interação droga x região ($F_{(28,3)}=3.8$) e efeito da região ($F_{(28,3)}= 39.9$) em relação aos níveis de 5-HT. O Hipocampo, amígdala e córtex não apresentaram diferença significativa entre os grupos FLx e S. No entanto, no hipotálamo os animais do grupo FLx apresentaram níveis mais baixos de 5-HT quando comparados ao grupo S ($S= 478,5 \pm 71,8$ vs $FLx= 295,9 \pm 40,3$; $p < 0.01$) (Figura 3A).

Na análise da concentração de 5-HIAA nas áreas de projeção a Anova Two-Way identificou efeito da região ($F_{(28,3)}= 26.9$). As concentrações de 5-HIAA foram mais elevadas no Hipotálamo ($FLx= 2031,3 \pm 316,1$ vs $S= 1262,4 \pm 237,7$; $p < 0.05$) e na amígdala ($FLx= 1636,3 \pm 103,7$ vs $S= 890,8 \pm 41,6$, $p < 0.05$). As outras áreas de projeção analisadas não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 3B).

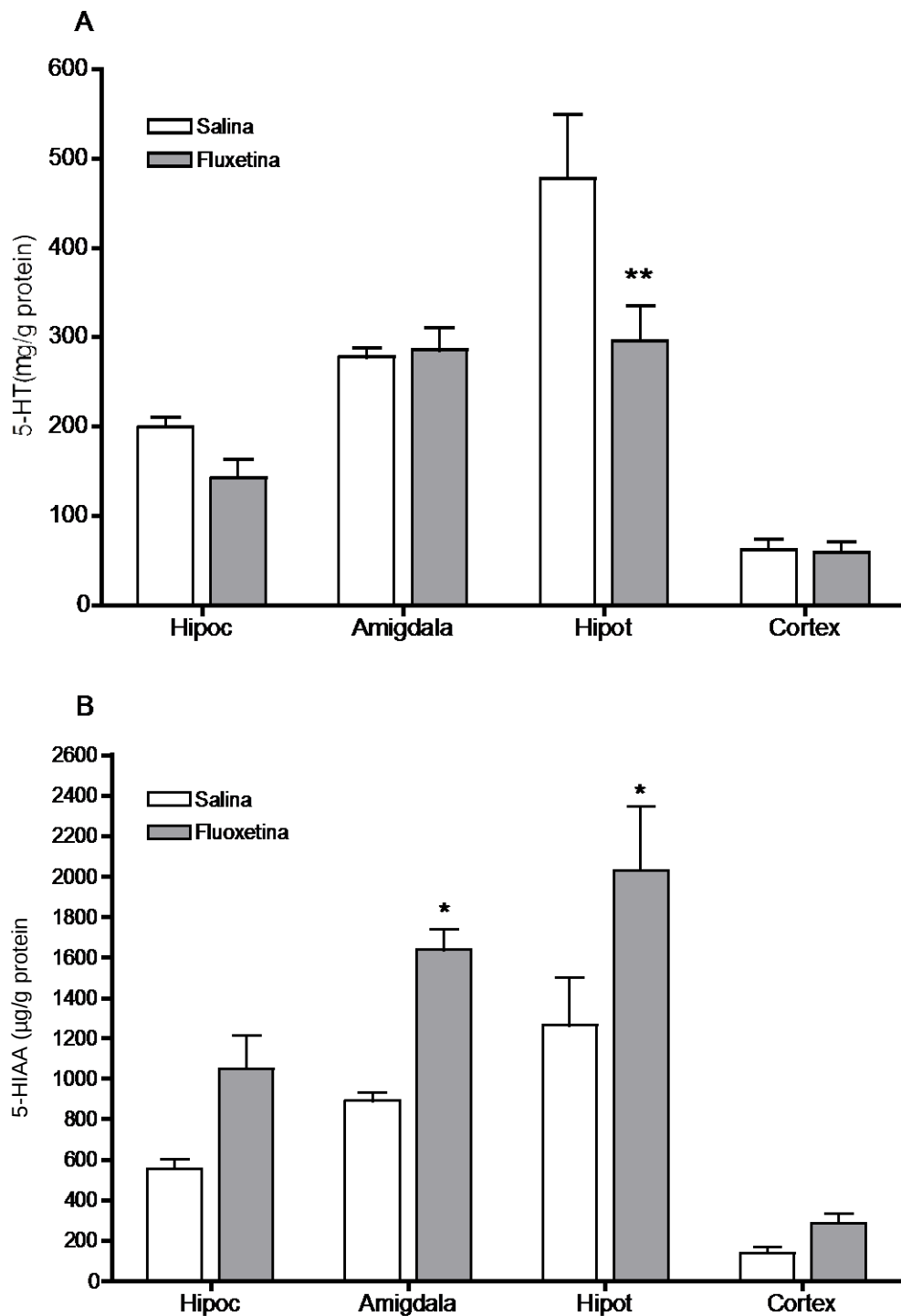


Figura 3- Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina sobre os níveis de 5-HT (A) e 5-HIAA (B) nas áreas de projeção do encéfalo de ratos. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina (n=10, 10mg/kg p.c, s.c.) ou solução salina (n=10, nacl 0,9%, 1ml/kg p.c, s.c.) do 1^o ao 21^o dia de vida. Os dados estão representados em média $\pm$ ep. *** indica diferença entre os grupos.

Taxa de atividade de serotonina (5-HIAA /5- HT) nos núcleos da rafe e em áreas de projeção

Nos núcleos da rafe a Anova Two-way identificou efeito da droga ($F_{(49,6)}=26.5$) e efeito da região ($F_{(49,6)}= 2.8$) em relação a taxa de serotonina (5-HIAA/5-HT). Os núcleos PnR e CLi/RLi da rafe do grupo FLx apresentaram maior taxa em comparação ao grupo S (PnR: S= $3,2 \pm 0,6$ vs FLx= $14,7 \pm 2,6$; $p < 0.001$; CLi/RLi: S= $3,7 \pm 0,3$ vs FLx= $10,8 \pm 4$; $p < 0.05$) (Figura 4A).

Anova Two-way identificou nas áreas de projeção analisadas efeito da droga ($F_{(28,3)}=42.3$) sobre a taxa de serotonina. No hipocampo (S= $2,8 \pm 0,1$ vs FLx= $5,5 \pm 0,7$; $p < 0.05$), hipotálamo (S= $2,7 \pm 0,4$ vs FLx= $7,4 \pm 1,3$; $p < 0.001$), e amígdala (S= $3,2 \pm 0,3$ vs FLx= $6,0 \pm 0,8$; $p < 0.05$) houve maior taxa de serotonina no grupo FLx comparado ao grupo S (Figura 4B).

