

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

**PROGRAMAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR :
ESTUDO DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO**

LÍVIA DE ALMEIDA LIRA

**RECIFE
2012**

LÍVIA DE ALMEIDA LIRA

**PROGRAMAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR :
ESTUDO DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO**

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

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

**RECIFE
2012**

**RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO
DA MESTRANDA LÍVIA DE ALMEIDA LIRA**

No dia 15 de fevereiro de 2012, às 14h, no Auditório do 2º andar do Programa de Pós Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco os Professores: João Henrique da Costa Silva, Doutor Professor do Núcleo de Educação Física do Centro Acadêmico de Vitória/UFPE, Carolina Peixoto Magalhães, Doutora Professora do Núcleo de Enfermagem do Centro Acadêmico de Vitória/UFPE e Sandra Lopes de Souza Doutora Professora do Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüiram a Mestranda LÍVIA DE ALMEIDA LIRA, sobre a sua Dissertação intitulada **"PROGRAMAÇÃO DO COMPORTAMENTO ALIMENTAR: ESTUDO DO NÚCLEO DO TRATO SOLÍTÁRIO E ÁREA POSTREMA "**, orientada pela professora Sandra Lopes de Souza . Ao final da argüição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da Mestranda as seguintes menções foram publicamente fornecidas:

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva

Profª. Drª. Carolina Peixoto Magalhães

Profª. Drª. Sandra Lopes de Souza

APROVADO
aprovada
APROVADA

Lira, Livia de Almeida

Programação do comportamento alimentar: estudo do núcleo do trato solitário / Livia de Almeida Lira. – Recife: O Autor, 2012.

73 folhas: il., fig. ; 30 cm

Orientador: Sandra Lopes de Souza

-
Tese (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, 2012.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Desnutrição perinatal. 2. Núcleo de trato solitário.
3. Tronco encefálico. I. Souza, Sandra Lopes de.
II. Título.

616.83

CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2012-025

Ao velho, meu querido velho.
Isaac Almeida (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre conceder graças em minha vida e por colocar pessoas iluminada em meu caminho, com as quais eu aprendo um pouco mais essa complicada arte que é viver

A minha mãe Vitória Almeida e minhas irmãs Sheila e Bruna pelo carinho, dedicação e constante apoio.

Ao meu namorado Caio Falcão por ser um amor tão tranquilo, companheiro, fiel e disposto a me ajudar no que for necessário.

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

A Amanda Marcelino e Ligia Galdino pela generosidade e amizade, sem vocês nada disto estaria realizado.

As minha companheira, mais que isso, irmãs Larissa Cavalcanti, Isabeli Lins, Paula Martimiano, Tássia Karin, Renata Campina, Taisy Ferro, Matilde Cesiana pela alegria, pela imensa ajuda durante esses dois anos e por sempre estarem presente quando mais precisei de vocês.

Os técnicos de laboratório do CAV, em especial o André, por ser tão prestativo e ter tido tanta paciência em me ajudar com o criostato.

Aos meus grandes amigos e eternos companheiros de trabalhos, Eriton (tio) e Filipe, pela amizade, carinho e preocupação.

