

RENATA CRISTINNY DE FARIAS CAMPINA

DISTRIBUIÇÃO E ANÁLISE QUANTITATIVA DE NEURÔNIOS IMUNOREATIVOS À
ENZIMA TRIPTOFANO HIDROXILASE EM NÚCLEOS DA RAFE DE RATOS
DESNUTRIDOS DURANTE A VIDA PERINATAL

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Patologia do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco (UFPE), para
obtenção do título de Mestre em
Patologia.

ORIENTADORA: Prof^a. DR^a. Carol Virgínia Góis Leandro

CO-ORIENTADORA: Prof^a. DR^a. Sandra Lopes de Souza

RECIFE

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE- REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Hilton Justino da Silva

RECIFE

2009



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmap.ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



AUTOR: RENATA CRISTINNY DE FARIAS CAMPINA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MORFOLOGIA APLICADA

NOME DA DISSERTAÇÃO: "DISTRIBUIÇÃO E ANÁLISE QUANTITATIVA DE NEURÔNIOS IMUNOREATIVOS À ENZIMA TRIPTOFANO HIDROXILASE EM NÚCLEOS DA RAFE DE RATOS DESNUTRIDOS DURANTE A VIDA PERINATAL".

ORIENTADORA: PROFA. CAROL VIRGINIA GOES LEANDRO

CO-ORIENTADOR: PROFA. SANDRA LOPES DE SOUZA

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

DATA: 04 DE JUNHO DE 2009.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. ADELMAR AFONSO AMORIM JUNIOR

Prof. RAUL MANHÃES DE CASTRO

Prof. FRANCISCO BOLAÑOS-JIMÉNES

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS

Essa é mais uma conquista dedicada à vocês, de muitas outras que com certeza virão. Minha fortaleza e inspiradora, de quem a cada dia me orgulho de ser filha e tento retribuir com o melhor que consigo. Vocês foram minha primeira escola, onde me ensinaram o que é ser honesto e ter caráter. Apesar de tanta saudade que a distância tem nos causado, aí está mais uma prova que valeu a pena.

Amo muito vocês, e saibam que grande parte desse mérito são de vocês, que tanto me dão força e acreditam no meu potencial.

Obrigado pai e mãe, por tudo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, por sempre colocar no meu caminho pessoas estrelas e não cometas. Como diz o poeta os cometas passam, as estrelas permanecem, estão presentes, são amizade, luz, vida. Podem passar os anos, podem surgir distâncias, mas ficará a marca no coração.

SANDRA LOPES DE SOUZA

Faz pouco tempo que estamos trabalhando juntas, mas tempo suficiente para perceber que o presente que Deus me deu, é de um valor incalculável. Você é uma das pouquíssimas pessoas que sabe o valor do SER HUMANO, e tenta, aos poucos deixar sua mensagem, sua marca. E deixa! Muito obrigado por fazer parte de realizações tão importantes na minha vida, sempre acreditando que posso mais. Obrigado pelo espaço no ap; pelas palavras de incentivo, pela confiança depositada em mim. Sei que não terminamos por aqui... que venha o doutorado!!!

CAROLINA PEIXOTO MAGALHÃES

Palavras são poucas para dizer o quanto você significa para mim.

Há anos você me conhece. Risos, lágrimas, alegrias, tristezas, brigas, estresses, gritos de vitória, já vivenciamos de tudo um pouco. Companheirismo, amizade, mãe científica, procuro palavras para resumir o meu sentimento, mas não existe resumo! Exemplo de mulher guerreira, valente, impulsiva (até demais), que se mistura com uma mulher delicada e sensível. Gratidão pelo que você fez e faz por mim. Depositastes confiança, até mesmo quando as circunstâncias eram desfavoráveis, mas me fez acreditar que eu podia. Consegui, e acredite que esse mérito é seu! E isso nunca irei esquecer. Alias, podem se passar 10, 20, 30 anos que nunca irei esquecer o que fazes por mim. Direi aos meus filhos, mesmo que adotivos (risos), o valor de Carolina Peixoto na minha vida. Amo muito você, e como sempre falas: pode contar comigo para o que der e vier, sempre, sempre!

Ser estrela neste mundo passageiro, neste mundo cheio de pessoas cometas é um desafio, mas, acima de tudo, uma RECOMPENSA!

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar a realização de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus irmãos, Állyson e Paula, que me ajudaram a ter forças para a construção deste trabalho. Amo muito vocês!

Aos meus sobrinhos originais, Arthur e Danilo, e os meus sobrinhos genéricos, Gabriel e Pedro. Deus sabe quanto amo vocês. Dão muito trabalho (risos), mas ao olhar nos olhos dessas crianças, ver a magia dos seus sorrisos e escutar o grito chamando: “Tia Rêêêêê” ...uma recompensa sem palavras!

Aos meus avós, Tereza, Isaiêr e Luzia (*in memorian*), exemplos de dignidade e honestidade. Mesmo à quilômetros de distância ou pertinho de Deus, sinto vocês bem presentes em mim.

Aos que fazem a Faculdade Santa Emília de Rodat (FASER). Me orgulho muito de ter sido aluna, monitora e professora desta instituição. Obrigado por terem estendido a mão quando precisei. Tenho muita gratidão, e que Deus abençoe a todos!

Aos grandes Anatomistas Haroldo Diniz e Carol Peixoto, que com seus exemplos de dedicação e honestidade, uns apaixonados pelos mistérios do corpo humano, me fizeram também ser apaixonada pela arte da Anatomia Humana.

Ao Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco, por disponibilizar instrumentos para a conclusão dos resultados desta dissertação.

Ao grande anatomista Profº Ademar Amorim, só fiz crescer acompanhando-o nas aulas. Obrigado pelas dissecações, pelos conselhos, pelos incentivos.

Ao mestre Raul Manhães de Castro, exemplo de competência, apaixonado pelo que faz, sempre com palavras sábias nos momentos certos. Obrigado pelos conselhos!

À minha orientadora Carol Leandro pelos conhecimentos passados ao longo desse tempo e pela sua alegria contagiante de viver.

Aos meus estagiários. Sempre batalhem pelos sonhos, participem, questionem, lutem, trabalhem com toda garra e força que vocês possuem, pois o sucesso do nosso trabalho é a nossa recompensa.

À Liginha, Matilde (ranso) e Aline. Estar com vocês não tem como ficar sem sorrir. Nossas conversas, brincadeiras e comilanças ainda estão de pé, por muito e muito tempo, se Deus quiser. Adoro vocês.

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4V - IV ventrículo

5-HIAA - Ácido-5-hidroxiindolacético

5-HT - Serotonina; 5-hidrotriptamina

ACC - córtex anterior cingulado

Aq - aqueduto cerebral

ARC - núcleo hipotalâmico arqueado

CEEA - Comissão de Ética em
experimentação animal

CF - Controle fenfluramina

CS - Controle Salina

DAB - 3,3 Diaminobenzidina

DF - Desnutrido fenfluramina

DP - Desvio Padrão

DS - Desnutrido Salina

FC - córtex frontal

L-Trp - L-triptofano

M - Média

MAO - Monoamina- oxidase

ML - leminisco medial

NAcc - núcleo accumbens

NDR - Núcleo Dorsal da Rafe

NMnR - Núcleo Mediano da Rafe

NCLiR - Núcleo Caudal Linear da
Rafe

NGS - Normal Goat Serum

NTS - núcleo do trato solitário

PAG - substância cinzenta
periaquedutal

PBS - Tampão Fosfato

PVH - núcleo hipotalâmico
paraventricular

REM - Rapid Eye Movement

RMg - núcleo magno da rafe

Rob - núcleo obscuro da rafe

RPa - núcleo pálido da rafe

SC - medula espinhal

SN - Sistema Nervoso

SNC - Sistema Nervoso Central

TCH - Thiocarbohidrazide

TPH - Triptofano Hidroxilase; EC
1.14.16.4

TPH-IR - Imunoreativo à Triptofano
Hidroxilase

UFPE - Universidade Federal de
Pernambuco

V1 - córtex visual primário

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Ciclo da serotonina, desde seu precursor, o aminoácido triptofano até a sua utilização ou degradação	17
Figura 02 – Corte coronal de encéfalo de rato <i>Wistar</i> , demonstrando a imunohistoquímica contra a enzima TPH nos núcleos Dorsal e Mediano da Rafe	19
Figura 03 – Projeções Serotoninérgicas	20
Figura 04 - Organograma representando a distribuição do número de animais controle e desnutrido	29
Figura 05 – Fotomicrografia do núcleo mediano da rafe (40X) com neurônios imunoreativos à TPH	32
Figura 06 (A/B) - Esquema de cortes sagital mediano (A) e coronal (B) do núcleo dorsal da rafe (NDR) de encéfalos de ratos <i>Wistar</i>	34
Figura 07 (A/B) - Esquema de cortes sagital mediano (A) e coronal (B) do núcleo mediano da rafe (NMnR) de encéfalos de ratos <i>Wistar</i>	35
Figura 08 - Efeito da desnutrição protéica perinatal sobre a evolução ponderal em ratos	37
Figura 09 - Efeito da desnutrição protéica perinatal sobre a ingestão alimentar em ratos	38
Figura 10 – Efeito da fenfluramina sobre a expressão dos neurônios imunoreativos à enzima Triptofano hidroxilase em animais desnutridos ou normonutridos durante o período perinatal	39
Figura 11 – Fotomicrografia dos neurônios imunoreativos à enzima Triptofano hidroxilase em animais normonutridos e desnutridos estimulados ou não farmacologicamente.....	40
Figura 12 - Efeito da desnutrição protéica perinatal e fenfluramina sobre a distribuição de neurônios imunoreativos à enzima TPH nas porções rostrais e caudais do núcleo dorsal da rafe	42
Figura 13 - Efeito da desnutrição protéica perinatal e fenfluramina sobre a distribuição de neurônios imunoreativos à enzima TPH nas porções rostrais e caudais do núcleo mediano da rafe	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Composição das dietas experimentais oferecidas durante o período de gestação e lactação..... **29**

Tabela 02 - Efeito da desnutrição protéica perinatal na distribuição de neurônios imunoreativos à enzima TPH nas porções rostrais e caudais dos núcleos dorsal e mediano da rafe.....**41**

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. HIPÓTESE	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Geral	26
3.2 Específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Animais	28
4.2 Perfusão e obtenção dos encéfalos	30
4.3 Imunohistoquímica - enzima triptofano hidroxilase	30
4.3.1 Reação Primária	31
4.3.2 Reação Secundária	31
4.4 Análise quantitativa de neurônios imunoreativos à TPH (TPH-IR)	31
4.5 Análise da distribuição de neurônios imunoreativos à TPH em núcleos da rafe	32
4.5.1 Núcleo Dorsal da Rafe (NDR)	33
4.5.2 Núcleo Mediano da Rafe (NMnR)	33
5. RESULTADOS	36
5.1 Evolução Ponderal	37
5.2 Ingestão Alimentar	37
5.3 Análise quantitativa de neurônios imunoreativos à TPH	38
5.4 Análise da distribuição de neurônios imunoreativos à TPH em núcleos da rafe	41
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	51
8. REFERÊNCIAS	53
ANEXO	61
Anexo I – The council of the European Communities	62
Anexo II – Parecer da Comissão de Ética em Experimento Animal (CEEAA) – UFPE	70

RESUMO

CAMPINA, RCF. **Distribuição e análise quantitativa de neurônios imunoreativos à enzima triptofano hidroxilase em núcleos da rafe de animais desnutridos durante a vida perinatal.** Dissertação (Mestrado em Patologia) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

Agravos nutricionais ocorridos no período de desenvolvimento do sistema nervoso podem programar o metabolismo fetal de maneira duradoura para permitir a sobrevivência do indivíduo às mudanças no ambiente nutricional. A desnutrição protéica perinatal promove modificações neuroquímicas, inclusive dos níveis de serotonina e da enzima limitante para sua síntese, a triptofano hidroxilase (TPH). Ratas virgens da linhagem *Sprague-Dawley* receberam dieta normoprotéica (Grupo controle, C) ou hipoprotéica (Grupo desnutrido, D) durante a gestação e lactação. Os filhotes foram alimentados com dieta normoprotéica após o desmame e submetidos à experimentação aos 35 dias de vida. Filhotes normonutridos e desnutridos receberam injeção aguda de fenfluramina (3mg/Kg p.c) ou salina (NaCl 0,9%) formando os grupos controle salina (CS), desnutrido salina (DS), controle fenfluramina (CF) e desnutrido fenfluramina (DF). Os encéfalos foram crio-seccionados e processados com técnicas de imunohistoquímica contra a enzima triptofano hidroxilase. Foram analisados a quantidade de neurônios imunoreativos a triptofano hidroxilase e sua distribuição dentro dos núcleos Dorsal e Mediano da rafe. O grupo desnutrido não apresentou alterações na quantidade e distribuição de células serotoninérgicas nos núcleos da rafe quando comparado aos animais controle. No entanto, quando o sistema serotoninérgico foi estimulado com fenfluramina, observamos aumento no número de neurônios imunoreativos a enzima triptofano hidroxilase no núcleo Dorsal da rafe apenas de animais desnutridos. A investigação da organização topográfica das células marcadas em regiões do eixo rostro-caudal revelou importantes diferenças entre organismos desnutridos e nutridos, que não foram observadas na constituição dos núcleos como um todo. Dessa forma, podemos salientar a relevância de estudos com sub-populações de neurônios dentro dos núcleos da rafe, apresentando essas susceptibilidades distintas a ações da desnutrição perinatal.

Palavras-chave: Triptofano Hidroxilase, Serotonina, desnutrição, ratos, fenfluramina, núcleos da rafe.

ABSTRACT

CAMPINA, RCF. **Distribution and quantitative analysis of neurons immunoreactive for the enzyme tryptophan hydroxylase in the raphe nuclei of animals malnourished during perinatal life.** Dissertação (Mestrado em Patologia) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

Nutritional disorders occurring during the development of the nervous system may program the fetal metabolism so long to allow the survival of individuals to changes in the nutritional environment. The perinatal protein malnutrition promotes neurochemical changes, including the levels of serotonin and limiting enzyme for its synthesis, tryptophan hydroxylase (TPH). Virgin rats of the Sprague-Dawley strain received normal diet (control group, C) or hypoproteic (malnourished group, D) during pregnancy and lactation. The pups were fed with normal diet after weaning and subjected to experimentation at 35 days of life. Normonutridos and malnourished pups were acute injection of fenfluramine (3mg/Kg pc) or saline (NaCl 0.9%) forming the saline control groups (CS), malnourished saline (DS), fenfluramine Control (FC) and malnourished fenfluramine (DF). The encephalum were criosection and processed with immunohistochemical techniques against the enzyme tryptophan hydroxylase. We analyzed the number of neurons immunoreactive for tryptophan hydroxylase and its distribution within the nuclei of Dorsal and median raphe. The malnourished group showed no changes in the quantity and distribution of serotonergic cells in the raphe nuclei compared to control animals. However, when the system was stimulated with fenfluramine serotonin, we observed an increase in the number of neurons immunoreactive for tryptophan hydroxylase enzyme in the nucleus Dorsal raphe only in undernourished animals. The investigation of the topographic organization of cells in regions marked rostro-caudal axis revealed significant differences between malnourished and nourished bodies, which were not observed in the formation of nuclei as a whole. Thus, we stress the relevance of studies in sub-populations of neurons within the raphe nuclei, showing different susceptibilities to these shares of perinatal malnutrition.

Keywords: Tryptophan hydroxylase, Serotonin, Malnourished, Rats, Fenfluramine, Raphe Nuclei.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento e desenvolvimento fetal são eventos biológicos complexos influenciados pela genética, maturidade, drogas, estresse, nutrição materna e fetal, entre outros fatores (Gootwine, 2004; Redmer, Wallace *et al.*, 2004). No processo de desenvolvimento de alguns sistemas orgânicos existem períodos de vulnerabilidade a vários tipos de agressões (Forbes, Stern *et al.*, 1978). Como exemplo, no sistema nervoso, a diferenciação neuronal e sinaptogênese ocorrem rapidamente tornando esse sistema muito vulnerável a diversos insultos (Austin, Beiswanger *et al.*, 1992). Durante a gestação, o desenvolvimento fetal é inteiramente dependente do ambiente materno para as necessidades primárias, como as nutricionais (Mcardle, Andersen *et al.*, 2006). Fatores que afetam o tamanho e a capacidade funcional da placenta, transferência de nutrientes e oxigênio útero-placentário podem alterar e/ou prejudicar o crescimento fetal (Bell e Ehrhardt, 2002; Reynolds, Borowicz *et al.*, 2005; Fowden, Sibley *et al.*, 2006).