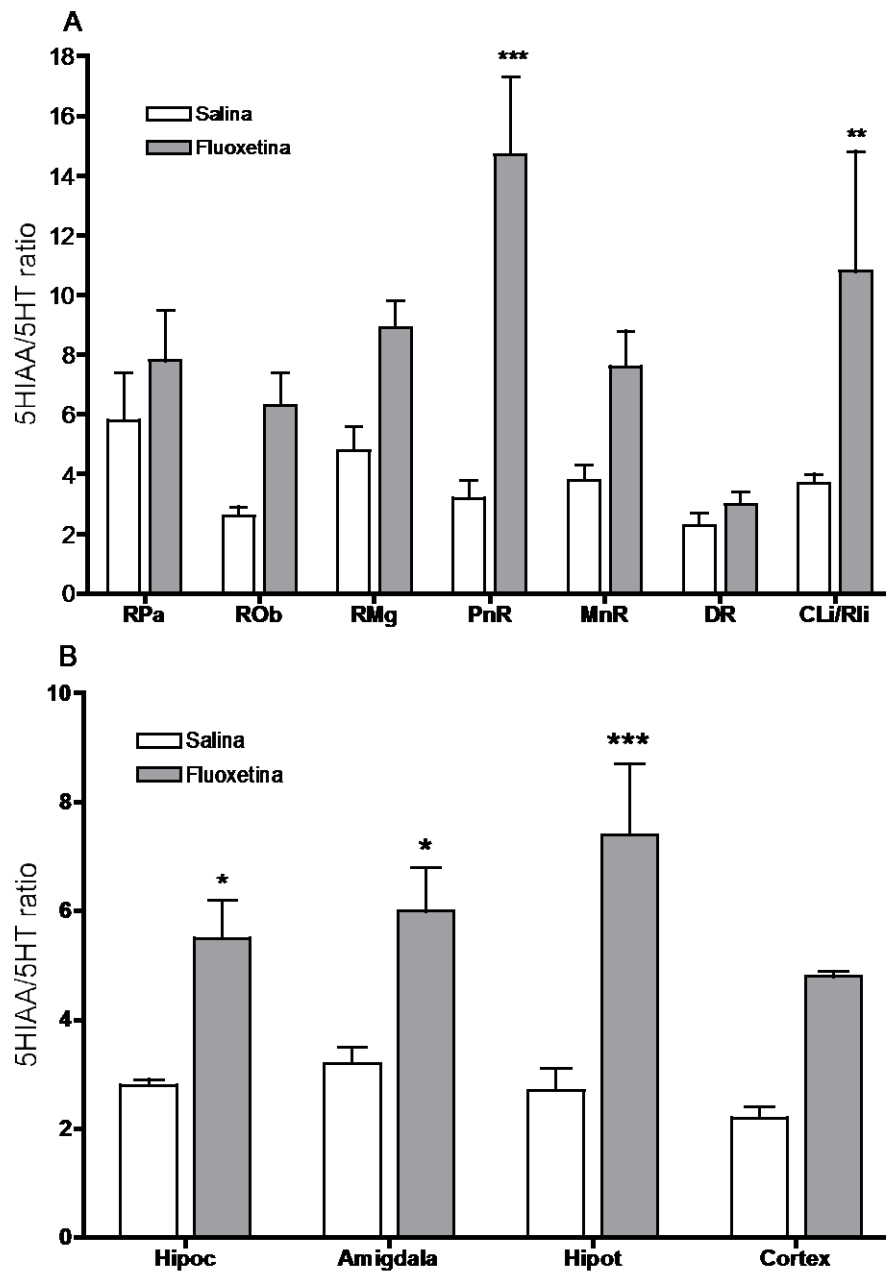


Figura 4- Efeito do tratamento crônico neonatal com fluoxetina sobre a taxa de atividade de serotonina (5-HIAA/5-HT) nos núcleos da rafe e nas áreas de projeção do encéfalo de ratos. Os filhotes receberam diariamente fluoxetina (n=10, 10mg/Kg p.c, s.c.) ou solução salina (n=10, NaCl 0,9%, 1ml/kg p.c, s.c.) do 1º ao 21º dia de vida. Os dados estão representados em média $\pm$ EP. **** Indica diferença entre os grupos.

Discussão

Em resumo, as análises realizadas no presente estudo apontam “ajustes” na concentração de serotonina e seu metabólito 5-HIAA em núcleos da rafe e áreas de projeção após inibição crônica da proteína de recaptação da serotonina durante o período de lactação. Nenhuma influência foi observada sobre o número de neurônios que expressam serotonina nos núcleos da rafe. Após uma semana da última exposição à fluoxetina, foram observados níveis elevados de serotonina apenas no núcleo Dorsal da rafe, por outro lado, níveis reduzidos desse neurotransmissor foram encontrados no hipotálamo. Quando analisamos a concentração do principal metabólito da serotonina, 5HIAA, esse se apresentou em níveis elevados em núcleos da rafe bem como em áreas de projeção como o hipotálamo e a amígdala. A relação entre o 5HIAA e a 5-HT fornece informação da atividade do neurotransmissor, assim, podemos constatar que a exposição à fluoxetina durante o período neonatal induz aumento na atividade serotoninérgica em núcleos rostrais da rafe, bem como hipotálamo, hipocampo e amígdala.

Evidenciamos que a exposição neonatal a fluoxetina não influenciou quantitativamente os neurônios dos núcleos da rafe. Os neurônios serotoninérgicos encontram-se entre a população neuronal que surge mais precocemente no sistema nervoso central, atuando como fator trófico para o desenvolvimento do seu próprio sistema e para outros sistemas de neurotransmissão (azmitia & whitaker- azmitia, 1995). Os neurônios da rafe surgem entre os dias 11º e 12º gestacionais, com maturação se estendendo até o 21º dia pós-natal (Lidov and Molliver, 1982a; Wallace and Lauder, 1983; Lautenschlager, Holtje et al., 2000). Como a serotonina atua como importante fator trófico durante as fases iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso (Turlejski, 1996), se faz conveniente que o aumento de serotonina por inibição de sua recaptação nesse período, proteja a densidade de neurônios que irão produzi-la. Entre os fatores de crescimento que influenciam o desenvolvimento de neurônios serotoninérgicos, está o fator de crescimento astrogliar denominado S100 β (Sodhi and Sanders-Bush, 2004). Esta é uma proteína secretada por astrócitos, encontrada em níveis elevados durante o período de desenvolvimento (Manev and Manev, 2001). Foi observado que o tratamento

crônico com fluoxetina pode induzir a liberação de S100 β (Tramontina, Tramontina et al., 2008) que quando ocorre no hipocampo pode conduzir a maior proliferação celular (Noctor, Flint et al., 2001; Tramontina, Tramontina et al., 2008). Somando-se ao seu papel sobre a neurogênese, a S100 β pode também atuar como fator neuroprotetor por reduzir a taxa de apoptose em neurônios imaturos (Ahlemeyer, Beier et al., 2000). Também se pode ressaltar que o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é regulado por antidepressivos que podem interferir na regulação da neurogênese (Malberg, Eisch et al., 2000). Por outro lado, em estudo sobre a morfologia de neurônios nos núcleos da rafe e hipocampo ratos expostos a fluoxetina neonatal demonstrou redução no número de neurônios serotoninérgicos no núcleo Dorsal da rafe, bem como na densidade de terminais 5-HT no giro dentado do hipocampo após cinco semanas do término do tratamento (Silva, Goncalves et al., 2010). Com o mesmo modelo de exposição neonatal a fluoxetina, o presente estudo não observou alterações no número de neurônios da rafe, porém este foi analisado uma semana após a última injeção do ISRS.