A Capes pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Os períodos pré e pós-natal representam a fase de maior desenvolvimento neuronal. Nessa fase crítica do desenvolvimento, o organismo é suscetível às influências de estímulos ambientais que podem modular os eventos ontogenéticos posteriores promovendo sérias consequências na vida adulta. Dentre esses estímulos ambientais, a desnutrição e o tratamento com inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS) estão associados a vários prejuízos morfofuncionais na vida adulta. Algumas regiões encefálicas responsáveis pela manutenção do balanço energético são alvos de ajustes permanentes promovidos por desnutrição ou ISRS no período perinatal. Nesse estudo, o objetivo foi investigar no núcleo do trato solitário (NTS) os efeitos da desnutrição ou tratamento com ISRS durante os estágios iniciais do desenvolvimento sobre o controle da ingestão alimentar. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar distribuídos aleatoriamente nos grupos Controle e Desnutrido formados por animais cujas mães receberam durante a gestação e lactação dieta contendo 17% ou 8% de caseína respectivamente. Dois outros grupos foram formados de acordo com tratamento farmacológico durante a lactação. Estes foram os grupos Salina e Fluoxetina, compostos por filhotes que receberam, respectivamente, solução de salina (NaCl 0.9%,) ou Fluoxetina (10mg/Kg) via subcutânea, diariamente, do 1º ao 21º dia de vida. Foram avaliados aos 35 e 180 dias de vida: a) Peso corporal; b) Ingestão Alimentar; c) Expressão da proteína FOS por imunohistoquímica no NTS em resposta a estímulo alimentar. As áreas estudadas foram identificadas e os neurônios imunorreativos quantificados através do microscópio ótico de campo claro com auxílio do atlas estereotático de Paxinos e Watson (1998). Com base nessas avaliações, o presente trabalho demonstrou que: a) a desnutrição perinatal promoveu aumento no consumo alimentar e número de células ativadas nas porções rostral (Controle= $166,3 \pm 33,8$ vs Desnutrido= $297,8 \pm 33$, $P=0.028$) e medial (Controle= $167,8 \pm 47,44$ vs Desnutrido= $291,2 \pm 28,3$, $P=0.0043$) do NTS em resposta a estímulo alimentar apenas em animais com 35 dias de vida; b) o tratamento neonatal com fluoxetina promoveu aumento no número de neurônios ativados em resposta a estímulo alimentar na porção rostral (Salina= $218,3 \pm 6,6$; Fluoxetina= $367 \pm 25,9$, $P=0.005$) de animais adultos (180 dias); Estes resultados indicam que o NTS é uma estrutura particularmente vulnerável as influências da manipulação nutricional e farmacológica do sistema serotoninérgico nos estágios iniciais do desenvolvimento, e pode ser alvo de processos adaptativos do controle do balanço energético observados nesses animais na vida adulta.

Palavras- Chave: Desnutrição perinatal, programação, núcleo do trato solitário, tratamento neonatal com ISRS.

ABSTRACT

The pre-and postnatal represent a stage of greater neuronal development. In this critical phase of development, the organism is susceptible to the influences of environmental stimuli that can modulate the subsequent ontogenetic events promoting serious consequences in adulthood. Among these environmental stimuli, malnutrition and treatment with selective serotonin reuptake inhibitor (SSRIs) are associated with various morphological and functional damage in adulthood. Some brain regions responsible for the maintenance of energy balance are targets of ongoing adjustments promoted by malnutrition or SSRIs during the perinatal period. Although a number of works analyzing the effects of these stimuli on structures such as the hypothalamus, few studies have directed their attention to long-term consequences of malnutrition or neonatal treatment with SSRIs on the nucleus of solitary tract (NTS). In this study, in particular, we are interested in the role of these structures in controlling feeding behavior. The objective of this study was to investigate in the NTS the effects of malnutrition or treatment with SSRIs during the early stages of development on the control of food intake. We used Wistar rats randomly distributed in Control and undernutrition groups. These groups were composed by animals whose dams received during pregnancy and lactation diet containing 17% or 8% casein respectively. Two other groups have been formed according to the pharmacological treatment during lactation. These groups were Saline and Fluoxetine, composed of pups that received respectively, saline solution (NaCl 0.9%) or fluoxetine (10mg/kg) subcutaneously daily from day 1 to day 21 of life. Were evaluated at 35 and 180 days old: a) Body weight; b) Food Intake c) Fos protein expression by immunohistochemistry in the NTS in response to food stimuli. The study areas were identified and quantified immunoreactive neurons by bright field optical microscope with the aid of the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (1998). Based on these assessments, this study demonstrated that: a) perinatal malnutrition promoted increased food consumption and the number of c-Fos positive cells in the rostral portions (Control= $166,3 \pm 33,8$ vs Undernutrition= $297,8 \pm 33$, $P=0.028$) e medial (Control= $167,8 \pm 47,44$ vs Undernutrition= $291,2 \pm 28,3$, $P=0.0043$) of the NTS in animals with only 35 days, b) Neonatal treatment with fluoxetine increased the number of c-Fos positive marks only in the rostral portion (Saline = 218.3 ± 6.6 , Fluoxetine = 367 ± 25.9 , $P = 0.005$) of adult animals (180 days). These results indicate that the nucleus of the solitary tract is a structure particularly vulnerable to influences of nutritional and pharmacological manipulation in the early stages of development.