A indução de desnutrição por redução do conteúdo de proteína na dieta materna, em estudos experimentais, é um dos muitos modelos utilizados para promoção de restrição de crescimento perinatal (Desai, Weindruch *et al.*, 1996). O retardo no crescimento intra-uterino pode causar prejuízo na maturação do embrião/feto e de seus órgãos, alterando a expressão do genoma com possíveis conseqüências na vida adulta (Godfrey e Robinson, 1998; Wu, Liu *et al.*, 2003). Essas conseqüências são agravadas quando há mudança do ambiente nutricional após a lactação, favorecendo o desenvolvimento de patologias metabólicas como a diabetes, a hipertensão arterial, estado hiperfágico e obesidade (Breier, Vickers *et al.*, 2001; Mcardle, Andersen *et al.*, 2006). O déficit de energia na vida intra-uterina seguido de alimentação normocalórica ou hipercalórica na vida pós-natal resulta em acelerado crescimento, chamado de “catch-up”, induzindo ao aumento de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Barker, 1995).

Após observações experimentais, foi definido o termo *programação*, como sendo o processo no qual um estímulo ou insulto, quando aplicado no período crítico ou sensível de desenvolvimento resulta em efeitos permanentes ou de longa duração na estrutura e funcionamento do organismo (Lucas, 1991). Estudos experimentais têm observado que o “feto programado” apresenta maior susceptibilidade para desenvolver tardiamente doenças metabólicas e

cardiovasculares mesmo depois que o fator estressor tenha sido retirado (McCardle, Andersen *et al.*, 2006).

Como relatado anteriormente, um dos principais alvos dos insultos nutricionais durante períodos iniciais da vida é o Sistema Nervoso. Alterações do ambiente nutricional nesses períodos do desenvolvimento exercem papel crítico na organização das conexões neuronais (Lauder, 1993). Nesse contexto, o sistema de neurotransmissão serotoninérgico merece atenção especial, particularmente por participar ativamente do desenvolvimento orgânico bem como de uma série de funções do sistema nervoso central (Manjarrez, Magdaleno *et al.*, 1996; Alfaro-Rodriguez, Gonzalez-Pina *et al.*, 2006).

A serotonina (5-HT ou 5-hidroxitriptamina) é produzida na periferia e no sistema nervoso central, apresentando distribuição não homogênea nessas regiões (Jacobs e Azmitia, 1992). No sistema nervoso central é produzido aproximadamente 2% do conteúdo corporal total de serotonina (Bradley, 1984). Apesar desse baixo percentual, a serotonina aí produzida é responsável por importantes funções como a regulação dos sistemas cardiovascular, respiratório, endócrino, regulação da temperatura corporal (Oscos e Hernandez, 1982), aprendizagem (Baker, Halliday *et al.*, 1990), expressão das emoções (Molliver, 1987) e controle do comportamento alimentar (Blundell, Lawton *et al.*, 1995; De Souza, Nogueira *et al.*, 2004). Na periferia, a serotonina está presente no interior dos vasos sanguíneos, nas plaquetas e no intestino, atuando na constrição dos vasos sanguíneos, na adesão plaquetária e na motilidade intestinal (Carkaci-Salli, Flanagan *et al.*, 2006). A serotonina exerce ainda, papel imprescindível durante a embriogênese, apresentando elevada concentração orgânica nesse período da vida (Leibowitz e Alexander, 1998; De Souza, Nogueira *et al.*, 2004).

O precursor da síntese de serotonina é o aminoácido essencial L-triptofano (L-Trp) (Gal, 1975; Hamon, Bourgoïn *et al.*, 1981). Sendo fornecido pela dieta, esse aminoácido vai ser encontrado no plasma de forma livre ou conjugado com a albumina (Walther e Bader, 2003). Apenas a fração livre atravessa a barreira hematoencefálica para participar da síntese de serotonina no sistema nervoso central (Manjarrez, Manuel *et al.*, 2003). Dentro de neurônios chamados serotoninérgicos, localizados particularmente nos núcleos da rafe do tronco encefálico, o triptofano é hidroxilado pela ação da enzima 5-Triptofano-Hidroxilase (TPH, EC 1.14.16.4) (Grahame-Smith, 1964; Jequier, Lovenberg *et al.*, 1967; Gal,

1975; Zhang, Beaulieu *et al.*, 2004; Nakamura, Sugawara *et al.*, 2006) e, em seguida, descarboxilado para formar a serotonina (Boadle-Biber, 1993). A degradação da serotonina vai originar o seu principal metabólico, o ácido 5-hidroxiindolacético, ou 5-HIAA (Figura 1).

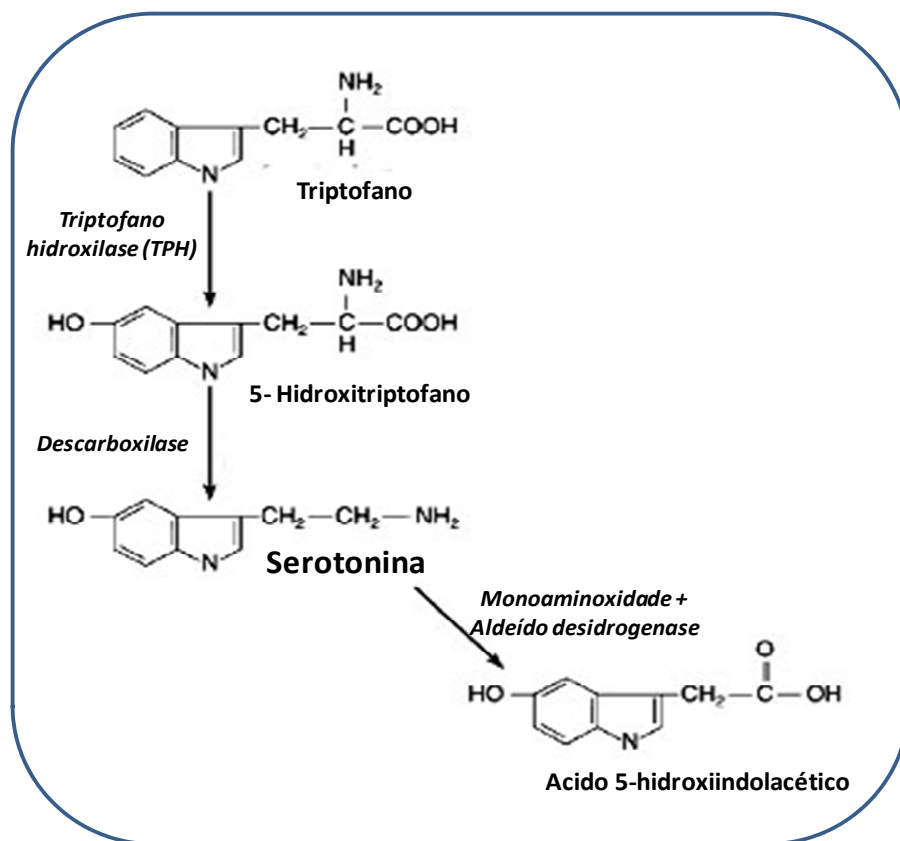


Figura 01 – Ciclo da serotonina, desde seu precursor, o aminoácido triptofano, até sua utilização ou degradação. O aminoácido triptofano atravessa a barreira hematocefálica e entra no neurônio serotoninérgico. No neurônio, o triptofano é hidroxilado pela enzima TPH e carboxilado pela enzima triptofano-carboxilase, sendo convertido em serotonina (5-HT), que é armazenado em vesículas. Durante o impulso nervoso, a 5-HT é liberada na fenda sináptica e, ao ser captada por receptores pós-sinápticos, promove sua excitação ou inibição. A 5-HT não utilizada é recaptada pelo transportador de 5-HT e, no citoplasma do neurônio, é degradada a ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) pela enzima monoamina-oxidase (MAO).

No encéfalo, a Triptofano hidroxilase localiza-se no interior dos neurônios específicos que produzem serotonina, ou seja, nos neurônios serotoninérgicos (Knapp e Mandell, 1976). Essa enzima limitante para a síntese de serotonina apresenta-se sob duas formas, a TPH_1 e TPH_2 . Em tecidos periféricos, a TPH_1 é responsável pela hidroxilação do triptofano (Walther e Bader, 2003; Nakamura, Sugawara *et al.*, 2006). Porém, sua função na síntese da serotonina encefálica não é

explorada (Nakamura, Sugawara *et al.*, 2006). Por outro lado, a TPH₂ é expressa predominantemente em neurônios serotoninérgicos localizados no tronco encefálico (Walther e Bader, 2003; Zhang, Beaulieu *et al.*, 2004). Em ratos, que apresentam período de gestação e lactação de 21 dias cada, o aparecimento dos primeiros neurônios serotoninérgicos ocorre no 12º dia de gestação (Lidov e Molliver, 1982; Wallace e Lauder, 1983).

Os corpos de neurônios serotoninérgicos formam agrupamentos na linha mediana do tronco encefálico, denominados *núcleos da rafe* (Baker, Halliday *et al.*, 1990). Esses núcleos podem ser divididos em grupos rostral e caudal. Segundo Jacobs e Azmitia (1992), essa divisão baseia-se no aparecimento, respectivamente, de grupos localizados no mesencéfalo e medula oblonga, ocorridos no início do desenvolvimento. O grupo rostral está confinado ao mesencéfalo e à porção rostral da ponte. Este grupo é composto por três núcleos da rafe, contendo aproximadamente 85% de todos os neurônios serotoninérgicos do encéfalo (Hornung, 2003). Os núcleos que compõem este grupo são: **Núcleo Caudal Linear (NCLiR)**, considerado o mais rostral dos núcleos serotoninérgicos (Jacobs e Azmitia, 1992); **Núcleo Mediano (NMnR)** e **Núcleo Dorsal (NDR)**, considerados os mais importantes núcleos serotoninérgicos do encéfalo (Dahlstroem e Fuxe, 1964; Jacobs e Azmitia, 1992; Sodero, Orsingher *et al.*, 2006) (FIGURA 02). Esses grupos enviam projeções principalmente para estruturas cerebrais (Hornung, 2003). O grupo caudal estende-se da porção caudal da ponte à medula oblonga (Hornung, 2003). Esses neurônios aparecem, aproximadamente, 2 dias depois dos surgimento dos neurônios do grupo rostral (Lidov e Molliver, 1982; Wallace e Lauder, 1983). Este grupo apresenta cerca de 15% da população total de neurônios serotoninérgicos e é composto, principalmente, pelo **Núcleo Obscuro**, **Núcleo Pálido** e **Núcleo Magno** (Dahlstroem e Fuxe, 1964). A maioria das suas projeções inervam a porção caudal do tronco encefálico e a medula espinal (Hornung, 2003).

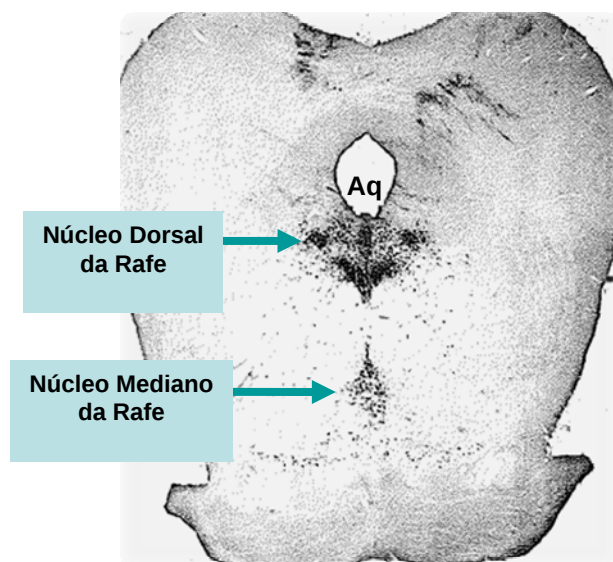


Figura 02 – Corte coronal de encéfalo de rato *Wistar*, demonstrando a imunohistoquímica contra a enzima TPH nos núcleos Dorsal e Mediano da Rafe. Sigla: Aq – Aqueduto Cerebral. Nível a partir do bregma aproximadamente -7,56mm. Fonte: Molliver, 1987.

Como mencionado anteriormente, os núcleos dorsal e mediano da rafe são os mais importantes grupos de corpos de neurônios serotoninérgicos, pois neles surgem grande quantidade de projeções serotoninérgicas ascendentes para regiões anteriores do encéfalo (Molliver, 1987; Jacobs e Azmitia, 1992; Hornung, 2003), incluindo estruturas do sistema límbico (Molliver, 1987; Jacobs e Azmitia, 1992)(FIGURA 03). O núcleo Dorsal da rafe repousa dentro da substância periaquedutal estendendo-se a partir do nível do núcleo oculomotor até a região tegmentar da ponte (Molliver, 1987; Hornung, 2003). Os neurônios serotoninérgicos do núcleo Dorsal são organizados topograficamente no plano rostro-caudal formando sub-grupamentos com distintas áreas de projeção (Abrams, Johnson *et al.*, 2004). Assim, neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal localizados rostralmente projetam-se para o núcleo caudado e putâmem (Morin e Meyer-Bernstein, 1999), substância negra (Abrams, Johnson *et al.*, 2004), neocórtex (Jacobs, Foote *et al.*, 1978) e amígdala (Commons, Connolley *et al.*, 2003). Em contrapartida, aqueles

neurônios localizados caudalmente projetam-se para o hipocampo e córtex entorrinal (Abrams, Johnson *et al.*, 2004), locus coeruleus (Imai, Park *et al.*, 1986), núcleo central amigdalóide (Lowry, Hale *et al.*, 2008)(FIGURA 03). Outras projeções do NDR incluem o córtex pré-frontal e a área lateral do núcleo septal (Beck, Pan *et al.*, 2004).

O núcleo Mediano da rafe localiza-se entre a ponte e o diencefalo. Seu limite rostral está ao nível da decussação do pedúnculo cerebelar superior, e o caudal repousa ao nível do colículo facial (Molliver, 1987). As áreas do córtex do cíngulo, área dorsal do hipocampo (Molliver, 1987), área medial do septo e o núcleo supraquiasmático (Vertes, Fortin *et al.*, 1999), recebem projeções dos neurônios localizados no núcleo mediano da rafe (Figura 03). As projeções serotoninérgicas do núcleo Dorsal e Mediano da rafe estão envolvidas com a ansiedade (Jacobs e Azmitia, 1992), ritmo circadiano (Lowry, Hale *et al.*, 2008), comportamento emocional (Lowry, Hale *et al.*, 2008), dentre outros.

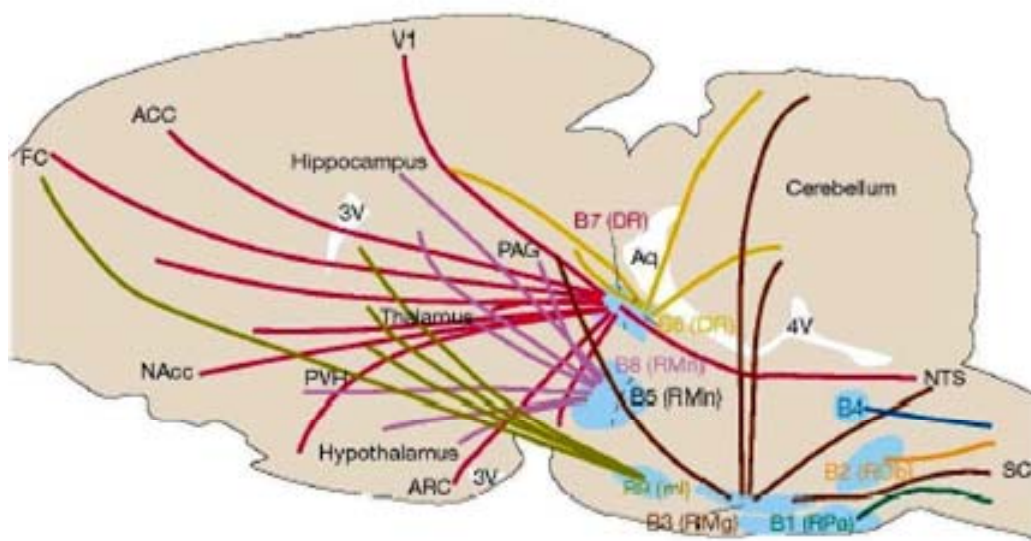


Figura 03 - Projeções dos neurônios serotoninérgicos para todas as áreas do encéfalo. Os núcleos caudais, Obscuro, Pálido e Magno que dão origem a maioria das projeções descendentes; os grupos rostrais, Mediano e Dorsal, que dão origem a maioria das projeções ascendentes. As projeções serotoninérgicas do NDR estão representadas pela coloração em azul e as do NMnR estão com a coloração roxa. 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 e Heisler, 2007).