Vários estudos tem demonstrado o papel estimulador da fluoxetina sobre a neurogênese (Malberg, Eisch et al., 2000; Guirado, Varea et al., 2009) porém este efeito parece ser dependente da idade e de experiências neonatais (Navailles, Hof et al., 2008; Guirado, Sanchez-Matarredona et al., 2012). Fluoxetina crônica em camundongos promoveu redução proporcional ao aumento da idade na proliferação e taxa de sobrevivência de novas células e no percentual de células que adquirem o fenótipo neuronal no hipocampo (Couillard-Despres, Wuertinger et al., 2009). O efeito da fluoxetina, na vida adulta, sobre a neurogênese não foi observado em animais submetidos a estresse neonatal (Navailles, Hof et al., 2008). O estresse neonatal promove apoptose no hipocampo (Lee, Kim et al., 2001), no entanto, quando a fluoxetina foi administrada durante o período da separação materna, primeiros 14 dias de vida, induziu aumento na proliferação celular e redução da apoptose (Lee, Kim et al., 2001). Os resultados descritos na literatura indicam papel modulador da inibição do transportador de serotonina sobre projeções neuronais, independente do período após tratamento. Por outro lado, fluoxetina do 0 ao 6 dia de vida reduziu o número de ramificações das aferências tálamo-corticais

para o córtex somatosensorial três semanas após o tratamento (Lee, 2009). Fluoxetina neonatal crônica (P4 a P21), reduziu a densidade de espinhas dendriticas de neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo em camundongos ao 22º dia pós natal, um dia após tratamento (Zheng, Xu et al., 2011). No entanto, na vida adulta (90 dias), dez semanas após o término da aplicação da droga, houve aumento dessa densidade (Zheng, Xu et al., 2011).

Apesar de não alterar o número de neurônios nos núcleos da rafe, a produção e metabolização da serotonina foram afetadas pelo histórico de exposição neonatal à fluoxetina. Tais efeitos sobre os níveis de serotonina e 5-HIAA não foram homogêneos entre as diferentes regiões encefálicas analisadas, indicando vulnerabilidades específicas de áreas mesmo entre os núcleos da rafe. Esse resultado pode estar relacionado às funções de cada região. Embora os neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe tenham características neuroquímicas comuns, são funcionalmente diferentes. A maior parte da serotonina encefálica é produzida pelos núcleos Dorsal e Mediano da rafe (Tork, 1990). Dos núcleos da rafe, o grupamento rostral, que inclui os núcleos DR, MnR e Cli/Rli, parece ser o mais sensível às repercussões da inibição neonatal crônica de recaptação da serotonina. Neurônios do grupamento rostral da rafe se projetam para o telencéfalo se distribuindo por diferentes regiões como hipotálamo, hipocampo, amígdala e córtex, enquanto o grupamento caudal se projeta principalmente para a medula espinal (Tork, 1990).

Os núcleos DR e MnR são regulados de forma independente um do outro (Lowry, 2002). Devido a tais características podem ocorrer respostas específicas de cada região na administração de ISRS, assim, o tratamento com fluoxetina por oito semanas induziu redução do RNAm da enzima limitante de síntese da serotonina, a triptofano hidroxilase, no tronco encefálico, mas promoveu aumento no núcleo Dorsal da rafe (Shishkina, Kalinina et al., 2007). Os níveis de TPH também foram dependentes do tempo de tratamento, assim, duas semanas de injeções de fluoxetina promoveram redução, enquanto oito semanas induziram aumento na expressão do RNAm dessa enzima (Shishkina, Kalinina et al., 2007). A ação da fluoxetina sobre a expressão do SERT foi semelhante entre as regiões do núcleo dorsal e restante do tronco, com

reduzidos níveis após 2, 4 ou 8 semanas de tratamento com fluoxetina (Shishkina, Kalinina et al., 2007). A organização neuronal dentro do próprio núcleo Dorsal da rafe pode exercer papéis distintos em determinadas funções. Assim, a expressão de RNAm da enzima TPH2 na porção rostral dorso medial do núcleo Dorsal da Rafe foi associado ao aumento de ansiedade, enquanto que na porção caudal do núcleo foi associado a redução desse comportamento (Hiroi, McDevitt et al., 2006).

No presente estudo, evidenciamos redução na concentração de serotonina apenas no hipotálamo, mas ao realizar a taxa de atividade, verificamos que é elevada nessa estrutura assim como no hipocampo e amígdala. Vários estudos verificam aumento temporal nos níveis de serotonina extracelular em resposta a ISRS agudo em diferentes regiões, incluindo os núcleos Dorsal e Mediano da rafe, núcleo accumbens, hipocampo e córtex frontal (Gobert, Rivet et al., 1997; Hervas and Artigas, 1998). O tratamento agudo com fluoxetina aumenta a disponibilidade extracelular de 5-HT, por meio da redução do seu catabolismo e, conseqüentemente, diminui as concentrações de 5-HIAA (Berg, Sentir et al., 2013). No entanto, a exposição crônica a ISRS produz redução na função do auto-receptor 5-HT_{1A} na rafe, que por sua vez, proporciona elevação da secreção de 5-HT (Hensler, 2003; Olivier, Valles et al., 2011).

Alguns estudos que analisaram os efeitos da exposição perinatal a agentes agressores, demonstraram modificações dos níveis de serotonina e do 5-HIAA no hipotálamo (Huang, Horiguchi et al. 2012; Maciag, Simpson et al., 2006; Berg, Backstrom et al., 2013). Estresse pré-natal promoveu elevados níveis de serotonina no hipotálamo de ratos, mas não modificou os níveis de 5HIAA (Huang, Horiguchi et al. 2012). Recente estudo analisou em modelo *Xenopus tropicalis* os efeitos da exposição crônica a fluoxetina, durante o desenvolvimento, sobre os níveis de neurotransmissores do cérebro (Berg, Backstrom et al., 2013). Foi verificado nesse estudo um efeito específico sobre o hipotálamo, onde foi observado aumento nos níveis de 5-HIAA nos animais submetidos à fluoxetina (Berg, Backstrom et al., 2013). No presente estudo, além do hipotálamo, nós observamos elevados níveis de 5-HIAA na amígdala, o que pode indicar maior liberação de serotonina nessa região. As projeções

serotoninérgicas para o hipotálamo partem sobretudo dos núcleos Dorsal e Mediano da Rafe, e estão envolvidos no processamento de importantes funções como o controle do comportamento alimentar, do sono, da temperatura corporal, da sede e ritmicidade circadiana. O aumento de atividade da serotonina nessa região pode ser um mecanismo de proteção para execução adequada de tais atividades em animais com histórico neonatal de exposição à ISRS.