Keywords: Malnutrition perinatal programming, nucleus of the solitary tract, neonatal treatment with SSRIs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DO ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA

Figure 1: Literature search and selection process	19
--	-----------

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1: Esquema dos grupos experimentais.	39
Figura 2: Faixas de Bregmas utilizadas para delimitação do NTS	43
Figura 3: Fotomicrografia do Núcleo do Trato Solitário evidenciando as marcações na coloração preta ou marrom escuro (seta) incluídos nas análises quantitativas dos neurônios imunorreativos a proteína FOS	45

FIGURAS DO ARTIGO ORIGINAL

Figura 1: Peso corporal de animais submetidos à desnutrição perinatal ou tratamento neonatal com Fluoxetina	52
Figura 2: Análise quantitativa do número de células c-FOS positiva no NTS de animais submetidos à desnutrição perinatal ou tratamento neonatal com fluoxetina	54
Figura 3- Fotomicrografias evidenciando células c-FOS positivas no NTS de animais de 35 dias submetidos à manipulação nutricional	55
Figura 4- Fotomicrografias evidenciando células c-FOS positivas no NTS de animais de 180 dias submetidos à manipulação Nutricional.	55
Figura 5- Fotomicrografias evidenciando células c-FOS positivas no NTS de animais de 35 dias submetidos à manipulação Farmacológica.	56
Figura 6- Fotomicrografias evidenciando células c-FOS positivas no NTS de animais de 180 dias submetidos à manipulação Farmacológica.	57

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA

Table 1: Characteristics of the studies included in the review	20
---	-----------

TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1- Composição das dietas experimentais oferecidas durante o período de gestação e lactação.	38
---	-----------

TABELAS DO ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1: Peso Corporal e Consumo alimentar de animais submetidos à desnutrição perinatal ou tratamento neonatal com fluoxetina.	53
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP- Área Postrema

ARC- Núcleo Arqueado

CART - Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina

CCK – colecistocinina

CeA – Núcleo central da amígdala

GLP1- Peptídeo semelhante ao glucagon

ISRS –Inibidores seletivos da recaptação de Serotonina

NPY- Neuropeptídeo Y

NTS- Núcleo do Trato Solitário

POMC- Pro-opio-melanocortina

PVN- Núcleo Paraventricular

PYY- Neuropeptídeo PYY

rNTS- Núcleo do Trato Solitário rostral

SNC- Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Revisão da Literatura (Artigo de Revisão)	15
Abstract	15
Introduction	16
Material and Methods	17
Results	18
Discussion	27
References	31
3. Hipóteses	35
4. Objetivos	36
Objetivo Geral	36
Objetivo Específico	36
5. Metodologia	37
5.1 Animais	37
5.2 Obtenção dos Grupos Experimentais	37
5.3 Procedimentos Experimentais	39
5.3.1 Peso corporal	39
5.3.2 Consumo Alimentar	39
5.3.3 Estímulo alimentar para expressão da proteína FOS	40
5.3.4 Perfusão Transcardíaca	40
5.3.5 Imunohistoquímica	41
5.3.6 Análise quantitativa de neurônios imunorreativos a proteína FOS no NTS	42
5.4 Análises Estatísticas	45
6. Resultados (Artigo Original)	45
Resumo	47
Introdução	49
Material e Métodos	49
Animais	48
Avaliação do Peso Corporal e Consumo Alimentar	50
Imunohistoquímica	50
Análise quantitativa de neurônios imunorreativos a proteína Fos	51
Análises estatísticas	51
Resultados	52
Efeitos da restrição proteica perinatal e o tratamento neonatal com fluoxetina sobre o peso corporal e consumo alimentar.	52
Efeito da restrição proteica perinatal sobre a expressão de FOS no NTS	53
Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina sobre a expressão de FOS no NTS.	53
Discussão	57
Referências	62
7. Considerações Finais	66
8. Referências Bibliográficas	67
9. Anexo	72