Os níveis de serotonina nos núcleos da rafe e áreas de projeção estão diretamente relacionados à atividade da enzima triptofano hidroxilase (Manjarrez, Magdaleno *et al.*, 1996). No entanto, a atividade dessa enzima pode ser inibida por diversos fatores, incluindo estresse, resistência à insulina e deficiência de vitamina B6 (Birdsall, 1998). A síntese de serotonina é dependente da disponibilidade do triptofano dentro do sistema nervoso central (Birdsall, 1998). Este é um aminoácido essencial cuja disponibilidade na corrente sanguínea vai estar relacionada à sua oferta pela dieta (Culley, Saunders *et al.*, 1963). No entanto, os níveis de triptofano no sistema nervoso central dependem também da concentração de outros aminoácidos de cadeia ramificada que utilizam o mesmo transportador na barreira hematoencefálica (Manjarrez, Chagoya *et al.*, 1988). A ingestão crônica de dietas com baixos teores de triptofano deprime os níveis de serotonina encefálica (Culley, Saunders *et al.*, 1963). A disponibilidade de triptofano por sua vez, pode indiretamente afetar a atividade da enzima triptofano hidroxilase e influenciar na produção de serotonina (Neckers, Biggio *et al.*, 1977; Bach-Mizrachi, Underwood *et al.*, 2008). Alguns tratamentos que reduzem ou elevam os níveis de triptofano encefálico podem, por mudanças dos substratos enzimáticos, alterar os níveis de hidroxilação do triptofano (Fernstrom e Wurtman, 1971), como acontece na desnutrição (Manjarrez, Chagoya *et al.*, 1988).

Níveis alterados de serotonina estão associados a várias patologias, como a depressão, comportamentos impulsivo, agressivo, suicida, abuso de drogas e insônia (Hensler, Ferry *et al.*, 1994). Na depressão, uma das mais freqüentes desordens afetivas, existe importante correlação com níveis reduzidos da enzima triptofano hidroxilase e, conseqüentemente, redução do nível de serotonina (Lerer, Shapira *et al.*, 1995).

Outra possível razão para a diminuição dos níveis de serotonina cerebral pode ser a diminuição do transporte do aminoácido triptofano através da barreira hematoencefálica (Hussain e Mitra, 2000). Devido à direta relação existente entre as concentrações do aminoácido triptofano, a atividade da enzima triptofano hidroxilase, e conseqüente produção de serotonina, as manipulações dietéticas podem induzir modificações nos níveis de serotonina (Manjarrez, Magdaleno *et al.*, 1996). Assim, algumas investigações demonstram que o consumo de dietas com níveis reduzidos de proteínas ou calorias durante períodos precoces da vida promovem aumento nos níveis de serotonina encefálica (Resnick e Morgane,

1984; Hernandez, Manjarrez *et al.*, 1989; Manjarrez, Manuel *et al.*, 2003; Alfaro-Rodriguez, Gonzalez-Pina *et al.*, 2006). Esse aumento está diretamente relacionado com o aumento da fração do L-triptofano plasmático (Manjarrez, Magdaleno *et al.*, 1996).

A associação de fatores nutricionais e farmacológicos sobre a produção da serotonina pode trazer importantes informações acerca do envolvimento do sistema serotoninérgico no estabelecimento de padrões fisiológicos maduros. Neste estudo vamos associar manipulações do conteúdo da dieta durante período vulnerável para o desenvolvimento do sistema nervoso e investigar a expressão e distribuição de neurônios imunoreativos à enzima triptofano hidroxilase em núcleos da rafe na vida adulta. Esse estudo nos trará importantes informações acerca das seqüelas promovidas pela desnutrição protéica precoce sobre aspectos morfológicos pouco explorados do sistema serotoninérgico.

2. HIPÓTESES

Em organismos submetidos à desnutrição nos períodos iniciais da vida ocorrem aumento no número de neurônios que expressam a enzima triptofano hidroxilase em alguns núcleos rostrais da rafe.

A distribuição da enzima triptofano hidroxilase nos organismos que foram desnutridos durante período perinatal apresenta padrão topográfico, no eixo rostro-caudal, diferente daquele de animais nutridos.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estudar os efeitos da desnutrição perinatal sobre aspectos topográficos da expressão da enzima triptofano hidroxilase nos núcleos mediano e dorsal da rafe.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o número de neurônios imunoreativos a enzima triptofano hidroxilase nos núcleos dorsal e mediano da rafe em animais submetidos à desnutrição perinatal;
- Identificar a distribuição topográfica de neurônios imunoreativos a triptofano hidroxilase nos núcleos dorsal e mediano da rafe em animais submetidos a desnutrição perinatal;
- Após estímulo do sistema serotoninérgico, com inibidor de recaptura da serotonina, investigar a expressão e distribuição de neurônios imunoreativos a triptofano hidroxilase nos núcleos dorsal e mediano da rafe de animais desnutridos ou nutridos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Sprague-Dawley* mantidos em condições padrão de biotério (ciclo claro-escuro de 12/12, temperatura 21 ± 3). Para obtenção de ratos desnutridos durante o período perinatal, ratas fêmeas primíparas, pesando entre 200-250g, foram acasaladas (3 fêmeas para 1 macho). A prenhez foi pré-diagnosticada pela presença de grande quantidade de espermatozóide no esfregaço vaginal. Após a confirmação da prenhez as fêmeas foram acomodadas em gaiolas individuais. A partir do primeiro dia de gestação, as fêmeas foram alimentadas com dietas isocalóricas com diferentes teores proteína (caseína 20% ou 8% /100g de dieta) (Tabela 01). As fêmeas foram observadas rotineiramente para registro do dia de nascimento dos filhotes. O tamanho da ninhada foi adaptado para 8 filhotes (machos) pesando entre 6 e 8 gramas cada. Os filhotes, após o desmame, foram mantidos em gaiolas com 4 animais até completarem 35 dias de vida, recebendo, assim, dieta padrão do biotério.

Tabela 01 - Composição das dietas experimentais oferecidas durante o período de gestação e lactação.

Constituintes	Dieta hipoprotéica	Dieta normoprotéica
g %	100.0	100.0
Proteína (Caseína)	8.1	20.0
Carboidratos	75.1	65.2
Lipídios	7.0	7.0
Fibras	5.0	5.0
Vitaminas	1.0	1.0
Minerais	3.5	3.5
Metionina	0.3	0.3
% Kcal	362.4	363.4

Valores reais (%) dos nutrientes que compõem as dietas experimentais.

Foram formados os grupos experimentais Controle e Desnutrido, com animais cujas mães receberam dieta caseína 20% e 8 % de proteína, respectivamente, na gestação e lactação. No 35 dia de vida, foram formados quatro subgrupos por injeção aguda de salina (NaCl 0,9%) ou fenfluramina (3 mg/Kg de peso corporal). As injeções foram realizadas por via intraperitonal com volume de 1mL por 100g de peso corporal noventa minutos antes do sacrifício dos animais. Assim obtivemos os grupos: Controle salina (CS), Controle fenfluramina (CF), Desnutrido Salina (DS) e Desnutrido fenfluramina (DF) (Figura 04).

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 nº17820/2007-37).

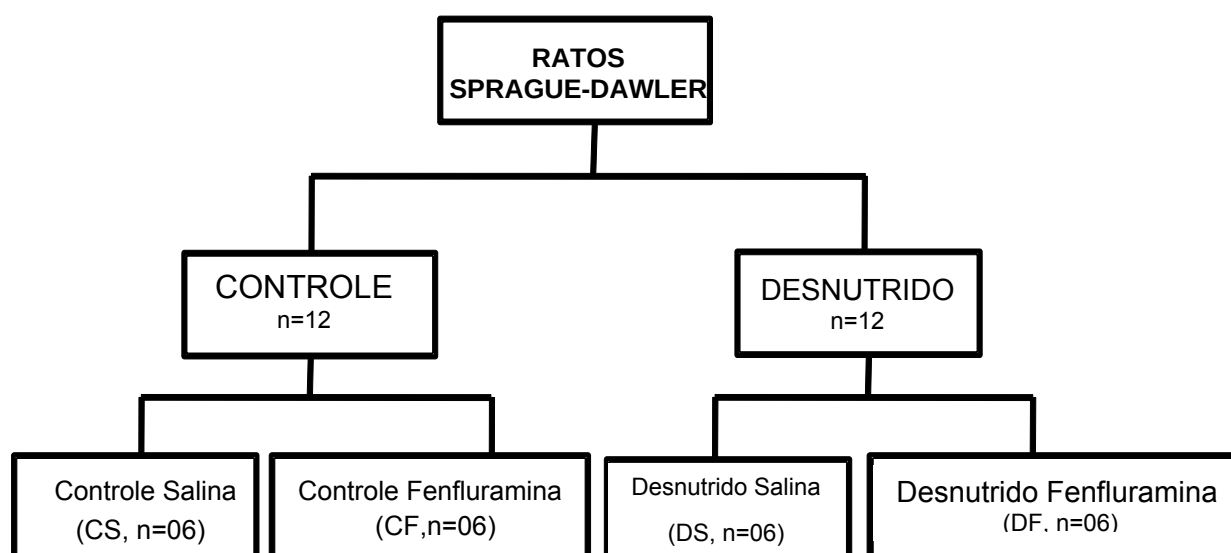


Figura 04 – Organograma representando a distribuição do número de animais controle (caseína 20%) e desnutrido (Caseína 8%) formando os grupos experimentais. A manipulação dietética foi realizada durante os períodos de gestação e lactação, e a farmacológica foi realizada aos 35 dias de vida.

4.2 Perfusão e obtenção dos encéfalos

Ao 35^o dia de vida, os animais foram perfundidos transcardiacamente após serem anestesiados profundamente com pentobarbital sódico (50mg/Kg). Para a perfusão, o animal foi posicionado em superfície apropriada com imobilização da cabeça. Para o acesso ao ventrículo esquerdo realizou-se um corte na parede do tórax expondo-se o apêndice xifóide do esterno. 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 alcance a aorta descendente, e como consequência toda sua área de irrigação, o pulmão esquerdo foi afastado e a aorta descendente pinçada. Em seguida, uma cânula acoplada a uma bomba peristáltica foi introduzida no ventrículo esquerdo do coração e presa na área por uma pinça hemostática. A bomba foi acionada em velocidade compatível com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Inicialmente foi infundido 150mL de solução salina (NaCl, 0,9%) à temperatura ambiente para remoção do sangue dentro dos vasos. Após a perfusão com salina seguiu-se com a infusão de solução fixadora (4% de paraformaldeído, a 4°C). Ao final da passagem do fixador, foi feita uma incisão na calota craniana para a exposição do encéfalo. Antes da retirada deste, foram seccionadas as emergências dos nervos cranianos, localizados na base do crânio. Tal procedimento evitou danificar as origens reais de tais nervos localizados, em sua maioria, nos núcleos da rafe. Logo após a retirada do encéfalo, foi pós-fixado em solução de fixador mais sacarose (30%) durante 4 horas. Após esse período, foi armazenado em solução crioprotetora de tampão fosfato (PBS) e sacarose 30% por 6-24 horas. Os encéfalos foram crio-seccionados em cortes coronais de 40µm de espessura utilizando-se criomicrotomo de congelamento. Cinco séries de cortes foram coletadas, para cada animal, em placa de acrílico (25 cavidades) com solução anticongelante e armazenadas a -20°C.

4.3 Imunohistoquímica - enzima triptofano hidroxilase

Foi utilizada uma das séries com os cortes obtidos na criosecção para a reação de imunohistoquímica contra a enzima triptofano hidroxilase. Da série escolhida foram selecionados cortes do tronco encefálico para a realização de imunohistoquímica.

4.3.1 Reação Primária

Ao serem removidos da solução anticongelante, os cortes coronais de uma série, foram lavados em PBS (3 x 15 min). Em seguida, foram incubados à 4°C e imersos na seguinte solução: Tampão + detergente de membrana (100 mL de PBS + 300µl de Triton); NGS (Normal Goat Serum – 1:200) e o anticorpo primário contra a enzima triptofano hidroxilase (1:5000). Ao serem mergulhados nesta solução, protegidos contra luminosidade, foram colocados na mesa agitadora, permanecendo por 22 horas em câmara fria. Após esse período, os cortes sofreram lavagens com PBS (3X15min).

4.3.2 Reação Secundária

Os cortes foram incubados na seguinte solução: Loaded + anticorpo secundário biotilado (1:200). Segui-se lavagem dos cortes com PBS (3X15min), e incubação no Complexo Peroxidase-Antiperoxidase (ABC, 1:800) por 1 hora. Esse Complexo é formado pela Avidina, Biotina e PBS. Em seguida ocorreu outra lavagem em PBS (2X10min), para posterior lavagem no tampão Na-acetato à 0,1M. Para revelação os cortes foram submersos em solução com DAB (3,3-diaminobenzidina (3ml), Níquel amônio sulfato (0,5g para 10 ml de Na-acetato à 0,2M), cloreto de amônio (10mg) e β-d-glicose (1 mg). Logo após esse período, foi adicionado a enzima Glicose Oxidase (0,15mg) a solução aguardando-se a obtenção de cortes de cor marrom claro/púrpura para que fosse neutralizada a reação com Na-acetato (0,1M) (2 x 10 min) e, em seguida, com PBS (2 x 10 min).

Após a montagem dos cortes em lâminas previamente gelatinizadas, estas foram submetidas ao processo de desidratação em concentrações crescentes de alcoóis (50 %, 70 %, 95 %-I, 95 %-II, 100 %-I, 100 %-II, 100 %-III, 3 min cada) e diafanização em xilol (Xilol-I, Xilol-II, 3 min cada). As lâminas foram recobertas com Interllan e lamínula.

4.4 Análise quantitativa de neurônios imunoreativos à TPH (THP-IR)

Para delimitação das estruturas foi utilizado como referência o Atlas Estereotático de Rato (PAXINOS e WATSON, 1998). A análise foi realizada em microscopia óptica de campo claro. Quantificaram-se células com marcação evidente nos núcleos dorsal e mediano da rafe. Para cada núcleo foram considerados todos os cortes coronais de uma série nos quais estes foram evidenciados. Foram quantificadas todas as células evidentes à imunohistoquímica, em cada corte para cada núcleo (Figura 05). Os dados utilizados representam a média do somatório de neurônios em cada núcleo de cada animal.

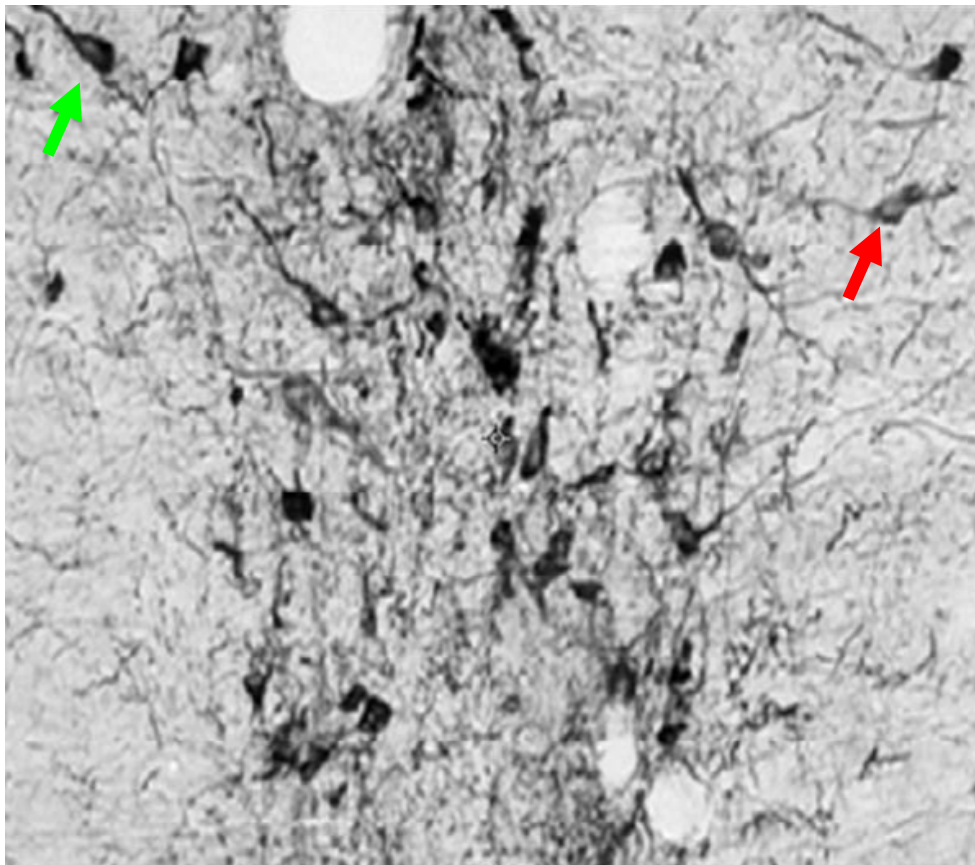


Figura 05 – Fotomicrografia do núcleo mediano da rafe (40X) com neurônios imunoreativos à triptofano hidroxilase. Seta verde demonstra os neurônios que foram quantificados, vermelha são os neurônios que não entraram na quantificação.