A serotonina na amígdala está ligada ao desencadeamento de desordens afetivas como o estresse, a ansiedade (Cecchi, Khoshbouei et al., 2002; Mathew and Ho, 2006) e a depressão (Ressler and Nemeroff, 2000). A maior concentração de 5HIAA bem como da taxa de serotonina na amígdala, ocorreu provavelmente pela importante ação da serotonina nas funções desta estrutura. Grande parte dos processos controlados pela amígdala é direta ou indiretamente definida por atividade monoaminérgica. Os receptores 5-HT_{2C} na amígdala basolateral mediam a ação ansiogênica da fluoxetina (Vicente and Zangrossi, 2012). A amígdala é responsável por transformar as informações provenientes do córtex temporal, do bulbo olfatório, do tálamo e do núcleo do trato solitário, área tegmentar ventral e núcleo accumbens (Rolls, 2006) em estímulos emocionais (prazer) (Kelley and Berridge, 2002). Seu núcleo Lateral (La) e basolateral (BL) possuem inervação serotoninérgica excepcionalmente densa decorrente, principalmente do núcleo dorsal da rafe (BONN, et al., 2013). Essa inervação corrobora a ação de 5-HT na amígdala, uma vez que os neurônios do DR estão implicados na motivação para recompensas, principalmente as atrasadas, participando assim do sistema de recompensa (Miyazaki, et al., 2011).

Exposição a fluoxetina durante a gestação e lactação diminui a resposta da amígdala ao estresse agudo (Francis-Oliveira, Ponte et al.). O tratamento com Fluoxetina durante a adolescência, em ratos (25 aos 46 dias de vida) promoveu ansiedade, acompanhada por aumento do remodelamento sináptico na amígdala (Homberg et al., 2011). Esses resultados não foram observados quando a fluoxetina foi administrada na vida adulta (Homberg et al., 2011). Os efeitos da fluoxetina sobre os níveis de serotonina e seu metabólito, bem como

comportamentos regulados pela serotonina, parecem ser idade dependente (Homberg et al., 2011).

A administração de ISRS durante o período neonatal estimula o comportamento depressivo e a ansiedade (Hansen et al., 1997; Ansorge et al., 2004) enquanto apresenta ação inibitória desses comportamentos na vida adulta (Cryan et al., 2005; Huang et al., 2008). Tem sido sugerida a existência de uma janela de maior vulnerabilidade para alterações nos níveis de serotonina (Upton et al., 2002). Quando a fluoxetina foi administrada durante 21 dias iniciais de vida em ratos, houve redução da síntese de serotonina, observada pelo acúmulo de 5-Hidroxitriptofano (Stenfors and Ross, 2002). Quando analisados em tempos diferentes, após a última injeção do tratamento crônico, foi possível observar modificações oscilatórias na taxa de síntese de serotonina, com níveis semelhantes ao controle no segundo dia, elevados no terceiro e iguais ao controle no oitavo dia (Stenfors and Ross, 2002). Neste mesmo estudo, os autores sugerem que o hipocampo é mais sensível que as outras regiões analisadas. No presente estudo observamos que a fluoxetina neonatal aumentou apenas a taxa de serotonina no hipocampo. Após injeção aguda de fluoxetina (6.9 mg/g) houve diminuição na síntese e turnover de serotonina. Tratamento com fluoxetina durante 21 dias causou redução na taxa de síntese e na razão 5-HIAA /5-HT medida 24 horas após a última injeção (Stenfors and Ross, 2002).

Em um dos poucos estudos que investigaram efeitos da exposição neonatal a fluoxetina sobre a neuroquímica serotoninérgica, Stenfors e Ross (2002) observaram aumento dos níveis de 5-HIAA em várias regiões encefálicas analisadas. Após três dias da última injeção, foi observado aumento na taxa de síntese de serotonina, medido pela concentração de 5-hidroxitriptofano, bem como na razão 5-HIAA/5-HT (Stenfors and Ross, 2002). As regiões analisadas foram hipocampo, hipotálamo e córtex. No oitavo dia após a última injeção não foi observado mais alteração na taxa de síntese, porém o aumento na razão 5-HIAA/5-HT permaneceu (Stenfors and Ross, 2002).

Após liberada na fenda, a serotonina será recaptada, pela proteína SERT para dentro do neurônio e então inserida dentro das vesículas de

armazenamento ou degradada pela enzima Monoaminoxidase em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). A inibição da MAO ou da SERT promove aumento nos níveis de serotonina. Manipulações farmacológicas do SERT durante o período pós-natal produzem comportamentos similares aqueles vistos em camundongos SERT KO. Este fenótipo, que persiste na vida adulta, é descrito como a síndrome da exposição a antidepressivos neonatal (Maciag et al., 2006). Camundongos Knockout para MAO apresentam interrupção da organização cortical, diminuindo ramificações terminais (Rebsam, Seif et al., 2002). Em camundongos knockout para o SERT a concentração extracelular de serotonina aumenta aproximadamente 4 vezes (Mathews et al., 2004) enquanto seus níveis intracelulares diminuem em 50% (Kim et al., 2003). SERT KO apresentam aumento de comportamento agressivo, ansiedade e sensibilidade ao estresse (Holmes, Yang et al., 2003). Sugere-se que o fenótipo comportamental do SERT KO seja devido à ativação excessiva do receptor 5-HT_{1A}. Quando há o bloqueio farmacológico do receptor 5-HT_{1A} durante o desenvolvimento em animais SERT KO, as características comportamentais normais, como o padrão de sono e a depressão, são retomadas (Alexandre, Popa et al., 2006).

Ratos tratados com fluoxetina durante o período neonatal apresentam aumento de ansiedade e prejuízo do processamento de informações sensoriais (Ansorge et al., 2004). Este fenótipo tem sido observado em tratamentos similares (Hansen, Sanchez et al., 1997; Hansen and Mikkelsen, 1998; Maciag, Simpson et al., 2006). ISRS neonatal promove redução permanente na enzima triptofano hidroxilase (TPH) nos núcleos dorsal e mediano da rafe e na expressão do SERT no córtex pré-frontal e somato-sensorial (Maciag, Simpson et al., 2006). Nenhuma dessas alterações foi observada quando o tratamento ocorreu na idade adulta, isso reforça a existência de um período crítico de vulnerabilidade a exposição da serotonina.