1. INTRODUÇÃO

A fase de maior crescimento, replicação e diferenciação neuronal compreende, em ratos, o período da gestação e lactação, e os cinco primeiros anos de vida em humanos (MORGANE et al., 1978, 1993; SIMMONS, 2009). Nesta fase, considerada crítica para o desenvolvimento, o organismo é mais suscetível às influências ambientais que podem modificar, modular e/ou direcionar os eventos ontogenéticos induzindo alterações morfofuncionais de órgãos e sistemas (DOBBING, 1964; MORGANE; MOKLER et al., 2002; ÁLFARO-RODRÍGUES; GONZALES-PINÃ et al., 2006; VIEAU, 2011). As consequências a longo prazo dessas alterações morfofuncionais são variáveis e dependentes de fatores como a duração, a intensidade e principalmente o tipo de estressor (nutricional, farmacológico, psicológico, endócrino, etc) (VIEAU, 2011). Nos últimos anos, relevantes estudos epidemiológicos têm destacado o papel fundamental da nutrição durante os estágios precoces do desenvolvimento e ressaltado a sua relação com aparecimento de distúrbios na vida adulta (SMART, 1981; HALES; BARKER, 1992; BARKER, 1997; LANGLEY-EVANS; SCULLEY, 2006; VICKERS 2011). Esses estudos apontam relação entre o baixo peso ao nascer (< 2,5 kg) e obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares na vida adulta (HALES; BARKER, 1992; BARKER, 1997). Estas observações reforçadas por extensas investigações envolvendo a experimentação animal conduziram a formulação da hipótese da Programação Metabólica (HALES; BARKER, 1992; VICKERS 2011). De acordo com esta hipótese, uma programação promoverá adaptações metabólicas para que as chances de sobrevivência sejam maximizadas dentro da restrição alimentar. No entanto, quando este organismo for submetido a um aporte nutricional normal haverá incompatibilidade entre a programação fisiológica e a nova condição nutricional. Como consequência haverá o desenvolvimento da síndrome metabólica, que se traduz por obesidade, alteração da tolerância à glicose, por hipertensão arterial e taxa aumentada de triglicerídeos. Além disso, outros pesquisadores têm colocado em evidência a relação entre o retardo de crescimento intra-uterino e distúrbios metabólicos que aparecem ainda na infância (HALES; BARKER, 2001; OZANNE; HALES, 2002; GLUCKMAN; HANSON, 2004; GLUCKMAN; HANSON et al., 2005).

Neste contexto, a exposição perinatal a ambientes de restrição nutricional, seja calórico ou proteico, promove vários prejuízos fisiológicos e metabólicos que conduzem a erros nos padrões de maturação de vários órgãos, sistemas e inclusive sobre a expressão

comportamental (DATTA; PATTERSON et al., 2000; TATLI; GUZEL et al., 2007; GONZALES; PENEDO et al., 2009; MATOS; OROZCO-SOLÍS et al., 2011). Estudos utilizando modelos animais mostram ainda que este tipo de restrição durante o período pré e pós-natal está associada a modificações nas vias de sinalização responsáveis pela regulação a curto e longo prazo do balanço energético (DELAHAYE; BRETON et al., 2007; JOUSSE; PARRY et al., 2011). Análises recentes tem revelado que um ambiente nutricional restrito durante o desenvolvimento conduz, na idade adulta, a maior preferência por alimentos palatáveis, bem como retardo no disparo da saciedade associado à hiperfagia e a redução dos efeitos anorexígenos da serotonina (BELLINGER; LILLEY et al., 2004; BELLINGER; SCULLEY et al., 2006; YAMAMOTO, 2006; LOPES DE SOUZA; OROZCO SOLÍS et al., 2008; OROZCO-SOLÍS; LOPES DE SOUZA et al., 2009).