4.5 Análise da distribuição de neurônios imunoreativos à TPH nos núcleos dorsal e mediano da rafe

No estudo da distribuição de neurônios imunoreativos à TPH nos núcleos dorsal e mediano da rafe, consideramos a organização topográfica de subgrupos de neurônios serotoninérgicos dentro de um mesmo núcleo da rafe. Com isso, os núcleos da rafe foram divididos em regiões Rostral e Caudal (Abrams, Johnson *et al.*, 2004). A extensão rostro-caudal e a divisão de cada núcleo foram:

4.5.1 Núcleo Dorsal da Rafe

Localiza-se na parte caudal da substância periaquedutal disposto no mesencéfalo (Sparks, Markesbery *et al.*, 1985). O núcleo dorsal da rafe é maior que o conjunto de todos os núcleos da rafe (Steinbusch, 1981). A partir do bregma, este núcleo estende-se, no sentido rostro-caudal, do -6,84mm até -9,24mm (Figura 06A e 06B). Dividimos o núcleo Dorsal no eixo rostro-caudal em duas regiões: Porção Rostral (PR): -6.84, -7.08, -7.32, -7.56, -7.80 e a Porção Caudal (PC): -8.04, -8.28; -8.52, -8.76, -9.00, -9.24.

4.5.2 Núcleo Mediano da Rafe

Situado na área tegmentar do tronco encefálico, o Núcleo Mediano da Rafe estende-se caudalmente da decussação das pirâmides ao pedúnculo cerebelar superior (Sparks, Markesbery *et al.*, 1985). Localiza-se entre os níveis encefálicos caudais, a partir do bregma, entre -7,32mm à -8,76mm (Figura 07A e 07B). O núcleo mediano foi dividido em Porção Rostral -7.32, -7.56, -7.80 e Porção Caudal: -8.04, -8.28; -8.52, -8.76.

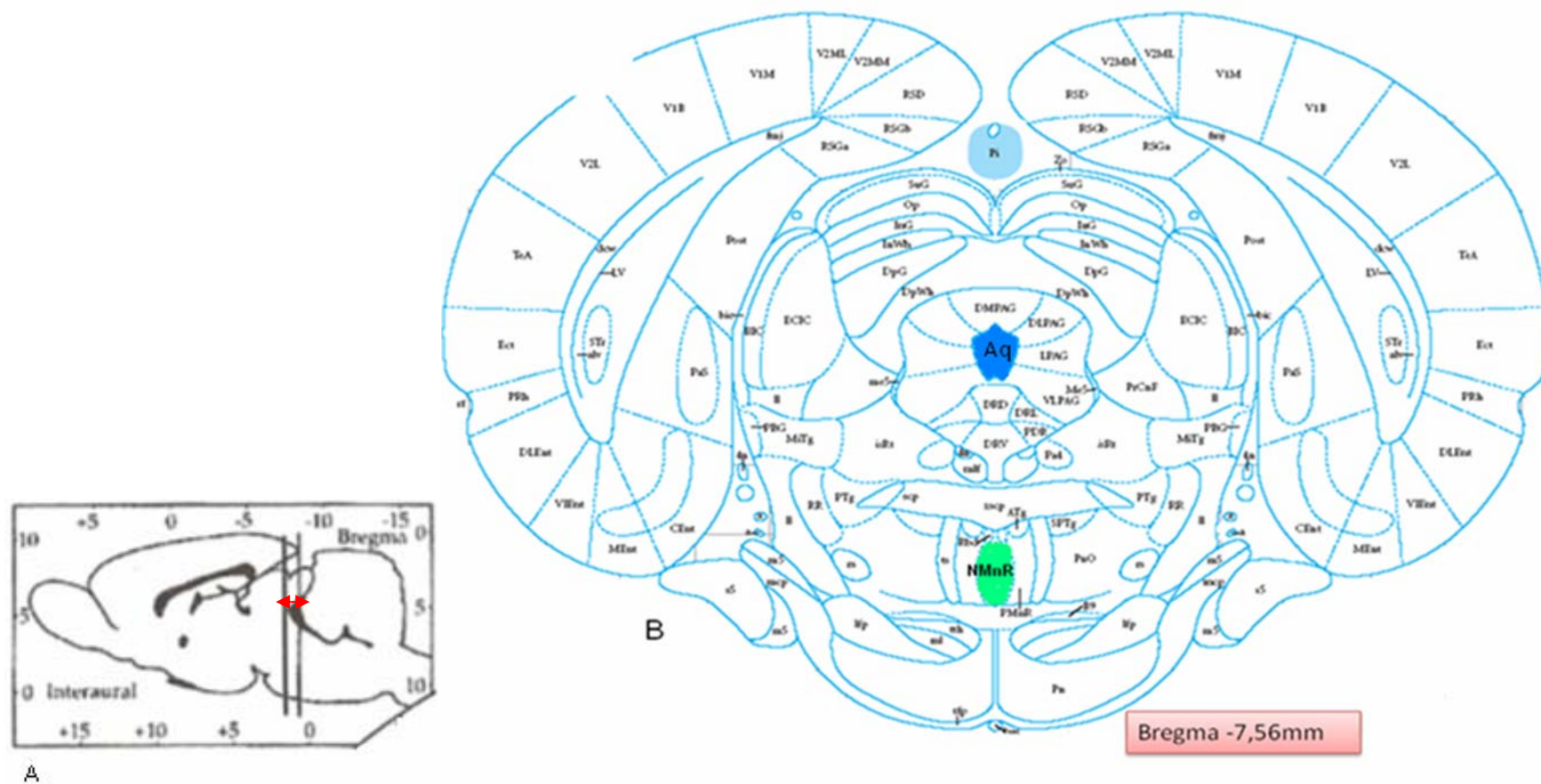


Figura 07 (A, B) - Esquema de cortes sagital mediano (A) e coronal (B) de encéfalos de ratos *Wistar*. O núcleo mediano da rafe (NMnR) está delimitado pelas linhas verticais (A) e pela coloração verde (B). Aq – Aqueduto Cerebral (Azul)

5. RESULTADOS

5.1 Evolução ponderal

A partir do 5º dia de vida pós-natal, constatamos uma redução significativa ($p < 0,001$) no peso corporal diário, medido em gramas, do grupo desnutrido ($M = 9,25g \pm DP = 0,23$) comparado ao controle ($M = 12,95g \pm DP = 0,34$). Apesar do grupo desnutrido ter continuado com baixo peso no período de lactação, observou-se que entre o 21º e 35º dia de vida, teve um crescimento acelerado comparado ao controle. O grupo desnutrido ($M = 411,49g \pm DP = 11,16$) apresentou, ao 35º de vida, aumento no crescimento corpóreo superior à 300%, comparado ao controle ($M = 264,48g \pm DP = 5,56$) (Figura 08).

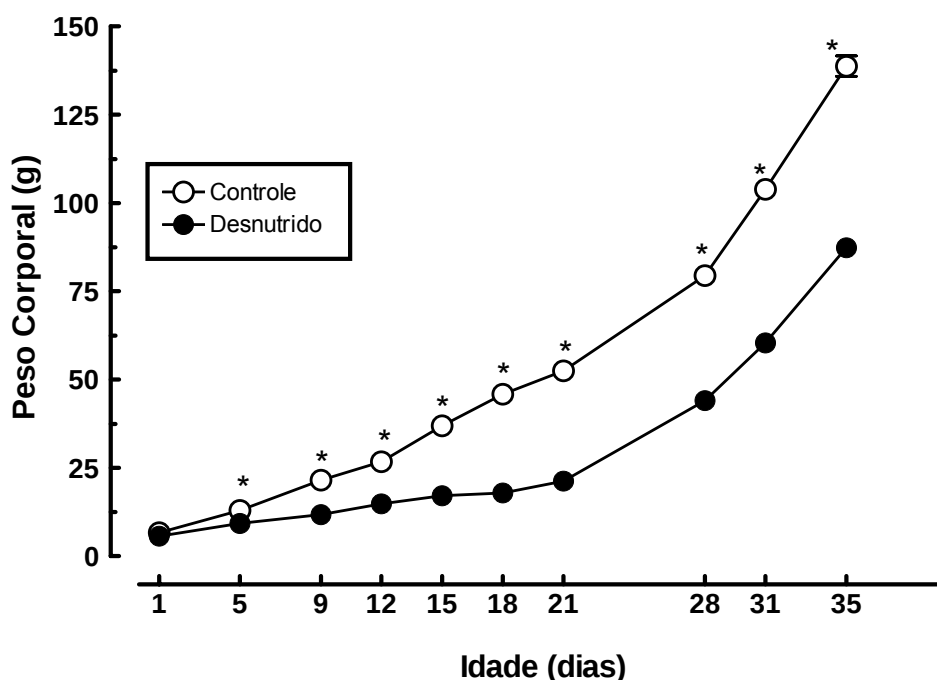


Figura 08 - Efeito da desnutrição protéica perinatal sobre a evolução ponderal em ratos. Fêmeas foram alimentadas com dieta contendo 20% ou 8% (Desnutrido) de proteína durante o período de gestação e lactação. Após o desmame, todos os filhotes do grupo controle ($n=12$) e desnutrido ($n=12$) foram alimentados com dieta padrão do biotério *ad libitum*. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão do peso corporal. * Indica diferença ($p < 0,05$) entre os grupos controle e desnutrido (Two-Way ANOVA para medidas repetidas seguido pelo pós-teste Bonferroni).

5.2 Ingestão alimentar

O grupo que foi exposto à dieta com baixa proteína, durante a gestação e lactação, ingeriu diariamente, após a lactação, uma menor quantidade relativa de

comida comparada ao controle. Contudo, quando a quantidade de comida ingerida foi ajustada ao peso corporal (g de comida ingerida/g de peso corporal), o grupo de baixa proteína ($M = 18g \pm DP = 9,6$), apresentou um aumento ($p < 0,001$) na ingesta alimentar *ad-libitum* durante o período experimental, comparado ao controle ($M = 12,8g \pm DP = 1,62$) (Figura 09).

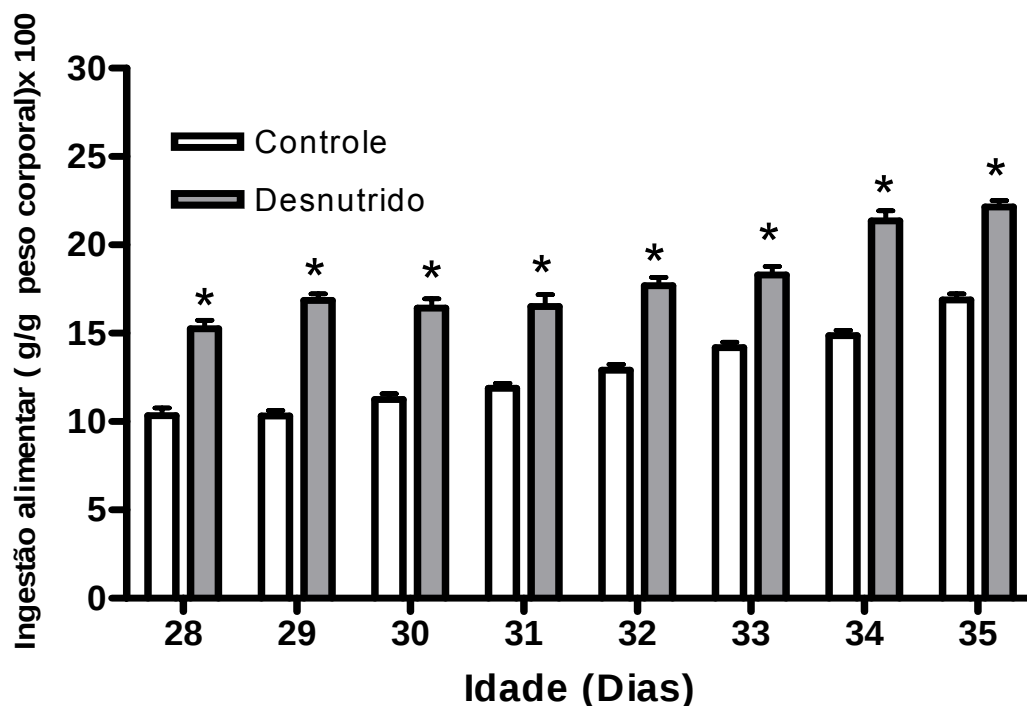


Figura 09 - Efeito da desnutrição protéica perinatal sobre a ingestão alimentar em ratos. Todos procedimentos relacionados à dieta e ao período de desmame estão contidos na figura 08. Foi mensurada a ingestão alimentar diária dos filhotes do 28^o ao 35^o dia de vida. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão. * Indica diferença ($p < 0,001$) entre os grupos (Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni).

5.3 Análise quantitativa de neurônios imunoreativos à TPH (TPH-IR)

Na quantificação dos neurônios imunoreativos à triptofano hidroxilase nos núcleos da rafe, observou-se que os animais desnutridos (NDR: $M = 301.8 \pm DP = 46.3$; NMnR: $M = 88.3 \pm DP = 21.8$), comparados aos controles (NDR: $M = 277.0 \pm DP = 89.4$; NMnR: $M = 127.3 \pm DP = 49.3$) não apresentaram alterações ($p > 0,05$) na expressão dos neurônios imunoreativos à enzima TPH. Quando esses animais foram submetidos à injeção aguda de fenfluramina, foi observado que os animais controles que receberam fenfluramina (NDR: $M = 312 \pm DP = 65.4$; NMR: $M = 123$

$\pm$ DP = 45.2) não alteraram a expressão dos neurônios imunoreativos à TPH nos núcleos da rafe, comparados ao controle que recebeu salina (NDR: M = 277.0 $\pm$ DP = 89.4; NMnR: M = 127.3 $\pm$ DP = 49.3). No entanto, quando os animais desnutridos receberam fenfluramina (NDR: M = 431.0 $\pm$ DP = 67.6) apresentam aumento na quantidade de neurônios imunoreativos à triptofano hidroxilase comparados aos animais desnutridos que receberam salina (NDR: M = 301.8 $\pm$ DP = 46.3) (Figura 10 e 11).

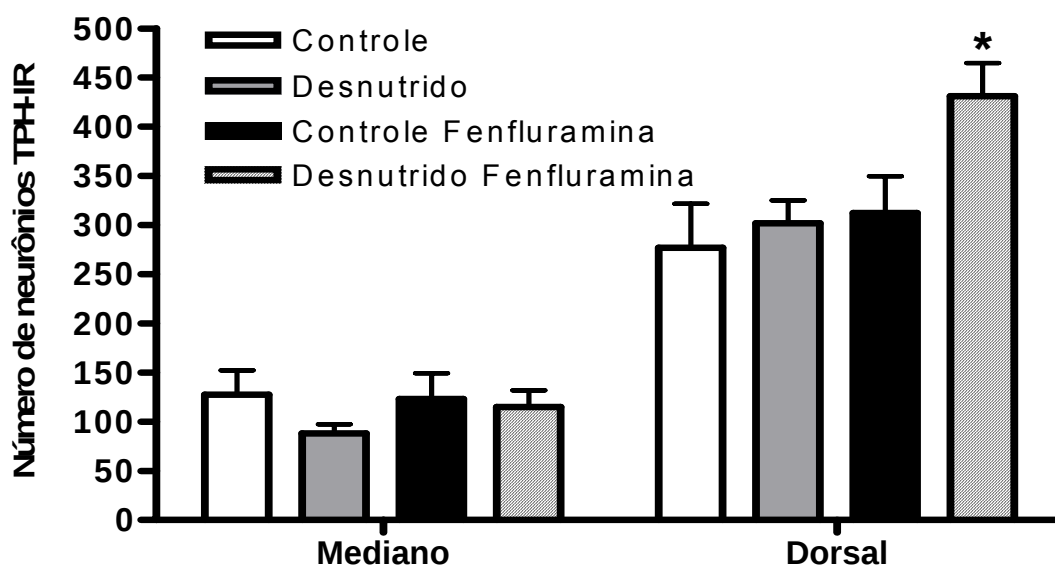


Figura 10 – Efeito da fenfluramina sobre a expressão dos neurônios imunoreativos à enzima Triptofano hidroxilase em animais desnutridos ou normonutridos durante o período perinatal. Todos procedimentos relacionados à dieta e ao período de desmame estão contidos na figura 08. Aos 35 dias de vida os animais receberam injeção aguda de fenfluramina (3mg/kg de peso corporal) ou salina (NaCl 0.9%). Os animais foram perfundidos e seus encéfalos retirados e seccionados (40 μ m de espessura) para procedimento de imunohistoquímica contra a enzima triptofano hidroxilase. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão. * indica diferença ($p < 0,001$) entre os grupos desnutrido salina e desnutrido fenfluramina (Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni).