Conclusão

Este é o primeiro trabalho que descreve o efeito da manipulação farmacológica precoce sobre o sistema serotoninérgico, especialmente sobre o número de neurônios da rafe e concentração de 5-HT e seu metabólito 5-HIAA,

de ratos após uma semana de tratamento neonatal crônico. Os núcleos rostrais da rafe, bem como hipotálamo, amígdala e hipocampo foram as estruturas mais sensíveis a exposição neonatal, apresentando elevados níveis de atividade serotoninérgica.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inibição seletiva da recaptação da serotonina durante período de lactação não alterou o número de neurônios serotoninérgicos da rafe, mas promoveu aumento nos níveis de atividade serotoninérgica em núcleos rostrais da rafe e em algumas áreas de projeção, como a amígdala, o hipocampo e o hipotálamo.

Como perspectiva, pretendemos analisar a curva de metabolismo de 5-HT nos diferentes momentos, considerando dessa forma os picos de expressão de serotonina.

9. REFERÊNCIAS

- Ahlemeyer, B., H. Beier, et al. (2000). "S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5-HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702." Brain Res **858**(1): 121-8.
- Alexandre, C., D. Popa, et al. (2006). "Early life blockade of 5-hydroxytryptamine 1A receptors normalizes sleep and depression-like behavior in adult knock-out mice lacking the serotonin transporter." J Neurosci **26**(20): 5554-64.
- Ansorge, M. S., M. Zhou, et al. (2004). "Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice." Science **306**(5697): 879-81.
- Azmitia, E. and P. Whitaker-Azmitia (1997). "Handbook Of Experimental Pharmacology: Serotonergic Neurons and 5-HT Receptors in the CNS. In Baumgarten HG, Gothert M. editors. Development and Neuroplasticity of Central Serotonergic Neurons." 1-39.
- Azmitia, E. C. (1999). "Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue." Neuropsychopharmacology **21**(2 Suppl): 33S-45S.
- Azmitia, E. C. and P. J. Gannon (1986). "The primate serotonergic system: a review of human and animal studies and a report on *Macaca fascicularis*." Adv Neurol **43**: 407-68.
- Azmitia, E. C., V. J. Rubinstein, et al. (1995). "5-HT_{1A} agonist and dexamethasone reversal of para-chloroamphetamine induced loss of MAP-2 and synaptophysin immunoreactivity in adult rat brain." Brain Res **677**(2): 181-92.
- Azmitia, E. C. and M. Segal (1978). "An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat." J Comp Neurol **179**(3): 641-67.
- Barker, D. J. (1995). "Intrauterine programming of adult disease." Mol Med Today **1**(9): 418-23.

- Bellinger, L., D. V. Sculley, et al. (2006). "Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats." Int J Obes (Lond) **30**(5): 729-38.
- Bennett, D. S. and N. J. Giarman (1965). "Schedule of appearance of 5-hydroxy-tryptamine (serotonin) and associated enzymes in the developing rat brain." J Neurochem **12**(11): 911-8.
- Berg, C., T. Backstrom, et al. (2013). "Developmental exposure to fluoxetine modulates the serotonin system in hypothalamus." PLoS One **8**(1): e55053.
- Berg, S. A., A. M. Sentir, et al. (2013). "Nicotine is more addictive, not more cognitively therapeutic in a neurodevelopmental model of schizophrenia produced by neonatal ventral hippocampal lesions." Addict Biol.
- Bockaert, J., S. Claeysen, et al. (2006). "Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation." Cell Tissue Res **326**(2): 553-72.
- Bonnin, A., N. Goeden, et al. (2011). "A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain." Nature **472**(7343): 347-50.
- Borue, X., J. Chen, et al. (2007). "Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies." Int J Dev Neurosci **25**(6): 341-7.
- Brodal, E. and F. Walberg (1960). "The nucleo f brain stem in the cat. II Efferent connections." J. Comp. Neurol **114**: 239-259.
- Calizo (2011). "Rafe neurônios de serotonina não são homogêneas: eletrofisiológica, evidências morfológicas e neuroquímicas." Neurofarmacologia **61**(3): 524-543.
- Cases, O., T. Vitalis, et al. (1996). "Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period." Neuron **16**(2): 297-307.
- Casper, R. C., B. E. Fleisher, et al. (2003). "Follow-up of children of depressed mothers exposed or not exposed to antidepressant drugs during pregnancy." J Pediatr **142**(4): 402-8.
- Cavalcante, J. S., A. S. Alves, et al. (2002). "Differential distribution of afferents containing serotonin and neuropeptide Y within the marmoset suprachiasmatic nucleus." Brain Res **927**(2): 200-3.

- Cecchi, M., H. Khoshbouei, et al. (2002). "Modulatory effects of norepinephrine, acting on alpha 1 receptors in the central nucleus of the amygdala, on behavioral and neuroendocrine responses to acute immobilization stress." Neuropharmacology **43**(7): 1139-47.
- Chambers, C. D., K. A. Johnson, et al. (1996). "Birth outcomes in pregnant women taking fluoxetine." N Engl J Med **335**(14): 1010-5.
- Charara, A. and A. Parent (1998). "Chemoarchitecture of the primate dorsal raphe nucleus." J Chem Neuroanat **15**(2): 111-27.
- Chocyk, A., D. Dudys, et al. (2010). "Impact of maternal separation on neural cell adhesion molecules expression in dopaminergic brain regions of juvenile, adolescent and adult rats." Pharmacol Rep **62**(6): 1218-24.
- Christensen, H. N., L. M. Albritton, et al. (1994). "Gene-product designations for amino acid transporters." J Exp Biol **196**: 51-7.
- Chubakov, A. R., E. A. Gromova, et al. (1986). "The effects of serotonin on the morpho-functional development of rat cerebral neocortex in tissue culture." Brain Res **369**(1-2): 285-97.
- Costei, A. M., E. Kozer, et al. (2002). "Perinatal outcome following third trimester exposure to paroxetine." Arch Pediatr Adolesc Med **156**(11): 1129-32.
- Couillard-Despres, S., C. Wuertinger, et al. (2009). "Ageing abolishes the effects of fluoxetine on neurogenesis." Mol Psychiatry **14**(9): 856-64.
- Curzon, G., J. Friedel, et al. (1973). "The effect of fatty acids on the binding of tryptophan to plasma protein." Nature **242**(5394): 198-200.
- Dahlstroem, A. and K. Fuxe (1964). "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 Physiol Scand Suppl: SUPPL 232:1-55.
- de-Castro, R. M., J. E. Cabral-Filho, et al. (1993). "Neonatal treatment with naloxone causes permanent hyperalgesia in rats." Braz J Med Biol Res **26**(7): 747-51.
- Dooley, A. E., I. S. Pappas, et al. (1997). "Serotonin promotes the survival of cortical glutamatergic neurons in vitro." Exp Neurol **148**(1): 205-14.