Assim como fatores nutricionais, os farmacológicos também são considerados importantes indutores de adaptações fisiológicas e comportamentais na vida adulta quando são administrados em períodos iniciais da vida (LANGLEY-EVANS, 2001; DEIRÓ; MANHÃES DE CASTRO et al., 2006). Alguns fármacos, como os inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS), são comumente utilizados durante a gestação e lactação para aliviar os sintomas da ansiedade e depressão (LANGLEY-EVANS, 2001; HOMBERG; SCHUBERT et al., 2010). Os ISRSs podem atravessar a barreira placentária e serem excretados no leite materno (LANGLEY-EVANS, 2001; HOMBERG; SCHUBERT et al., 2010). No organismo do feto ou lactente, o ISRS atuará aumentando a disponibilidade extracelular de serotonina, um neurotransmissor que desempenha importante papel nos processos de crescimento, diferenciação e maturação do sistema nervoso (MANJARREZ; CHAGOYA et al., 1988; DEL ANGEL-MEZA; RAMIREZ CORTES et al., 2001). Estudos têm apontado prejuízos de maturação somática e reflexa, bem como menor número de neurônios serotoninérgicos em ratos que receberam ISRS durante a lactação (DEIRÓ; MANHÃES DE CASTRO et al., 2006; MENDES DA SILVA; GONÇALVES et al., 2010; SIMPSON; WEAVER et al., 2011). A exposição precoce a ISRS pode produzir efeitos a longo prazo sobre comportamentos relacionados a função serotoninérgica, incluindo o comportamento alimentar (MENDES-DA-SILVA; BARRETO MEDEIROS et al., 2000; DEIRÓ; MANHÃES DE CASTRO et al., 2002). O aumento na disponibilidade sináptica de serotonina preconizada pelo tratamento neonatal com ISRS se assemelha ao que ocorre em encéfalos de organismos que foram desnutridos durante a gestação e lactação (MANJARREZ; MAGDALENO et al., 1996; MANJARREZ; MANUEL, 2003; TOSCANO; AMORIM et al., 2008).

Apesar do grande volume de pesquisas realizadas nos últimos anos, as consequências a longo prazo dessas alterações perinatais, bem como os mecanismos fisiológicos e moleculares que os relacionam ao aparecimento de desordens na vida adulta, incluindo a síndrome metabólica, ainda não foram esclarecidos por completo. No entanto, diversas linhas de pesquisas indicam que tais mecanismos estão associados à modulação das várias regiões encefálicas responsáveis pela manutenção do balanço energético (BINGHAM; ANDERSON et al., 2008; LOPES DE SOUZA et al 2008; ZHENG; LENARD et al., 2009; SIMPSON; WEAVER et al., 2011; REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011).

Dentre as regiões encefálicas envolvidas na manutenção da quantidade de energia adquirida, metabolizada e armazenada pelo organismo, destaca-se o tronco encefálico que desempenha um papel fundamental na integração entre os sinais provenientes da periferia do corpo e do sistema nervoso central (SNC) (GRILL; KAPLAN, 2001; BERTHOUD, 2004; SANCHES- LASHERAS; KONNER et al., 2010). Uma estrutura específica desta região, o Núcleo do Trato Solitário (NTS), localizado na porção dorsomedial da medula oblonga está diretamente envolvido na regulação do comportamento alimentar (BERTHOUD, 2002; SCHWARTZ, 2006). Este núcleo apresenta populações de neurônios que expressam substâncias orexigênicas, como o Neuropeptídeo Y (NPY), e anorexígenas, como a pro-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). O NTS é responsivo a diversos peptídeos e hormônios periféricos que atuam como sinais de saciedade, como a colecistocinina (CCK), o Peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) e a leptina (ELLACOTT; HALATCHEV et al., 2006; HUO; GAMBER et al, 2008, HAYES; SKIBICKA et al, 2010). Além disso, várias porções do NTS são altamente vascularizadas pela Área Postrema (AP), uma estrutura também localizada no tronco encefálico que apresenta uma barreira hemato-encefálica bastante permeável sendo capaz de detectar hormônios e outros fatores circulantes e permitir o acesso direto desses fatores ao NTS (BERTHOUD, 2002; 2004).