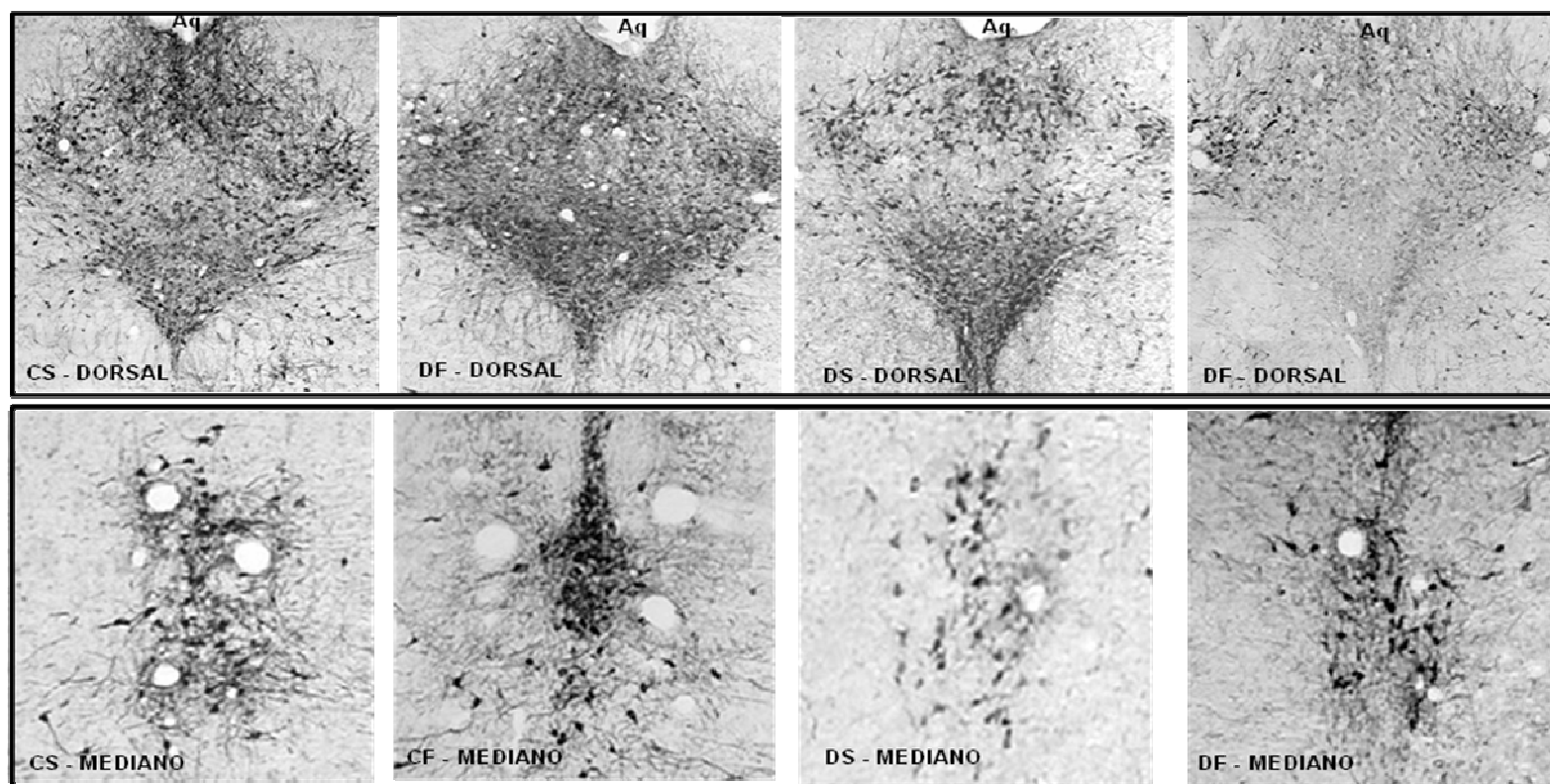


Figura 11 – Fotomicrografia dos neurônios TPH-IR em animais normonutridos e desnutridos estimulados ou não farmacologicamente. Os níveis a partir do Bregma foram: NDR: -7,32mm; NMnR: -7,56mm. Abreviaturas: Aq – Aqueduto Cerebral; CS – Controle Salina; DS – Desnutrido Salina; CF – Controle Fenfluramina e DF – Desnutrido Fenfluramina.

5.4 Análise da distribuição de neurônios imunoreativos à TPH em núcleos da rafe

Quando comparamos o número de células marcadas no núcleo Dorsal, observamos que houve redução ($p < 0,05$), apenas na região rostral do grupo desnutrido (PR: $157,7 \pm 11,11$) quando comparado ao controle (PR: $180,3 \pm 18,3$). Não houve diferença na quantidade de células marcadas entre os grupos controle (salina) (PR: $157,7 \pm 11,11$; PC: $152,9 \pm 14,8$) e controle fenfluramina (PR: $203,9 \pm 16,9$; PC: $180,5 \pm 24,2$). Em contrapartida, o grupo desnutrido fenfluramina (PR: $228,2 \pm 19,1$; PC: $211,2 \pm 10,6$) apresentou aumento ($p < 0,001$) no número de células marcadas quando comparado ao grupo desnutrido salina (PR: $157,7 \pm 11,11$; PC: $138,1 \pm 14,8$) nas regiões analisadas (Figura 12 A, B, C) (TABELA 02).

Tabela 02 – Efeito da desnutrição protéica perinatal na distribuição de neurônios imunoreativos à enzima TPH nas porções rostrais e caudais dos núcleos dorsal e mediano da rafe.

	NÚCLEOS DA RAFE			
	DORSAL		MEDIANO	
Porção	PR	PC	PR	PC
Controle / Desnutrido	-12,4%*	-9,7%	-33,4%***	-35,4%***
Controle / Fenfluramina	+13,1%	+18,0%	-19,3%**	+17,9%*
Desnutrido/ Desnutrido Fenfluramina	+44,6%***	+52,9%***	-15,8%	+18,2%**

O percentual indica a quantidade de neurônios serotoninérgicos marcados com a enzima TPH que aumentaram (+) ou diminuíram (-) nas porções anteriores e posteriores dos núcleos Dorsal e Mediano da rafe. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. controle (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni)

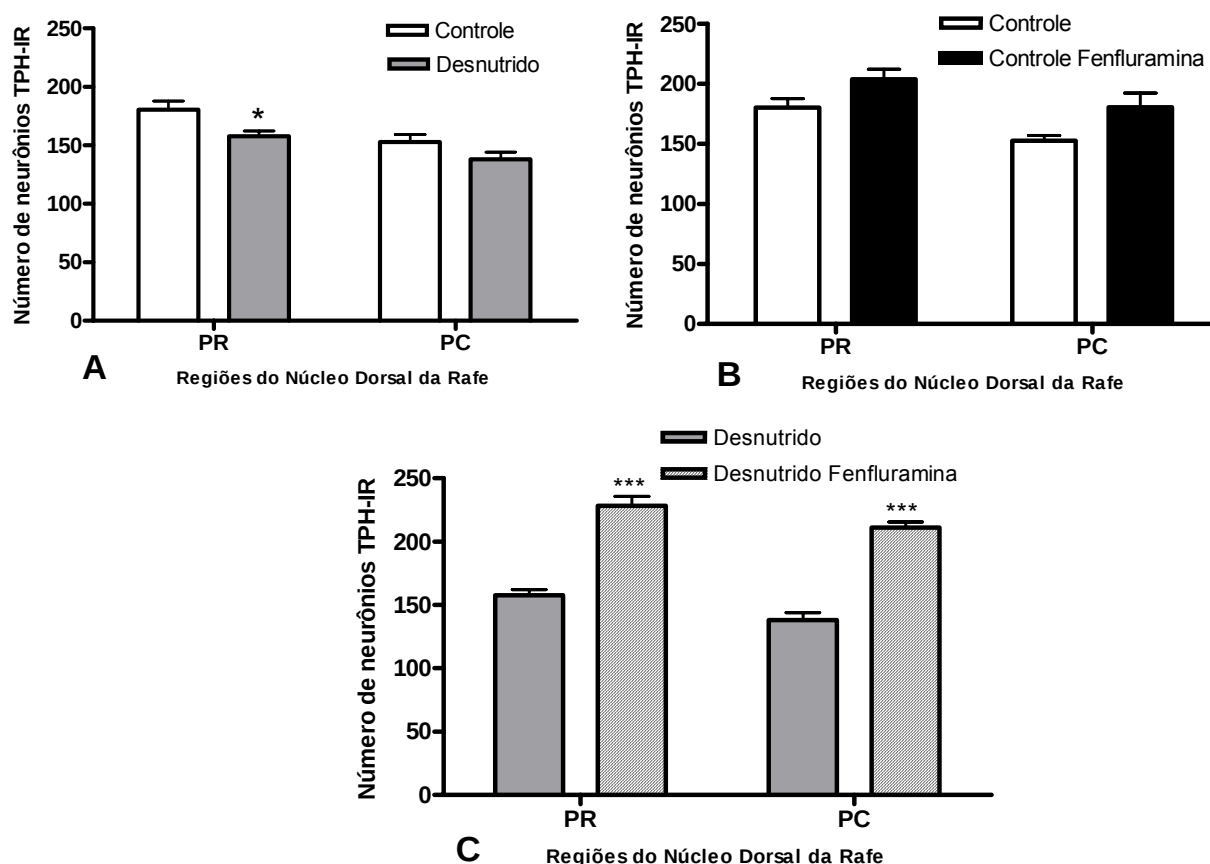


Figura 12 - Efeito da desnutrição protéica (A) perinatal e fenfluramina (B,C) sobre a distribuição de neurônios imunoreativos à enzima TPH nas porções rostral (PR) e caudal (PC) do núcleo dorsal da rafe. Aos 35 dias de vida os animais receberam injeção aguda de fenfluramina (3mg/kg pc) ou salina (NaCl 0.9%). Cortes coronais (40 μ m) do tronco encefálico foram obtidos e submetidos a para procedimento de imunohistoquímica contra a enzima triptofano hidroxilase. Os dados estão representados em média $\pm$ desvio padrão. * ($p < 0,05$) *** ($p < 0,01$) indicam diferença entre os grupos (Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni).

No núcleo Mediano da Rafe, houve diminuição ($p < 0,001$) da quantidade de neurônios serotoninérgicos nas regiões rostral e caudal no grupo desnutrido (PR: $57,1 \pm 4,1$; PC: $51,1 \pm 6,2$) comparado ao grupo controle (PR: $85,8 \pm 5,9$; PC: $79,1 \pm 8,5$). No grupo controle fenfluramina houve redução ($p < 0,05$) na quantidade de neurônios serotoninérgicos na região rostral (PR: $69,3 \pm 3,6$) e aumento ($p < 0,05$) na caudal (PC: $93,3 \pm 7,2$) quando comparado ao grupo controle salina (PR: $85,8 \pm 5,9$; PC: $79,1 \pm 8,5$). No grupo desnutrido fenfluramina houve aumento ($p < 0,01$) no número de células marcadas na região caudal (PC: $60,4 \pm 4,4$)

comparada a mesma região do grupo desnutrido salina (PC: 51,1±6,2) (Figura 13 A, B, C) (TABELA 02).

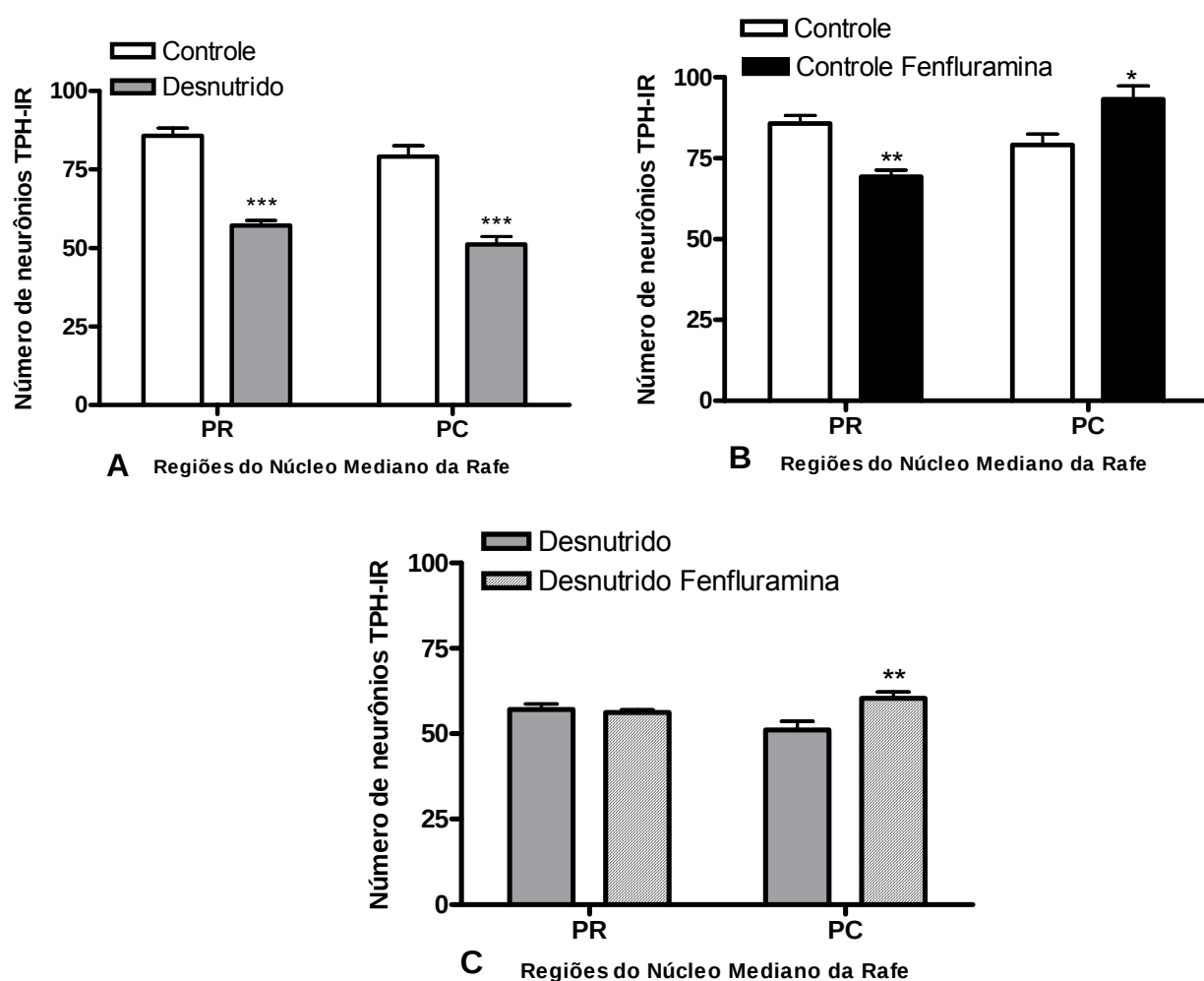


Figura 13 - Efeito da desnutrição protéica perinatal (A) e fenfluramina (B,C) sobre a distribuição de neurônios imunoreativos à enzima TPH por porções rostral e caudal do núcleo mediano da rafe. Aos 35 dias de vida os animais receberam injeção aguda de fenfluramina (3mg/kg pc) ou salina (NaCl 0.9%). Cortes coronais (40µm) do tronco encefálico foram obtidos e submetidos a para procedimento de imunohistoquímica contra a enzima triptofano hidroxilase. Os dados estão representados em média ± desvio padrão. * (p<0,05) ** (p<0.01) *** (p<0.001) indicam diferença entre os grupos (Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, a desnutrição protéica nos períodos de gestação e lactação reduziu o peso corporal em ratos a partir do 5º dia de vida. Contudo, após o desmame, quando ofertado dieta padrão do biotério *ad libitum*, observamos que nos animais desnutridos ocorreu ganho de peso 147% maior que nos animais normonutridos. A desnutrição perinatal não alterou a expressão e distribuição dos neurônios imunoreativos à enzima TPH nos núcleos dorsal e mediano da rafe em condições basais. Porém, a análise de sub-populações neuronais em cada núcleo revelou que a desnutrição reduz ou aumenta o número de neurônios imunoreativos a TPH a depender da porção do núcleo. Quando o sistema serotoninérgico foi estimulado por um inibidor da recaptura da 5-HT e indutor da liberação da serotonina (fenfluramina), observamos aumento na expressão de neurônios imunoreativos à TPH no núcleo dorsal da rafe, o que não foi observado em animais normonutridos. Quanto à distribuição, observamos aumento ou diminuição de células imunoreativas mediante ao quadro de desnutrição e/ou aplicação aguda de fenfluramina. Esse último resultado trouxe importantes informações acerca da organização topográfica de subgrupamentos celulares dentro de um mesmo núcleo e a reatividade específica de cada um à diferentes estímulos.