- Erickson, J. D., M. K. Schafer, et al. (1996). "Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 5166-71.
- Fidalgo, S., D. K. Ivanov, et al. (2012). "Serotonin: from top to bottom." Biogerontology **14**(1): 21-45.
- Fox, S. R. and E. S. Deneris (2012). "Engrailed is required in maturing serotonin neurons to regulate the cytoarchitecture and survival of the dorsal raphe nucleus." J Neurosci **32**(23): 7832-42.
- Francis-Oliveira, J., B. Ponte, et al. "Fluoxetine exposure during pregnancy and lactation: Effects on acute stress response and behavior in the novelty-suppressed feeding are age and gender-dependent in rats." Behav Brain Res **252**: 195-203.
- Fuller, R. W. (1994). "Uptake inhibitors increase extracellular serotonin concentration measured by brain microdialysis." Life Sci **55**(3): 163-7.
- Fuller, R. W. (1996). "Fluoxetine effects on serotonin function and aggressive behavior." Ann N Y Acad Sci **794**: 90-7.
- Fuller, R. W. and D. T. Wong (1990). "Serotonin uptake and serotonin uptake inhibition." Ann N Y Acad Sci **600**: 68-78; discussion 79-80.
- Gaspar, P., O. Cases, et al. (2003). "The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics." Nat Rev Neurosci **4**(12): 1002-12.
- Gibbons, R. D., C. H. Brown, et al. (2007). "Early evidence on the effects of regulators' suicidality warnings on SSRI prescriptions and suicide in children and adolescents." Am J Psychiatry **164**(9): 1356-63.
- Gluckman, P. D. and M. A. Hanson (2004). "The developmental origins of the metabolic syndrome." Trends Endocrinol Metab **15**(4): 183-7.
- Gluckman, P. D., M. A. Hanson, et al. (2008). "Predictive adaptive responses in perspective." Trends Endocrinol Metab **19**(4): 109-10; author reply 112.
- Gobert, A., J. M. Rivet, et al. (1997). "Potentiation of the fluoxetine-induced increase in dialysate levels of serotonin (5-HT) in the frontal cortex of freely moving rats by combined blockade of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors with WAY 100,635 and GR 127,935." J Neurochem **68**(3): 1159-63.

- Guirado, R., D. Sanchez-Matarredona, et al. (2012). "Chronic fluoxetine treatment in middle-aged rats induces changes in the expression of plasticity-related molecules and in neurogenesis." BMC Neurosci **13**: 5.
- Guirado, R., E. Varea, et al. (2009). "Effects of chronic fluoxetine treatment on the rat somatosensory cortex: activation and induction of neuronal structural plasticity." Neurosci Lett **457**(1): 12-5.
- Gur, E., M. E. Newman, et al. (2003). "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." Nutr Neurosci **6**(3): 169-75.
- Hamon, M. and S. Bourgoin (1979). "Ontogenesis of tryptophan transport in the rat brain." J Neural Transm Suppl(15): 93-105.
- Hansen, H. H. and J. D. Mikkelsen (1998). "Long-term effects on serotonin transporter mRNA expression of chronic neonatal exposure to a serotonin reuptake inhibitor." Eur J Pharmacol **352**(2-3): 307-15.
- Hansen, H. H., C. Sanchez, et al. (1997). "Neonatal administration of the selective serotonin reuptake inhibitor Lu 10-134-C increases forced swimming-induced immobility in adult rats: a putative animal model of depression?" J Pharmacol Exp Ther **283**(3): 1333-41.
- Harding, A., G. Paxinos, et al. (2004). "The serotonin and tachykinin system, in: Paxinos, G. (Ed.), The rat nervous system." 1205-1256.
- Heisler, L. K., E. E. Jobst, et al. (2006). "Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake." Neuron **51**(2): 239-49.
- Hensler, J. G. (2003). "Regulation of 5-HT_{1A} receptor function in brain following agonist or antidepressant administration." Life Sci **72**(15): 1665-82.
- Hervas, I. and F. Artigas (1998). "Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors." Eur J Pharmacol **358**(1): 9-18.
- Hery, F., P. Boulenguez, et al. (1999). "Identification and role of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in primary cultures of rat embryonic rostral raphe nucleus neurons." J Neurochem **72**(5): 1791-801.

- Hewitt, K. N., M. D. Lee, et al. (2002). "Serotonin 2C receptor agonists and the behavioural satiety sequence in mice." Pharmacol Biochem Behav **71**(4): 691-700.
- Hiemke, C. and S. Hartter (2000). "Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors." Pharmacol Ther **85**(1): 11-28.
- Hilakivi, L. A., J. D. Sinclair, et al. (1984). "Effects of neonatal treatment with clomipramine on adult ethanol related behavior in the rat." Brain Res **317**(1): 129-32.
- Hiroi, R., R. A. McDevitt, et al. (2006). "Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: association between gene expression and anxiety behavior in the open field." Biol Psychiatry **60**(3): 288-95.
- Holmes, A., R. J. Yang, et al. (2003). "Mice lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT(1A) receptor-mediated abnormalities in tests for anxiety-like behavior." Neuropsychopharmacology **28**(12): 2077-88.
- Homberg, J. R., J. D. Olivier, et al. (2011). "Fluoxetine exerts age-dependent effects on behavior and amygdala neuroplasticity in the rat." PLoS One **6**(1): e16646.
- Houpt, K. A. and A. N. Epstein (1973). "Ontogeny of controls of food intake in the rat: GI fill and glucoprivation." Am J Physiol **225**(1): 58-66.
- Hoyer, D., D. E. Clarke, et al. (1994). "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)." Pharmacol Rev **46**(2): 157-203.
- Huang, M., M. Horiguchi, et al. (2012) "5-HT1A and 5-HT7 receptors contribute to lurasidone-induced dopamine efflux." Neuroreport **23**(7): 436-40.
- Jacobs, B. L. and E. C. Azmitia (1992). "Structure and function of the brain serotonin system." Physiol Rev **72**(1): 165-229.
- Jacobs, B. L. and C. A. Fornal (1999). "Activity of serotonergic neurons in behaving animals." Neuropsychopharmacology **21**(2 Suppl): 9S-15S.
- Jiang, Z. G., K. Teshima, et al. (2000). "Pre- and postsynaptic actions of serotonin on rat suprachiasmatic nucleus neurons." Brain Res **866**(1-2): 247-56.