A capacidade do NTS em organizar o comportamento alimentar foi examinada a partir de uma série de estudos iniciados no final da década de 70 por Grill e Colaboradores. Esses autores observaram que animais descerebrados submetidos à infusão intra-oral de dieta líquida apresentavam um repertório de mecanismos integrativos independentes da função hipotalâmica que incluíam a capacidade de discriminar diferentes estímulos palatáveis, induzir normalmente a saciedade em resposta a presença de hormônios e peptídeos gastrointestinais e distensão gástrica, e de gerar respostas simpáticas relacionadas à severa depleção energética (GRILL; NORGREEN, 1978; DIROCCO; GRILL, 1979; BERRIDGE;

GRILL, 1983;GRILL; KAPLAN, 2001; GRILL, 2006; GRILL; HAYES, 2009; GRILL, 2010). A partir destes estudos tornou-se evidente que o NTS desempenha papel fundamental no controle do comportamento alimentar e balanço energético, principalmente no que diz respeito à modulação da saciedade (BERTHOUD,2002; SCHWARTZ, 2006; GRILL,2010).

Apesar de um relativo número de trabalhos enfocarem no papel do NTS no controle do comportamento alimentar e balanço energético, principalmente no que diz respeito à ação e responsividade dos neurônios deste núcleo aos efeitos de neuropeptídios e hormônios gastrointestinais, pouco ainda se conhece sobre a amplitude de influência que esse núcleo pode exercer sobre o comportamento alimentar. Por outro lado, nos interessa no presente estudo verificar os possíveis ajustes promovidos pela desnutrição perinatal ou tratamento neonatal com ISRS em períodos precoces da vida, ambos aumentando os níveis encefálicos de serotonina, sobre alguns aspectos do controle do comportamento alimentar que envolve o NTS.

O Presente trabalho também hipotetizou que a responsividade do NTS na recepção de informações periféricas para manutenção do balanço energético diminuem após a desnutrição perinatal ou o tratamento neonatal com ISRS.

Este estudo foi realizado no Anexo de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco e orientado pela professora Sandra Lopes de Souza. A revisão de literatura é apresentada no formato de artigo de revisão intitulado: *Nucleus of the solitary tract and feeding behavior: A systematic review*. Submetido ao periódico Nutrition. Os resultados compõem o artigo original: *A desnutrição perinatal e o tratamento neonatal com Fluoxetina modificam a quantidade de neurônios ativados no núcleo do trato solitário resposta ao estímulo alimentar*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Título: Nucleus of the Solitary Tract and Feeding Behavior: A Systematic Review

Autores: ¹ Lívia de Almeida Lira, ²Larissa Cavalcanti do Amaral Almeida, ¹Tássia Karin Ferreira Borba, ³Carol Virgínia Góis Leandro, ^{1,4}Sandra Lopes de Souza, ⁴Raul Manhães de Castro

Afiliação dos autores: ¹ Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil; ² Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. ³ Núcleo de Educação Física, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brasil. ⁴ Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Endereço para correspondência: Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Anatomia, Centro de Ciências Biológicas – CCB/UFPE Av. Prof Moraes Rêgo, 1235 Recife - PE, 50670-420. Email: sanlopesufpe@gmail.com

ABSTRACT

Objectives: The aim of this systematic review was to analyze the involvement of the NTS in the control of feeding behavior.

Methods: A search of bibliographic databases covering research published from January 1990 through April 2011 was undertaken. After screening the title, abstract and text, the articles were selected according to the following inclusion criteria: original paper written in English, experimental research in adult rats and mice and studies based on the relationship between the control of food intake and the nucleus of the solitary tract (NTS).