O baixo peso corporal e o atraso no crescimento corpóreo vistos nos animais que foram submetidos à dieta pobre em proteína durante os períodos gestacional e lactacional, caracterizou o quadro de desnutrição desses animais, como em outros estudos (Miller, Leahy *et al.*, 1977; Manjarrez, Chagoya *et al.*, 1988; Manjarrez, Magdaleno *et al.*, 1996). O retardo no ganho de peso corporal persistiu mesmo quando a dieta normaprotéica foi ofertada após o desmame (Bieswal, Ahn *et al.*, 2006). Por outro lado, a desnutrição protéica parece estar associada ao aumento do consumo alimentar diário após o desmame (Desai, Weindruch *et al.*, 1996; Vickers, Breier *et al.*, 2000; Desai, Gayle *et al.*, 2005; Bellinger, Sculley *et al.*, 2006). Isso ocorre como forma de compensar o déficit de nutrientes ocorrido naquele período crítico de desenvolvimento, ocasionando um *catch-up* de crescimento como aquele observado no presente estudo (Prader, 1978).

A desnutrição não modificou a quantidade de neurônios imunoreativos à enzima triptofano hidroxilase nos núcleos Dorsal e Mediano da rafe. Contudo, alguns autores observaram aumento na concentração e/ou na atividade da enzima TPH em animais desnutridos (Kalyanasundaram, 1976; Miller, Leahy *et al.*, 1977;

Manjarrez, Chagoya *et al.*, 1988; 1994; Manjarrez, Manuel *et al.*, 2003). Na utilização da desnutrição protéico-calórica duas semanas antes da gestação (Manjarrez, Chagoya *et al.*, 1994), ou na gestação e lactação (Manjarrez, Chagoya *et al.*, 1994; Manjarrez, Manuel *et al.*, 2003) foi encontrado aumento na atividade da TPH. Outro estudo com desnutrição protéica na gestação e lactação demonstrou aumento dos níveis de triptofano hidroxilase ao nascimento (Kalyanasundaram, 1976). Porém aos 35º dias de vida, depois de 14 dias de recuperação nutricional, houve redução desses níveis (Kalyanasundaram, 1976). Podemos observar que os modelos de desnutrição utilizados nos estudos supracitados, variaram no tipo de macronutriente, na duração da restrição protéica, bem como a redução do aporte energético por ligadura da artéria uterina (Manjarrez, Chagoya *et al.*, 1988). Outra variável importante é a obtenção da amostra com alguns estudos utilizando um “pool”, ou seja, vários encéfalos, formando um homogeneizado, para apenas uma análise de concentração de TPH (Manjarrez, Chagoya *et al.*, 1988). Em contrapartida, nosso estudo apresenta um caráter morfológico ao evidenciar os efeitos da desnutrição sobre o número de neurônios que expressam a TPH, bem como sua distribuição. É interessante ressaltar que o tipo de desnutrição, o período de ocorrência da mesma e os métodos de cada experimento para analisar a expressão da enzima triptofano hidroxilase podem ter influenciado na divergência entre os estudos.

Quando o sistema serotoninérgico foi estimulado por inibidor de recaptura da serotonina, foi possível observar as repercussões promovidas pela desnutrição precoce sobre a expressão e distribuição de neurônios imunoreativos à TPH. Observamos, particularmente, aumento na quantidade de neurônios imunoreativos à TPH no núcleo dorsal da rafe. Essa droga, quando administrada agudamente e em baixas doses, aumenta os níveis de serotonina na fenda sináptica do SNC de ratos por inibir ou bloquear a recaptura da serotonina (Fattaccini, Gozlan *et al.*, 1991) bem como induzindo a liberação deste neurotransmissor (Garattini, Mennini *et al.*, 1986; Fuller, Snoddy *et al.*, 1988; Sarkissian, Wurtman *et al.*, 1990; Fattaccini, Gozlan *et al.*, 1991; Gobbi, Mancini *et al.*, 1996; Semple-Rowland, Mahatme *et al.*, 1996). Contudo, esses mecanismos não parecem suficientes para esclarecerem a depleção da 5-HT cerebral induzida por esta droga, observados a longo-prazo (Corrodi, Farnebo *et al.*, 1975). Apesar disso, a fenfluramina não parece inibir diretamente a enzima triptofano hidroxilase. É possível que a

fenfluramina prolongue a ativação dos receptores serotoninérgicos, determinando como *feedback*, inibição da TPH e conseqüentemente, diminuição da 5-HT (Invernizzi, Kmiecik-Kolada *et al.*, 1982). O aumento na síntese de serotonina em resposta a fenfluramina ocorre pela necessidade de re-preenchimento das vesículas sinápticas (Muck-Seler e Diksic, 1996). A fenfluramina atua sobre a conversão de triptofano para serotonina em uma relação temporal, ou seja, promove aumento nessa conversão até duas horas após a sua injeção e redução após quatro horas (Costa, Groppetti *et al.*, 1971; Knapp, Mandell *et al.*, 1975). O aumento da síntese de serotonina pode ou não estar associado a aumento na expressão de RNAm da TPH (Ratnayake, Wotherspoon *et al.*, 1994; Semple-Rowland, Mahatme *et al.*, 1996). No presente estudo, observamos que a fenfluramina não promoveu alterações no número de neurônios imunoreativos a TPH no núcleo mediano da rafe. Alguns estudos relatam diferenças na responsividade desses núcleos a determinados fármacos, sendo o núcleo dorsal mais vulnerável a esses estímulos (Ratnayake, Wotherspoon *et al.*, 1994; Muck-Seler e Diksic, 1996). Isto pode estar relacionado a diferenças morfológicas nos terminais axonais desses dois núcleos. Os terminais axonais são muito finos e fusiformes no NDR e largos no NMnR (Molliver, 1987). Esses resultados apontam para uma programação do organismo desnutrido na expressão da enzima TPH no núcleo dorsal da rafe. No entanto, essa seqüela apenas atua em momento de demanda do sistema serotoninérgico, como ocorreu com o estímulo da fenfluramina. Vários estudos demonstram que organismos submetidos a desnutrição durante período inicial da vida apresentam-se sem seqüelas aparentes até serem requisitados por uma demanda externa (Muck-Seler e Diksic, 1996).

Diferentes resultados foram observados no estudo topográfico dos neurônios imunoreativos a TPH dentro de um mesmo núcleo. Encontramos distintos efeitos da desnutrição a depender das porções rostral ou caudal dos núcleos dorsal e mediano da rafe. A topografia rostro-caudal dentro desses núcleos nos mostra que os mesmos são heterogêneos, porém, organizados para que cada sub-grupamento tenha projeções distintas para diferentes áreas corticais (Molliver, 1987).

No núcleo dorsal da rafe observamos que a desnutrição diminuiu a quantidade de neurônios imunoreativos a TPH apenas na região rostral. Por outro lado, quando os animais desnutridos receberam estímulo do sistema

serotoninérgico, com a fenfluramina, apresentaram aumento de neurônios imunoreativos a TPH nas porções rostral e caudal do núcleo dorsal da rafe. Bendotti e colaboradores (1993) identificaram maior sensibilidade da porção rostral, comparada a caudal, do núcleo dorsal da rafe à ação da fenfluramina. Neste estudo houve redução na expressão de RNAm do transportador da serotonina em resposta a fenfluramina apenas na porção rostral do dorsal (Bendotti, Baldessari *et al.*, 1993). As projeções que partem da porção rostral do núcleo dorsal parecem estar envolvidas com mecanismos de memória, funções psíquicas (Austin, Beiswanger *et al.*, 1992) e funções integradas à motricidade (Wilson, Molliver, 1991). Se alterarmos a quantidade de neurônios serotoninérgicos dentro do núcleo, provavelmente prejudicaremos as projeções e, conseqüentemente, as funções envolvidas nesse circuito. Nesse sentido, alguns estudos afirmam que organismos desnutridos em períodos iniciais da vida apresentam, em longo prazo, distúrbios de memória (Olton, 1983; Morgane, 1992) comprometimento da postura e locomoção em animais (Waterhouse, Mihailoff *et al.*, 1986).

No núcleo mediano da rafe, a desnutrição diminuiu a quantidade de neurônios imunoreativos a TPH nas porções rostral e caudal. As projeções desse núcleo inervam estruturas responsáveis pelo ritmo circadiano, processamento da atenção e comportamento emocional (Morgane, 1992). Estudos relacionados a distúrbios nutricionais resultaram em alterações nos mecanismos associados ao estágio REM (*Rapid Eye Movement*) do sono (Morgane, 1992), redução permanente da capacidade intelectual em humanos (Dobbing, 1970) e déficit de atenção em crianças desnutridas precocemente (Dobbing, 1970). Em contrapartida, observou-se aumento no número de neurônios imunoreativos a TPH na porção caudal do núcleo mediano da rafe em resposta a fenfluramina em animais normonutridos ou desnutridos. Mais uma vez observamos que a desnutrição perinatal pode alterar a quantidade de neurônios serotoninérgicos, mas as maiores modificações serão observadas apenas com o aumento da demanda externa, como ocorre na exposição à fenfluramina.

Um dos principais resultados desse estudo é a resposta do núcleo dorsal da rafe de organismos desnutridos a fenfluramina. Sabemos que esse núcleo contém a maior quantidade de neurônios serotoninérgicos no encéfalo (Steinbusch, 1981), com aproximadamente 235.000 neurônios no encéfalo de

humano (Abrams, Johnson *et al.*, 2004). A quantidade de células desse núcleo sugere a amplitude de funções moduladas por ele. Assim, torna-se de grande relevância o conhecimento das alterações observadas no presente estudo devido a desnutrição perinatal. Com aumento na quantidade de neurônios imunoreativos a TPH em resposta a fenfluramina, sugerimos algumas vias de ação que podem ter sido alteradas. Estudos com receptores serotoninérgicos em organismos com histórico de desnutrição demonstram, muitas vezes, diminuição da sua sensibilidade (Lopes de Souza *et al.*, 2008). A fenfluramina parece não atuar diretamente sobre a enzima triptofano hidroxilase, mas o aumento de serotonina na fenda sináptica promovida por ela pode atuar sobre o auto-receptor 5-HT_{1B} e modular assim a síntese de serotonina (Garattini, Caccia *et al.*, 1979; Hjorth, Suchowski *et al.*, 1995). Quando estimulado pela serotonina, o receptor 5-HT_{1B} inibe a fosforilação da TPH. A ativação da triptofano hidroxilase ocorrida pela redução do tônus dos receptores 5-HT_{1B}, envolve a proteína kinase A (Stenfors e Ross, 2002). A maioria dos receptores 5-HT₁ está ligada à proteína G, que irá afetar a atividade da via adenilato ciclase. Esta por sua vez, via ATP-AMPCíclico, ativará a proteína kinase A, resultando na fosforilação da TPH. O animal desnutrido no período inicial da vida parece apresentar hiporesponsividade dos receptores 5-HT_{1B} (Lopes de Souza *et al.*, 2008). A expressão de RNAm 5HT_{1B} é inversamente relacionada a expressão de RNAm TPH2 (Hiroi e Neumaier, 2009). Assim, fatores que inibem o receptor 5-HT_{1B}, como os estrógenos, aumentam a produção de TPH 2 (Hiroi e Neumaier, 2009). A hiporesponsividade desse receptor em desnutridos, pode estar relacionada a maior quantidade de neurônios imunoreativos a TPH em resposta a fenfluramina observada no presente estudo.

Em suma, nós mostramos que a desnutrição protéica durante o desenvolvimento perinatal alterou a quantidade e distribuição dos neurônios serotoninérgicos nos núcleos dorsal e mediano da rafe. As alterações permanecem mascaradas durante a atividade basal, mas se apresentam quando há demanda externa do sistema serotoninérgico. Assim, observamos aumento no número de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe em organismos desnutridos e diferentes distribuições em sub-populações neuronais de cada núcleo. Esses resultados evidenciam que o fator programador da desnutrição sobre o sistema serotoninérgico não ocorre apenas na concentração de serotonina

ou na atividade da enzima limitante de sua síntese, mas também na organização topográfica de grupamentos neuronais nos núcleos da rafe.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos da nossa pesquisa, é possível tecer algumas considerações pertinentes:

- A desnutrição perinatal promove aumento no número de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe. Repercussão observada apenas quando o sistema é requisitado pela fenfluramina.
- A topografia de sub-grupamentos neuronais dos núcleos mediano e dorsal da rafe pode evidenciar distintas características do núcleo em resposta a desnutrição perinatal.

8. REFERÊNCIAS

Abrams, J. K., P. L. Johnson, *et al.* Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. Ann N Y Acad Sci, v.1018, Jun, p.46-57. 2004.

Alfaro-Rodriguez, A., R. Gonzalez-Pina, *et al.* Serotonin and 5-hydroxy-indole-acetic acid contents in dorsal raphe and suprachiasmatic nuclei in normal, malnourished and rehabilitated rats under 24 h of sleep deprivation. Brain Res, v.1110, n.1, Sep 19, p.95-101. 2006.

Austin, K. B., C. Beiswanger, *et al.* Prenatal protein malnutrition alters behavioral state modulation of inhibition and facilitation in the dentate gyrus. Brain Res Bull, v.28, n.2, Feb, p.245-55. 1992.

Bach-Mizrachi, H., M. D. Underwood, *et al.* Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides. Mol Psychiatry, v.13, n.5, May, p.507-13, 465. 2008.

Baker, K. G., G. M. Halliday, *et al.* Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. J Comp Neurol, v.301, n.2, Nov 8, p.147-61. 1990.

Barker, D. J. Intrauterine programming of adult disease. Mol Med Today, v.1, n.9, Dec, p.418-23. 1995.

Beck, S. G., Y. Z. Pan, *et al.* Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. J Neurophysiol, v.91, n.2, Feb, p.994-1005. 2004.

Bell, A. W. e R. A. Ehrhardt. Regulation of placental nutrient transport and implications for fetal growth. Nutr Res Rev, v.15, n.2, Dec, p.211-30. 2002.

Bellinger, L., D. V. Sculley, *et al.* Exposure to undernutrition in fetal life determines fat distribution, locomotor activity and food intake in ageing rats. Int J Obes (Lond), v.30, n.5, May, p.729-38. 2006.

Bendotti, C., S. Baldessari, *et al.* Effect of d-fenfluramine and 5,7-dihydroxytryptamine on the levels of tryptophan hydroxylase and its mRNA in rat brain. Brain Res Mol Brain Res, v.19, n.3, Aug, p.257-61. 1993.

Bieswal, F., M. T. Ahn, *et al.* The importance of catch-up growth after early malnutrition for the programming of obesity in male rat. Obesity (Silver Spring), v.14, n.8, Aug, p.1330-43. 2006.

Birdsall, T. C. 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. Altern Med Rev, v.3, n.4, Aug, p.271-80. 1998.

Blundell, J. E., C. L. Lawton, *et al.* Serotonin, eating behavior, and fat intake. Obes Res, v.3 Suppl 4, Nov, p.471S-476S. 1995.