- Kallen, B. and P. Otterblad Olausson (2006). "Antidepressant drugs during pregnancy and infant congenital heart defect." Reprod Toxicol **21**(3): 221-2.
- Kelley, A. E. and K. C. Berridge (2002). "The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs." J Neurosci **22**(9): 3306-11.
- Kippin, T. E., K. K. Szumlanski, et al. (2008). "Prenatal stress enhances responsiveness to cocaine." Neuropsychopharmacology **33**(4): 769-82.
- Kobayashi, K., Y. Ikeda, et al. (2010). "Reversal of hippocampal neuronal maturation by serotonergic antidepressants." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(18): 8434-9.
- Kobayashi, K., Y. Ikeda, et al. (2011). "Behavioral destabilization induced by the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine." Mol Brain **4**: 12.
- Kodish, I., C. Rockhill, et al. (2011). "Pharmacotherapy for anxiety disorders in children and adolescents." Dialogues Clin Neurosci **13**(4): 439-52.
- Laine, K., T. Heikkinen, et al. (2003). "Effects of exposure to selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy on serotonergic symptoms in newborns and cord blood monoamine and prolactin concentrations." Arch Gen Psychiatry **60**(7): 720-6.
- Lam, D. D. and L. K. Heisler (2007). "Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes." Expert Rev Mol Med **9**(5): 1-24.
- Lattimore, K. A., S. M. Donn, et al. (2005). "Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) use during pregnancy and effects on the fetus and newborn: a meta-analysis." J Perinatol **25**(9): 595-604.
- Lauder, J. M. and F. E. Bloom (1974). "Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation." J Comp Neurol **155**(4): 469-81.
- Lautenschlager, M., M. Holtje, et al. (2000). "Serotonin uptake and release mechanisms in developing cultures of rat embryonic raphe neurons: age- and region-specific differences." Neuroscience **99**(3): 519-27.
- Lavdas, A. A., M. E. Blue, et al. (1997). "Serotonin promotes the differentiation of glutamate neurons in organotypic slice cultures of the developing cerebral cortex." J Neurosci **17**(20): 7872-80.

- Lebrand, C., O. Cases, et al. (1996). "Transient uptake and storage of serotonin in developing thalamic neurons." Neuron **17**(5): 823-35.
- Lee, H. J., J. W. Kim, et al. (2001). "Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats." Mol Psychiatry **6**(6): 610, 725-8.
- Lee, L. J. (2009). "Neonatal fluoxetine exposure affects the neuronal structure in the somatosensory cortex and somatosensory-related behaviors in adolescent rats." Neurotox Res **15**(3): 212-23.
- Leonard, B. E. (1996). "Serotonin receptors and their function in sleep, anxiety disorders and depression." Psychother Psychosom **65**(2): 66-75.
- Lesch, K. P. and R. Mossner (1998). "Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders?" Biol Psychiatry **44**(3): 179-92.
- Lesch, K. P. and J. Waider (2012). "Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders." Neuron **76**(1): 175-91.
- Lidov, H. G. and M. E. Molliver (1982). "An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields." Brain Res Bull **8**(4): 389-430.
- Lidov, H. G. and M. E. Molliver (1982a). "Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS." Brain Res Bull **9**(1-6): 559-604.
- Lidov, H. G. and M. E. Molliver (1982b). "An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields." Brain Res Bull **8**(4): 389-430.
- Lira, A., M. Zhou, et al. (2003). "Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice." Biol Psychiatry **54**(10): 960-71.
- Lopes de Souza, S., R. Orozco-Solis, et al. (2008). "Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake." Eur J Neurosci **27**(6): 1400-8.

- Lowry, C. A. (2002). "Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." J Neuroendocrinol **14**(11): 911-23.
- Maciag, D., K. L. Simpson, et al. (2006). "Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry." Neuropsychopharmacology **31**(1): 47-57.
- Malagie, I., A. C. Trillat, et al. (1995). "Effects of acute fluoxetine on extracellular serotonin levels in the raphe: an in vivo microdialysis study." Eur J Pharmacol **286**(2): 213-7.
- Malberg, J. E., A. J. Eisch, et al. (2000). "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus." J Neurosci **20**(24): 9104-10.
- Manev, H. and R. Manev (2001). "S100B: an old neurotrophic factor with putative new roles in psychiatric illnesses." J Psychiatr Res **35**(6): 347-50.
- Manhaes de Castro, R., J. M. Barreto Medeiros, et al. (2001). "Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor." Braz J Med Biol Res **34**(1): 121-4.
- Marlatt, M. W., P. J. Lucassen, et al. (2010). "Comparison of neurogenic effects of fluoxetine, duloxetine and running in mice." Brain Res **1341**: 93-9.
- Mathew, S. J. and S. Ho (2006). "Etiology and neurobiology of social anxiety disorder." J Clin Psychiatry **67 Suppl 12**: 9-13.
- Matsuo, H., S. Tsukada, et al. (2000). "Expression of a system L neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier." Neuroreport **11**(16): 3507-11.
- Mccance, R. and E. Widdowson (1974). "The determinants of growth and form." Proc R Soc Lond B BiolSci, **185**(78): 1-17.
- McNamara, R. K. and R. W. Skelton (1993). "The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze." Brain Res Brain Res Rev **18**(1): 33-49.
- Meister, B. (2007). "Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight." Physiol Behav **92**(1-2): 263-71.

- Morgane, P. J., D. J. Mokler, et al. (2002). "Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation." Neurosci Biobehav Rev **26**(4): 471-83.
- Morin, L. P. (1999). "Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity." Ann Med **31**(1): 12-33.
- Moses-Kolko, E. L., D. Bogen, et al. (2005). "Neonatal signs after late in utero exposure to serotonin reuptake inhibitors: literature review and implications for clinical applications." JAMA **293**(19): 2372-83.
- Navailles, S., P. R. Hof, et al. (2008). "Antidepressant drug-induced stimulation of mouse hippocampal neurogenesis is age-dependent and altered by early life stress." J Comp Neurol **509**(4): 372-81.
- Noctor, S. C., A. C. Flint, et al. (2001). "Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex." Nature **409**(6821): 714-20.
- Noorlander, C. W., F. F. Ververs, et al. (2008). "Modulation of serotonin transporter function during fetal development causes dilated heart cardiomyopathy and lifelong behavioral abnormalities." PLoS One **3**(7): e2782.
- Olivier, J. D., A. Valles, et al. (2011). "Fluoxetine administration to pregnant rats increases anxiety-related behavior in the offspring." Psychopharmacology (Berl) **217**(3): 419-32.
- Pardridge, W. M. and G. Fierer (1990). "Transport of tryptophan into brain from the circulating, albumin-bound pool in rats and in rabbits." J Neurochem **54**(3): 971-6.
- Park, S., J. A. Harrold, et al. (1999). "Increased binding at 5-HT(1A), 5-HT(1B), and 5-HT(2A) receptors and 5-HT transporters in diet-induced obese rats." Brain Res **847**(1): 90-7.
- Ramon and Cajal (1911). "Histologie Du systeme nerveux de l'homme et des vertebres II." Malone, Paris.
- Randy, A. and L. Sansone (2012). "SSRIs: bad to the bone?" Innov Clin Neurosci **9**(7-8): 42-7.
- Randy, A. and L. Sansone (2012). "SSRIs: Bad to the Bone? ." Innov Clin Neurosci **9**(7-8): 42-47.