Results: We identified 3686 articles, 30 of which were selected to compose this systematic review. The majority of articles that were selected used Sprague-Dawley rats as the main animal species and the actions of drugs/peptides on the frequency of food intake,

meal size and responsiveness of specific populations of neurons in the NTS as the primary outcomes.

Conclusion: Overall, the analysis of the studies allowed us to observe the activation patterns of neurons in the NTS in response to food stimuli, especially those leading to satiety.

Key-Words: caudal brainstem, satiety responses, feeding behavior, nucleus of the solitary tract.

INTRODUCTION

Feeding behavior is a complex phenomenon dependent on interactions among a variety of signals, originating from the interactions between the periphery (gastrointestinal tract, pancreas, adrenals and adipose tissue) and several brain areas, such as the structures of the corticolimbic system, hypothalamus and brainstem [1-4].

Among these brain areas, the nucleus of the solitary tract (NTS) in the caudal brainstem plays important interoceptive and integrative roles in the modulation of many aspects of feeding behavior, such as the control of initiation and termination of food intake and meal size [5-7].

This nucleus is the first site that receives viscerosensory information from the oral cavity and peripheral regions, mainly via the vagus nerve [7-9]. This information is processed and transmitted to other brain areas with which the NTS establishes direct and reciprocal connections, such as the hypothalamus, locus coeruleus, amygdala, thalamus and parabrachial complex [3,7,9]. In addition, the NTS is responsive to circulating such factors as glucagon-like peptide-1 (GLP), cholecystokinin (CCK), and leptin [6,10,11] and exhibits distinct populations of neurons that express important stimulators (neuropeptide Y [NPY]) and inhibitors of food intake (cocaine- and amphetamine-related transcript (CART) and proopiomelanocortin [POMC])[2,9].

This intrinsic capacity of the NTS to orchestrate ingestive behavior has been examined over the last two decades, and several lines of evidence indicate that this nucleus is an integral part of the overall feeding network, participating in the homeostatic and hedonic control of feeding behavior [6]. Despite progress in recent years, the mechanisms and signaling pathways that the NTS uses in the modulation of food intake and control of energy balance remain to be elucidated. Therefore, this article aims, through a systematic review, to assess the involvement of the NTS in the control of feeding behavior and to relate the main advances in this area of research over the last 20 years.

MATERIALS AND METHODS

A search of the bibliographic databases PubMed, ScienceDirect and Scopus was undertaken, covering research published from January 1990 through April 2011 and using the keywords “Nucleus of Solitary Tract” or “Caudal Brainstem” combined with “Gastrointestinal Signals”, “Satiety Responses”, “Obesity” or “Feeding Behavior”. Refinement criteria, such as the type of article, year, species studied and language, were used in each database when available.

The searches were carried out considering the previously established inclusion criteria: original English articles, experimental research with adult rats and mice and studies that relate exclusively the role of the NTS in the control of feeding behavior. Studies without methodological clarity and anatomical studies were excluded from this review.

Potentially relevant papers were select by screening the titles (first step), abstracts (second step) and the entire articles (third step) retrieved through the database search. Each article was assessed independently by two different researchers, and its data were extracted, synthesized in tables and compared with each other, taking into account the parameters evaluated, species and diets used, the drugs and peptides administered, and the main

techniques and results. A meta-analysis was not deemed appropriate, due to the heterogeneity of the studies.

RESULTS

The database search located 3686 articles. The screening of the titles and abstracts resulted in a selection of 40 articles, and the complete reading of the articles resulted in a final selection of 30 studies. The search process is shown in Figure 1.

In the articles identified in this systematic review, the majority used rats of the Sprague-Dawley strain as the main animal species. Regarding the techniques that were used, immunohistochemistry was found in 20 articles [4,10,12-29], associated [4,10,12-17,19,20,22,26,28,29] or not [15,18,21,23,24,25,27] with other techniques, followed by RT-PCR [46,55-57,61], gastric distention and histological analysis.