Boadle-Biber, M. C. Regulation of serotonin synthesis. Prog Biophys Mol Biol, v.60, n.1, p.1-15. 1993.

Bradley, P. B. The characterization of 5-HT receptors. Introduction. Neuropharmacology, v.23, n.12B, Dec, p.1465-6. 1984.

Breier, B. H., M. H. Vickers, *et al.* Fetal programming of appetite and obesity. Mol Cell Endocrinol, v.185, n.1-2, Dec 20, p.73-9. 2001.

Carkaci-Salli, N., J. M. Flanagan, *et al.* Functional domains of human tryptophan hydroxylase 2 (hTPH2). J Biol Chem, v.281, n.38, Sep 22, p.28105-12. 2006.

Commons, K. G., K. R. Connolley, *et al.* A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders. Neuropsychopharmacology, v.28, n.2, Feb, p.206-15. 2003.

Corrodi, H., L. O. Farnebo, *et al.* Effect of ergot drugs on central 5-hydroxytryptamine neurons: evidence for 5-hydroxytryptamine release or 5-hydroxytryptamine receptor stimulation. Eur J Pharmacol, v.30, n.2, Feb, p.172-81. 1975.

Costa, E., A. Groppetti, *et al.* Action of fenfluramine on monoamine stores of rat tissues. Br J Pharmacol, v.41, n.1, Jan, p.57-64. 1971.

Culley, W. J., R. N. Saunders, *et al.* Effect of a tryptophan deficient diet on brain serotonin and plasma tryptophan level. Proc Soc Exp Biol Med, v.113, Jul, p.645-8. 1963.

Dahlstroem, A. e K. Fuxe. 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, p.SUPPL 232:1-55. 1964.

De Souza, S. L., M. I. Nogueira, *et al.* Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. Physiol Behav, v.82, n.2-3, Sep 15, p.375-9. 2004.

Desai, M., D. Gayle, *et al.* Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.288, n.1, Jan, p.R91-6. 2005.

Desai, V. G., R. Weindruch, *et al.* Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. Arch Biochem Biophys, v.333, n.1, Sep 1, p.145-51. 1996.

Descarries, L., K. C. Watkins, *et al.* The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. J Comp Neurol, v.207, n.3, May 20, p.239-54. 1982.

Dobbing J. Undernutrition and the developing brain. The relevance of animal models to the human problem. Am. J. Dis. Child., v. 120, n. 5, Nov, p. 411-5. 1970.

Fattaccini, C. M., H. Gozlan, *et al.* Differential effects of d-fenfluramine and p-chloroamphetamine on H75/12-induced depletion of 5-hydroxytryptamine and dopamine in the rat brain. Neuropharmacology, v.30, n.1, Jan, p.15-23. 1991.

Fernstrom, J. D. e R. J. Wurtman. Brain serotonin content: physiological dependence on plasma tryptophan levels. Science, v.173, n.992, Jul 9, p.149-52. 1971.

Ferreira, E. S. W. T., B. A. Galvao, *et al.* Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide released by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rats. Neuroimmunomodulation, v.16, n.4, p.219-27. 2009.

Forbes, W.B., W.C. Stern, *et al.* Effects of chronic protein malnutrition on experimentally induced seizures in the rat. Exp. Neurol., v.62, n.2, Nov, p. 475-81, 1978.

Fowden, A. L., C. Sibley, *et al.* Imprinted genes, placental development and fetal growth. Horm Res, v.65 Suppl 3, p.50-8. 2006.

Fuller, R. W., H. D. Snoddy, *et al.* Mechanisms of effects of d-fenfluramine on brain serotonin metabolism in rats: uptake inhibition versus release. Pharmacol Biochem Behav, v.30, n.3, Jul, p.715-21. 1988.

Gal, E. M. Hydroxylation of tryptophan and its control in brain. Pavlov J Biol Sci, v.10, n.3, Jul-Sep, p.145-60. 1975.

Garattini, S., S. Caccia, *et al.* Biochemical pharmacology of the anorectic drug fenfluramine: a review. Curr. Med. Res. Opin, v.6, n.1, p.15-27. 1979.

Garattini, S., T. Mennini, *et al.* Neurochemical mechanism of action of drugs which modify feeding via the serotonergic system. Appetite, v.7 Suppl, p.15-38. 1986.

Gobbi, M., L. Mancini, *et al.* Down-regulation of rat brain 5-HT uptake carriers after treatment with high doses of D-fenfluramine. Brain Res, v.730, n.1-2, Aug 19, p.165-72. 1996.

Godfrey, K. e S. Robinson. Maternal nutrition, placental growth and fetal programming. Proc Nutr Soc, v.57, n.1, Feb, p.105-11. 1998.

Gootwine, E. Placental hormones and fetal-placental development. Anim Reprod Sci, v.82-83, Jul, p.551-66. 2004.

Grahame-Smith, D. G. Tryptophan hydroxylation in brain. Biochem Biophys Res Commun, v.16, n.6, Aug 11, p.586-92. 1964.

Hamon, M., S. Bourgoïn, *et al.* The respective roles of tryptophan uptake and tryptophan hydroxylase in the regulation of serotonin synthesis in the central nervous system. J Physiol (Paris), v.77, n.2-3, p.269-79. 1981.

Hensler, J. G., R. C. Ferry, *et al.* Quantitative autoradiography of the serotonin transporter to assess the distribution of serotonergic projections from the dorsal raphe nucleus. Synapse, v.17, n.1, May, p.1-15. 1994.

Hernandez, J., G. G. Manjarrez, *et al.* Newborn humans and rats malnourished in utero: free plasma L-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. Brain Res, v.488, n.1-2, May 29, p.1-13. 1989.

Hiroi, R. e J. F. Neumaier. Estrogen decreases 5-HT_{1B} autoreceptor mRNA in selective subregion of rat dorsal raphe nucleus: inverse association between gene expression and anxiety behavior in the open field. Neuroscience, v.158, n.2, Jan 23, p.456-64. 2009.

Hjorth, S., C. S. Suchowski, *et al.* Evidence for 5-HT autoreceptor-mediated, nerve impulse-independent, control of 5-HT synthesis in the rat brain. Synapse, v.19, n.3, Mar, p.170-6. 1995.

Hornung, J. P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. J Chem Neuroanat, v.26, n.4, Dec, p.331-43. 2003.

Hussain, A. M. e A. K. Mitra. Effect of aging on tryptophan hydroxylase in rat brain: implications on serotonin level. Drug Metab Dispos, v.28, n.9, Sep, p.1038-42. 2000.

Imai, H., M. R. Park, *et al.* The morphology and divergent axonal organization of midbrain raphe projection neurons in the rat. Brain Dev, v.8, n.4, p.343-54. 1986.

Invernizzi, R., K. Kmiecik-Kolada, *et al.* Is receptor activation involved in the mechanism by which (+)-fenfluramine and (+)-norfenfluramine deplete 5-hydroxytryptamine in the rat brain? Br J Pharmacol, v.75, n.3, Mar, p.525-30. 1982.

Jacobs, B. L. e E. C. Azmitia. Structure and function of the brain serotonin system. Physiol Rev, v.72, n.1, Jan, p.165-229. 1992.

Jacobs, B. L., S. L. Foote, *et al.* Differential projections of neurons within the dorsal raphe nucleus of the rat: a horseradish peroxidase (HRP) study. Brain Res, v.147, n.1, May 19, p.149-53. 1978.

Jequier, E., W. Lovenberg, *et al.* Tryptophan hydroxylase inhibition: the mechanism by which p-chlorophenylalanine depletes rat brain serotonin. Mol Pharmacol, v.3, n.3, May, p.274-8. 1967.

Kalyanasundaram, S. Effect of dietary protein and calorie deficiency on tryptophan levels in the developing rat brain. J Neurochem, v.27, n.5, Nov, p.1245-7. 1976.

Knapp, S. e A. J. Mandell. Coincidence of blockade of synaptosomal 5-hydroxytryptamine uptake and decrease in tryptophan hydroxylase activity: effects of fenfluramine. J Pharmacol Exp Ther, v.198, n.1, Jul, p.123-32. 1976.

Knapp, S., A. J. Mandell, *et al.* Calcium activation of brain tryptophan hydroxylase. Life Sci, v.16, n.10, May 15, p.1583-93. 1975.

Lam, D. D. e L. K. Heisler. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. Expert Rev Mol Med, v.9, n.5, p.1-24. 2007.

Lauder, J. M. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. Trends Neurosci, v.16, n.6, Jun, p.233-40. 1993.

Leibowitz, S. F. e J. T. Alexander. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. Biol Psychiatry, v.44, n.9, Nov 1, p.851-64. 1998.

Lerer, B., B. Shapira, *et al.* Antidepressant and cognitive effects of twice- versus three-times-weekly ECT. Am J Psychiatry, v.152, n.4, Apr, p.564-70. 1995.

Lidov, H. G. e M. E. Molliver. Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. Brain Res Bull, v.9, n.1-6, Jul-Dec, p.559-604. 1982.

Lopes De Souza, S., R. Orozco-Solis, *et al.* Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. Eur J Neurosci, v.27, n.6, Mar, p.1400-8. 2008.

Lowry, C. A., M. W. Hale, *et al.* Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. Ann N Y Acad Sci, v.1148, Dec, p.86-94. 2008.

Lucas, A. Programming by early nutrition in man. Ciba Found Symp, v.156, p.38-50; discussion 50-5. 1991.

Manjarrez, G., A. L. Manuel, *et al.* Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. Int J Dev Neurosci, v.21, n.5, Aug, p.283-9. 2003.

Manjarrez, G. G., G. G. Chagoya, *et al.* Desnutrición intrauterina. II. L-triptófano, triptófano-5-hidroxilasa y serotonina en el cerebro de rata. Bol. Med. Hops. Infant. Mex, v.45, n.12, Diciembre, p.808-816. 1988.

_____. Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. Int J Dev Neurosci, v.12, n.8, Dec, p.695-702. 1994.

Manjarrez, G. G., V. M. Magdaleno, *et al.* Nutritional recovery does not reverse the activation of brain serotonin synthesis in the ontogenetically malnourished rat. Int J Dev Neurosci, v.14, n.5, Aug, p.641-8. 1996.

Mcardle, H. J., H. S. Andersen, *et al.* Fetal programming: causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats -- a review. Placenta, v.27 Suppl A, Apr, p.S56-60. 2006.

Miller, M., J. P. Leahy, *et al.* Tryptophan availability: relation to elevated brain serotonin in developmentally protein-malnourished rats. Exp Neurol, v.57, n.1, Oct, p.142-57. 1977.

Molliver, M. E. Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. J Clin Psychopharmacol, v.7, n.6 Suppl, Dec, p.3S-23S. 1987.

Morgane, P. J., R. Austin-Lafrance, *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. Neurosci Biobehav Rev, v.17, n.1, Spring, p.91-128. 1993.

Morin, L. P. e E. L. Meyer-Bernstein. The ascending serotonergic system in the hamster: comparison with projections of the dorsal and median raphe nuclei. Neuroscience, v.91, n.1, p.81-105. 1999.

Muck-Seler, D. e M. Diksic. DL-fenfluramine increases the 5-HT synthesis rate in the terminals while decreasing it in the cell bodies of the rat brain. Brain Res, v.737, n.1-2, Oct 21, p.45-50. 1996.

Nakamura, K., Y. Sugawara, *et al.* Late developmental stage-specific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels. J Neurosci, v.26, n.2, Jan 11, p.530-4. 2006.

Neckers, L. M., G. Biggio, *et al.* Modulation of brain tryptophan hydroxylase activity by brain tryptophan content. J Pharmacol Exp Ther, v.201, n.1, Apr, p.110-6. 1977.

Oscos, A. e R. J. Hernandez. Gestational malnutrition and drugs affecting brain serotonin: effects of temporal control behavior. Behav Neural Biol, v.34, n.4, Apr, p.358-71. 1982.

Prader, A. Catch-up growth. Postgrad Med J, v.54 Suppl 1, p.133-46. 1978.

Ratray, M., G. Wotherspoon, *et al.* Chronic D-fenfluramine decreases serotonin transporter messenger RNA expression in dorsal raphe nucleus. Eur J Pharmacol, v.268, n.3, Aug 16, p.439-42. 1994.

Redmer, D. A., J. M. Wallace, *et al.* Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. Domest Anim Endocrinol, v.27, n.3, Oct, p.199-217. 2004.

Resnick, O. e P. J. Morgane. Ontogeny of the levels of serotonin in various parts of the brain in severely protein malnourished rats. Brain Res, v.303, n.1, Jun 11, p.163-70. 1984.

Reynolds, L. P., P. P. Borowicz, *et al.* Animal models of placental angiogenesis. Placenta, v.26, n.10, Nov, p.689-708. 2005.

Sarkissian, C. F., R. J. Wurtman, *et al.* Effects of fluoxetine or D-fenfluramine on serotonin release from, and levels in, rat frontal cortex. Brain Res, v.529, n.1-2, Oct 8, p.294-301. 1990.

Semple-Rowland, S. L., A. Mahatme, *et al.* Effects of dexfenfluramine or 5,7-dihydroxytryptamine on tryptophan hydroxylase and serotonin transporter mRNAs in rat dorsal raphe. Brain Res Mol Brain Res, v.41, n.1-2, Sep 5, p.121-7. 1996.

Sodero, A. O., O. A. Orsingher, *et al.* Altered serotonergic function of dorsal raphe nucleus in perinatally protein-deprived rats: effects of fluoxetine administration. Eur J Pharmacol, v.532, n.3, Feb 27, p.230-5. 2006.

Sparks, D. L., W. R. Markesbery, *et al.* Age-associated alteration of serotonergic synaptic neurochemistry in rat rostral hypothalamus. Neurobiol Aging, v.6, n.3, Fall, p.213-7. 1985.

Steinbusch, H. W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. Neuroscience, v.6, n.4, p.557-618. 1981.

Stenfors, C. e S. B. Ross. Evidence for involvement of protein kinases in the regulation of serotonin synthesis and turnover in the mouse brain in vivo. J Neural Transm, v.109, n.11, Nov, p.1353-63. 2002.

Toscano, A. E., R. Manhaes-De-Castro, *et al.* Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. Nutrition, v.24, n.3, Mar, p.270-8. 2008.

Vertes, R. P., W. J. Fortin, *et al.* Projections of the median raphe nucleus in the rat. J Comp Neurol, v.407, n.4, May 17, p.555-82. 1999.

Vickers, M. H., B. H. Breier, *et al.* Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.279, n.1, Jul, p.E83-7. 2000.

Wallace, J. A. e J. M. Lauder. Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. Brain Res Bull, v.10, n.4, Apr, p.459-79. 1983.

Walther, D. J. e M. Bader. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. Biochem Pharmacol, v.66, n.9, Nov 1, p.1673-80. 2003.

Waterhouse, B.D., G.A. Mihailoff, *et al.* Topographical distribution of dorsal and median raphe neurons projecting to motor, sensorimotor and visual cortical areas in the rat. J. Comp. Neurol., v. 249, n.4, jul 22, p. 460-76, 478-81. 1986.

Wilson, M.A. e M. E. Molliver. The organization of serotonergic projections to cerebral cortex in primates: retrograde transport studies. Neuroscience. v.44, n.3, p.555-70. 1991.

Wiklund, L., L. Leger, *et al.* Monoamine cell distribution in the cat brain stem. A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and locus coeruleus cell groups. J Comp Neurol, v.203, n.4, Dec 20, p.613-47. 1981.

Wu, J., X. Y. Liu, *et al.* [Effects of intrauterine acute ischemia on epidermal growth factor and its receptor of the fetal kidney in rats]. Zhonghua Er Ke Za Zhi, v.41, n.8, Aug, p.614-5. 2003.

Zhang, X., J. M. Beaulieu, *et al.* Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. Science, v.305, n.5681, Jul 9, p.217. 2004.

ANEXOS

ANEXO I

COUNCIL DIRECTIVE of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC)

THE COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES,

Having regard to the Treaty establishing the European Economic Community, and in particular

Article 100 thereof,

Having regard to the proposal from the Commission (1),

Having regard to the opinion of the European Parliament (2),

Having regard to the opinion of the Economic and Social Committee (3),

Whereas there exist between the national laws at present in force for the protection of animals used for certain experimental purposes disparities which may affect the functioning of the common market;

Whereas, in order to eliminate these disparities, the laws of the Member States should be harmonized; whereas such harmonization should ensure that the number of animals used for experimental or other scientific purposes is reduced to a minimum, that such animals are adequately cared for, that no pain, suffering, distress or lasting harm are inflicted unnecessarily and ensure that, where unavoidable, these shall be kept to the minimum;

Whereas, in particular, unnecessary duplication of experiments should be avoided,

(1) OJ N° C 351, 31. 12. 1985, p. 16.