- Rapport, M., A. Freen, et al. (1948(b)). "Crystalline serotonin." Science **108**(329-330).
- Rapport, M., A. Green, et al. (1948(a)). "Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum." J Biol Chem **174**: 735-738.
- Rebsam, A., I. Seif, et al. (2002). "Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase a knock-out mice." J Neurosci **22**(19): 8541-52.
- Ressler, K. J. and C. B. Nemeroff (2000). "Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders." Depress Anxiety **12 Suppl 1**: 2-19.
- Rice, D. and S. Barone, Jr. (2000). "Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models." Environ Health Perspect **108 Suppl 3**: 511-33.
- Riddle, M. A., E. A. Reeve, et al. (2001). "Fluvoxamine for children and adolescents with obsessive-compulsive disorder: a randomized, controlled, multicenter trial." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **40**(2): 222-9.
- Rolls, E. T. (2006). "Brain mechanisms underlying flavour and appetite." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1471): 1123-36.
- Ruddick, J. P., A. K. Evans, et al. (2006). "Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications." Expert Rev Mol Med **8**(20): 1-27.
- Sanchez, S., C. Sanchez, et al. (2008). "Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of rats." Mol Cell Biochem **317**(1-2): 105-11.
- Santarelli, L., M. Saxe, et al. (2003). "Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants." Science **301**(5634): 805-9.
- Sanz, E. J., C. De-las-Cuevas, et al. (2005). "Selective serotonin reuptake inhibitors in pregnant women and neonatal withdrawal syndrome: a database analysis." Lancet **365**(9458): 482-7.

- Shishkina, G. T., T. S. Kalinina, et al. (2007). "Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect." Neuroscience **150**(2): 404-12.
- Siegel, A. and J. Douard (2011). "Who's flying the plane: serotonin levels, aggression and free will." Int J Law Psychiatry **34**(1): 20-9.
- Silva, M. d., L. Goncalves, et al. (2010). "Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats." Neurosci Lett **483**(3): 179-83.
- Silveira, P., AK Portella, et al. (2008). "Both infantile stimulation and exposure to sweet food lead to an increased sweet food ingestion in adult life." Physiol Behav **18**(4-5): 877-82.
- Simansky, K. J. and D. M. Nicklous (2002). "Parabrachial infusion of D-fenfluramine reduces food intake. Blockade by the 5-HT(1B) antagonist SB-216641." Pharmacol Biochem Behav **71**(4): 681-90.
- Smit-Rigter, L. A., C. W. Noorlander, et al. (2012). "Prenatal fluoxetine exposure induces life-long serotonin 5-HT(3) receptor-dependent cortical abnormalities and anxiety-like behaviour." Neuropharmacology **62**(2): 865-70.
- Smith, Q. R., S. Momma, et al. (1987). "Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier." J Neurochem **49**(5): 1651-8.
- Soares, J. G., J. R. Cavalcanti, et al. (2012). "Nuclear organization of the serotonergic system in the brain of the rock cavy (*Kerodon rupestris*)." J Chem Neuroanat **43**(2): 112-9.
- Sodhi, M. S. and E. Sanders-Bush (2004). "Serotonin and brain development." Int Rev Neurobiol **59**: 111-74.
- Steinbusch, H. (1981). "Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell and terminals." Neuroscience **557-618**.
- Stenfors, C. and S. B. Ross (2002). "Evidence for involvement of 5-hydroxytryptamine(1B) autoreceptors in the enhancement of serotonin turnover in the mouse brain following repeated treatment with fluoxetine." Life Sci **71**(24): 2867-2880.
- Swanson, J. M., S. Entringer, et al. (2009). "Developmental origins of health and disease: environmental exposures." Semin Reprod Med **27**(5): 391-402.

- Taber, E., A. Brodal, et al. (1960). "The raphe nucleus of the brain stem in the cat. I. Normal topography and cytoarchitecture and general discussion." J. Comp. Neurol **114**(161-167).
- Thase, M. E. (2000). "Treatment issues related to sleep and depression." J Clin Psychiatry **61 Suppl 11**: 46-50.
- Tohda, M., M. Nomura, et al. (2006). "Molecular pathopharmacology of 5-HT_{2C} receptors and the RNA editing in the brain." J Pharmacol Sci **100**(5): 427-32.
- Tork, I. (1985). "Raphe nuclei and serotonin containing systems. In: PAXINOS, G. (Ed.). The Rat Nervous System." Academic Press: 43-78.
- Tork, I. (1990). "Anatomy of the serotonergic system." Ann N Y Acad Sci **600**: 9-34; discussion 34-5.
- Tramontina, A. C., F. Tramontina, et al. (2008). "Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **32**(6): 1580-3.
- Turlejski, K. (1996). "Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development." Acta Neurobiol Exp **56**: 619.
- Ugrumov, M. V., J. Taxi, et al. (1989). "On the distribution and morpho-functional characteristics of 5-HT-immunoreactive cells in the hypothalamus of fetuses and neonatal rats." Brain Res Dev Brain Res **46**(2): 233-41.
- Usala, T., A. Clavenna, et al. (2008). "Randomised controlled trials of selective serotonin reuptake inhibitors in treating depression in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis." Eur Neuropsychopharmacol **18**(1): 62-73.
- Vertes, R. P. (1991). "A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat." J Comp Neurol **313**(4): 643-68.
- Vetencourt, M., A. Sale, et al. (2008). "The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex." Science **320**(5874): 385-8.
- Vicente, M. A. and H. Zangrossi, Jr. (2012). "Involvement of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the

- anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment." Neuropharmacology **79C**: 127-135.
- Vollmayr, B., S. Keck, et al. (2000). "Acute stress decreases serotonin transporter mRNA in the raphe pontis but not in other raphe nuclei of the rat." Neurosci Lett **290**(2): 109-12.
- Wade, P. R., J. Chen, et al. (1996). "Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract." J Neurosci **16**(7): 2352-64.
- Wallace, J. and J. Lauder (1983). "Development of the serotonergic system in the rat embryo immunocytochemical study." Brain Res. Bull **459-479**.
- Wallace, J. A. and J. M. Lauder (1983). "Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study." Brain Res Bull **10**(4): 459-79.
- Wang, J. W., D. J. David, et al. (2008). "Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells." J Neurosci **28**(6): 1374-84.
- West-Eberhard, M. (1989). "Phenotypic plasticity and the origins of diversity." Annual Review of Ecology and Systematics **20**: 249-278.
- Whitaker-Azmitia, P. M. (2001). "Serotonin and brain development: role in human developmental diseases." Brain Res Bull **56**(5): 479-85.
- Xu, Y., Y. Sari, et al. (2004). "Selective serotonin reuptake inhibitor disrupts organization of thalamocortical somatosensory barrels during development." Brain Res Dev Brain Res **150**(2): 151-61.
- Young-Davies, C. L., C. A. Bennett-Clarke, et al. (2000). "Selective facilitation of the serotonin(1B) receptor causes disorganization of thalamic afferents and barrels in somatosensory cortex of rat." J Comp Neurol **425**(1): 130-8.
- Zheng, J., D. F. Xu, et al. (2011). "Neonatal exposure to fluoxetine and fluvoxamine alters spine density in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons." Int J Clin Exp Pathol **4**(2): 162-8.
- Zippel, U., E. Heidel, et al. (2001). "Action of CCK and 5-HT on lateral hypothalamic neurons depends on early postnatal nutrition." Nutr Neurosci **4**(2): 143-52.