(2) OJ N° C 255, 13. 10. 1986, p. 250.

(3) OJ N° C 207, 18. 8. 1986, p. 3.

HAS ADOPTED THIS DIRECTIVE:

Article 1

The aim of this Directive is to ensure that where animals are used for experimental or other scientific purposes the provisions laid down by law, regulation or administrative provisions in the Member States for their protection are approximated so as to avoid affecting the establishment and functioning of the common market, in particular by distortions of competition or barriers to trade.

Article 2

For the purposes of this Directive the following definitions shall apply:

(a) 'animal' unless otherwise qualified, means any live non-human vertebrate, including free-living larval and/or reproducing larval forms, but excluding foetal or embryonic forms;

(b) 'experimental animals' means animals used or to be used in experiments;

(c) 'bred animals' means animals specially bred for use in experiments in facilities approved by, or registered with, the authority;

(d) 'experiment' means any use of an animal for experimental or other scientific purposes which may cause it pain, suffering, distress or lasting harm, including any course of action intended, or liable, to result in the birth of an animal in any such condition, but excluding the least painful methods accepted in modern practice (i.e. 'humane' methods) of killing or marking an animal; an experiment starts when an animal is first prepared for use and ends when no further observations are to be

made for that experiment; the elimination of pain, suffering, distress or lasting harm by the successful use of anaesthesia or analgesia or other methods does not place the use of an animal outside the scope of this definition. Non experimental, agricultural or clinical veterinary practices are excluded;

(e) 'authority' means the authority or authorities designated by each Member State as being responsible for supervising the experiments within the meaning of this Directive;

(f) 'competent person' means any person who is considered by a Member State to be competent to perform the relevant function described in this Directive;

(g) 'establishment' means any installation, building, group of buildings or other premises and may include a place which is not wholly enclosed or covered and mobile facilities;

(h) 'breeding establishment' means any establishment where animals are bred with a view to their use in experiments;

(i) 'supplying establishment' means any establishment, other than a breeding establishment, from which animals are supplied with a view to their use in experiments;

(j) 'user establishment' means any establishment where animals are used for experiments;

(k) 'properly anaesthetized' means deprived of sensation by methods of anaesthesia (whether local or general) as effective as those used in good veterinary practice;

(l) 'humane method of killing' means the killing of an animal with a minimum of physical and mental suffering, depending on the species.

Article 3

This Directive applies to the use of animals in experiments which are undertaken for one of the following purposes:

(a) the development, manufacture, quality, effectiveness and safety testing of drugs, foodstuffs and other substances or products:

(i) for the avoidance, prevention, diagnosis or treatment of disease, ill-health or other abnormality or their effects in man, animals or plants;

(ii) for the assessment, detection, regulation or modification of physiological conditions in man, animals or plants;

(b) the protection of the natural environment in the interests of the health or welfare of man or animal.

Article 4

Each Member State shall ensure that experiments using animals considered as endangered under

Appendix I of the Convention on International Trade in Endangered Species of Fauna and Flora

and Annex C.I. of Regulation (EEC) N° 3626/82 (1) are prohibited unless they are in conformity

with the above Regulation and the objects of the experiment are:

- research aimed at preservation of the species in question, or
- essential biomedical purposes where the species in question exceptionally proves to be the only one suitable for those purposes.

Article 5

Member States shall ensure that, as far as the general care and accommodation of animals is concerned:

- (a) all experimental animals shall be provided with housing, an environment, at least some freedom of movement, food, water and care which are appropriate to their health and well-being;
 - (b) any restriction on the extent to which an experimental animal can satisfy its physiological and ethological needs shall be limited to the absolute minimum;
 - (c) the environmental conditions in which experimental animals are bred, kept or used must be checked daily;
 - (d) the well-being and state of health of experimental animals shall be observed by a competent person to prevent pain or avoidable suffering, distress or lasting harm;
 - (e) arrangements are made to ensure that any defect or suffering discovered is eliminated as quickly as possible.
- For the implementation of the provisions of paragraphs (a) and (b), Member States shall pay regard to the guidelines set out in Annex II.

Article 6

1. Each Member State shall designate the authority or authorities responsible for verifying that the provisions of this Directive are properly carried out.
 2. In the framework of the implementation of this Directive, Member States shall adopt the necessary measures in order that the designated authority mentioned in paragraph 1 above may have the advice of experts competent for the matters in question.
- (1) OJ N° L 384, 31. 12. 1982, p. 1.

Article 7

1. Experiments shall be performed solely by competent authorized persons, or under the direct responsibility of such a person, or if the experimental or other scientific project concerned is authorized in accordance with the provisions of national legislation.
 2. An experiment shall not be performed if another scientifically satisfactory method of obtaining the result sought, not entailing the use of an animal, is reasonably and practicably available.
 3. When an experiment has to be performed, the choice of species shall be carefully considered and, where necessary, explained to the authority. In a choice between experiments, those which use the minimum number of animals, involve animals with the lowest degree of neurophysiological sensitivity, cause the least pain, suffering, distress or lasting harm and which are most likely to provide satisfactory results shall be selected.
- Experiments on animals taken from the wild may not be carried out unless experiments on other animals would not suffice for the aims of the experiment.
4. All experiments shall be designed to avoid distress and unnecessary pain and suffering to the experimental animals. They shall be subject to the provisions laid down in Article 8. The measures set out in Article 9 shall be taken in all cases.

Article 8

1. All experiments shall be carried out under general or local anaesthesia.
2. Paragraph 1 above does not apply when:
 - (a) anaesthesia is judged to be more traumatic to the animal than the experiment itself;

(b) anesthesia is incompatible with the object of the experiment. In such cases appropriate legislative and/or administrative measures shall be taken to ensure that no such experiment is carried out unnecessarily.

Anesthesia should be used in the case of serious injuries which may cause severe pain.

3. If anesthesia is not possible, analgesics or other appropriate methods should be used in order to ensure as far as possible that pain, suffering, distress or harm are limited and that in any event the animal is not subject to severe pain, distress or suffering.

4. Provided such action is compatible with the object of the experiment, an anaesthetized animal, which suffers considerable pain once anaesthesia has worn off, shall be treated in good time with pain-relieving means or, if this is not possible, shall be immediately killed by a humane method.

Article 9

1. At the end of any experiment, it shall be decided whether the animal shall be kept alive or killed by a humane method, subject to the condition that it shall not be kept alive if, even though it has been restored to normal health in all other respects, it is likely to remain in lasting pain or distress.

2. The decisions referred to in paragraph 1 shall be taken by a competent person, preferably a veterinarian.

3. Where, at the end of an experiment:

(a) an animal is to be kept alive, it shall receive the care appropriate to its state of health, be placed under the supervision of a veterinarian or other competent person and shall be kept under conditions conforming to the requirements of Article 5. The conditions laid down in this subparagraph may, however, be waived where, in the opinion of a veterinarian, the animal would not suffer as a consequence of such exemption;

(b) an animal is not to be kept alive or cannot benefit from the provisions of Article 5 concerning its well-being, it shall be killed by a humane method as soon as possible.

Article 10

Member States shall ensure that any re-use of animals in experiments shall be compatible with the provisions of this Directive.

In particular, an animal shall not be used more than once in experiments entailing severe pain, distress or equivalent suffering.

Article 11

Notwithstanding the other provisions of this Directive, where it is necessary for the legitimate purposes of the experiment, the authority may allow the animal concerned to be set free, provided that it is satisfied that the maximum possible care has been taken to safeguard the animal's well-being, as long as its state of health allows this to be done and there is no danger for public health and the environment.

Article 12

1. Member States shall establish procedures whereby experiments themselves or the details of persons conducting such experiments shall be notified in advance to the authority.

2. Where it is planned to subject an animal to an experiment in which it will, or may, experience severe pain which is likely to be prolonged, that experiment must be specifically declared and justified to, or specifically authorized by, the authority. The authority shall take appropriate judicial or administrative action if it is not satisfied

that the experiment is of sufficient importance for meeting the essential needs of man or animal.

Article 13

1. On the basis of requests for authorization and notifications received, and on the basis of the reports made, the authority in each Member State shall collect, and as far as possible periodically make publicly available, the statistical information on the use of animals in experiments in respect of:

- (a) the number and kinds of animals used in experiments;
- (b) the number of animals, in selected categories, used in the experiments referred to in Article 3;
- (c) the number of animals, in selected categories, used in experiments required by legislation.

2. Member States shall take all necessary steps to ensure that the confidentiality of commercially sensitive information communicated pursuant to this Directive is protected.

Article 14

Persons who carry out experiments or take part in them and persons who take care of animals used for experiments, including duties of a supervisory nature, shall have appropriate education and training.

In particular, persons carrying out or supervising the conduct of experiments shall have received instruction in a scientific discipline relevant to the experimental work being undertaken and be capable of handling and taking care of laboratory animals; they shall also have satisfied the authority that they have attained a level of training sufficient for carrying out their tasks.

Article 15

Breeding and supplying establishments shall be approved by or registered with, the authority and comply with the requirements of Articles 5 and 14 unless an exemption is granted under Article 19 (4) or Article 21. A supplying establishment shall obtain animals only from a breeding or other supplying establishment unless the animal has been lawfully imported and is not a feral or stray animal. General or special exemption from this last provision may be granted to a supplying establishment under arrangements determined by the authority.

Article 16

The approval or the registration provided for in Article 15 shall specify the competent person responsible for the establishment entrusted with the task of administering, or arranging for the administration of, appropriate care to the animals bred or kept in the establishment and of ensuring compliance with the requirements of Articles 5 and 14.

Article 17

1. Breeding and supplying establishments shall record the number and the species of animals sold or supplied, the dates on which they are sold or supplied, the name and address of the recipient and the number and species of animals dying while in the breeding or supplying establishment in question.

2. Each authority shall prescribe the records which are to be kept and made available to it by the person responsible for the establishments mentioned in paragraph 1; such records shall be kept for a minimum of three years from the date of the last entry and shall undergo periodic inspection by officers of the authority.

Article 18

1. Each dog, cat or non-human primate in any breeding, supplying or user establishment shall, before it is weaned, be provided with an individual

identification mark in the least painful manner possible except in the cases referred to in paragraph 3.

2. Where an unmarked dog, cat or non-human primate is taken into an establishment for the first time after it has been weaned it shall be marked as soon as possible.

3. Where a dog, cat or non-human primate is transferred from one establishment as referred to in paragraph 1 to another before it is weaned, and it is not practicable to mark it beforehand, a full documentary record, specifying in particular its mother, must be maintained by the receiving establishment until it can be so marked.

4. Particulars of the identity and origin of each dog, cat or non-human primate shall be entered in the records of each establishment.

Article 19

1. User establishments shall be registered with, or approved by, the authority. Arrangements shall be made for user establishments to have installations and equipment suited to the species of animals used and the performance of the experiments conducted there; their design, construction and method of functioning shall be such as to ensure that the experiments are performed as effectively as possible, with the object of obtaining consistent results with the minimum number of animals and the minimum degree of pain, suffering, distress or lasting harm.

2. In each user establishment:

(a) the person or persons who are administratively responsible for the care of the animals and the functioning of the equipment shall be identified;

(b) sufficient trained staff shall be provided;

(c) adequate arrangements shall be made for the provision of veterinary advice and treatment;

(d) a veterinarian or other competent person should be charged with advisory duties in relation to the well-being of the animals.

3. Experiments may, where authorized by the authority, be conducted outside user establishments.

4. In user establishments, only animals from breeding or supplying establishments shall be used unless a general or special exemption has been obtained under arrangements determined by the authority. Bred animals shall be used whenever possible. Stray animals of domestic species shall not be used in experiments. A general exemption made under the conditions of this paragraph may not extend to stray dogs and cats.

5. User establishments shall keep records of all animals used and produce them whenever required to do so by the authority. In particular, these records shall show the number and species of all animals acquired, from whom they were acquired and the date of their arrival. Such records shall be kept for a minimum of three years and shall be submitted to the authority which asks for them. User establishments shall be subject to periodic inspection by representatives of the authority.

Article 20

When user establishments breed animals for use in experiments on their own premises, only one registration or approval is needed for the purposes of Article 15 and 19. However, the establishments shall comply with the relevant provisions of this Directive concerning breeding and user establishments.

Article 21

Animals belonging to the species listed in Annex I which are to be used in experiments shall be bred animals unless a general or special exemption has been obtained under arrangements determined by the authority.

Article 22

1. In order to avoid unnecessary duplication of experiments for the purposes of satisfying national or Community health and safety legislation, Member States shall as far as possible recognize the validity of data generated by experiments carried out in the territory of another Member State unless further testing is necessary in order to protect public health and safety.

2. To that end, Member States shall, where practicable and without prejudice to the requirements of existing Community Directives, furnish information to the Commission on their legislation and administrative practice relating to animal experiments, including requirements to be satisfied prior to the marketing of products; they shall also supply factual information on experiments carried out in their territory and on authorizations or any other administrative particulars pertaining to these experiments.

3. The Commission shall establish a permanent consultative committee within which the Member States would be represented, which will assist the Commission in organizing the exchange of appropriate information, while respecting the requirements of confidentiality, and which will also assist the Commission in the other questions raised by the application of this Directive.

Article 23

1. The Commission and Member States should encourage research into the development and validation of alternative techniques which could provide the same level of information as that obtained in experiments using animals but which involve fewer animals or which entail less painful procedures, and shall take such other steps as they consider appropriate to encourage research in this field. The Commission and Member States shall monitor trends in experimental methods.

2. The Commission shall report before the end of 1987 on the possibility of modifying tests and guidelines laid down in existing Community legislation taking into account the objectives referred to in paragraph 1.

Article 24

This Directive shall not restrict the right of the Member States to apply or adopt stricter measures for the protection of animals used in experiments or for the control and restriction of the use of animals for experiments. In particular, Member States may require a prior authorization for experiments or programmes of work notified in accordance with the provisions of Article 12 (1).

Article 25

1. Member States shall take the measures necessary to comply with this Directive by 24 November 1989. They shall forthwith inform the Commission thereof.

2. Member States shall communicate to the Commission the provisions of national law which they adopt in the field covered by this Directive.

Article 26

At regular intervals not exceeding three years, and for the first time five years following notification of this Directive, Member States shall inform the Commission of the measures taken in this area and provide a suitable summary of the information collected under the provisions of Article 13. The Commission shall prepare a report for the Council and the European Parliament.

Article 27

This Directive is addressed to the Member States.

Done at Brussels, 24 November 1986.
For the Council
The President
W. WALDEGRAVE

ANEXO II

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas**

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



Ofício nº 14/08

Recife, 11 de janeiro de 2008

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profa. Sandra Lopes de Souza**
Departamento de Anatomia - UFPE
Processo nº 017820/2007-37

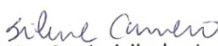
Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado “**A desnutrição no período precose da vida pode alterar a expressão e distribuição da enzima triptofano hidroxilase?**”.

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

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **PARECER FAVORÁVEL** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

CCB: Integrar para desenvolver



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA (MESTRADO)

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que a dissertação da mestranda **Renata Cristinny de Farias Campina**, antes intitulada como: **"A DESNUTRIÇÃO NO PERÍODO PRECOCE DA VIDA PODE ALTERAR A EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO DA ENZIMA TRIPTOFANO HIDROXILASE?"**, teve seu título modificado para o seguinte: **"DISTRIBUIÇÃO E ANÁLISE QUANTITATIVA DE NEURÔNIOS IMUNOREATIVOS À ENZIMA TRIPTOFANO HIDROXILASE EM NÚCLEOS DA RAFE DE RATOS DESNUTRIDOS DURANTE A VIDA PERINATAL"**. É importante ressaltar que os protocolos experimentais que foram avaliados e tiveram PARECER FAVORÁVEL permaneceram inalterados durante todo experimento.

Atenciosamente,

Profª Carol Virgínia Gois Leandro - Orientadora

Profª Sandra Lopes de Souza – Co-orientadora

Campina, Renata Cristinny de Farias

Distribuição e análise quantitativa de neurônios imunoativos à enzima triptofano hidroxilase em núcleos de rafe de ratos desnutridos durante a vida perinatal / Renata Cristinny de Farias Campina. – Recife : O Autor, 2009.

71 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição – Sistema serotoninérgico. 2. Triptofano Hidroxilase. I. Título.

612.39

CDU (2.ed.)

UFPE