As the primary goal, 16 articles examined the action of drugs/peptides in the frequency of food intake, meal size and responsiveness of specific populations of neurons in the NTS [4,10,12,14,15,17,20,22-29,36]. In these studies, leptin [10,17,20-26,28,36] was the most commonly administrated peptide. Four studies evaluated specific populations, such as melanocortinergeric[30,31] and opioidergic [32,33] neurons in the NTS, and three articles observed the participation of such receptors as 5-HT₃ [21,37] and GLP-1R [11] in the control of food intake and the responsiveness of this nucleus. Moreover, three articles had as their main aim the effects of palatable diets [13,17,19] on the control of feeding behavior by the NTS. Other studies assessed the relationships among lesions of the NTS [1,34,35] and the effects of gastric infusion/distension [1] on food intake.

The synthesis of the studies selected is described in Table 1.

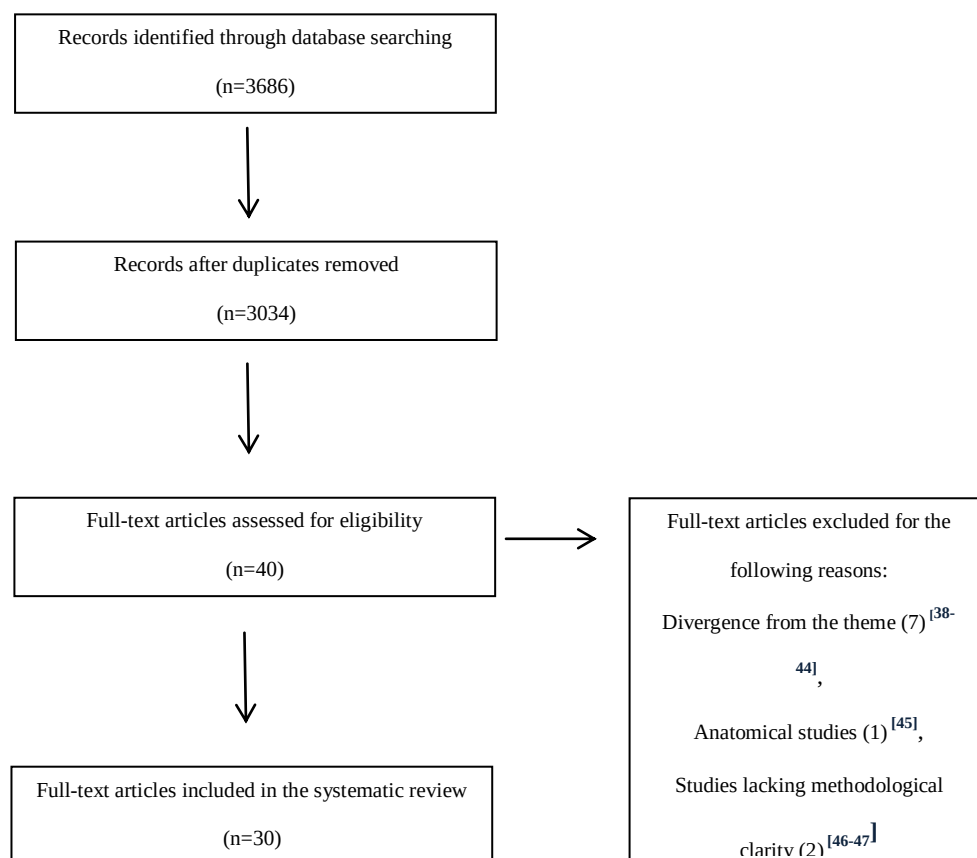


Figure 1. Literature search and selection process

Table 1: Characteristics of the studies included in the review

Study	Parameter Evaluated	Species	Diet	Drugs/ Peptides	Techniques	Results
Baumgartner et al. (2010)	The effects of hepatic-portal vein infusions of GLP-1 in the reduction of meal size	Sprague-Dawley (n=16)	Standard	GLP-1	Immunohistochemistry	GLP-1 ↑ the number of c-Fos-expressing cells only in the NTS, area postrema (AP) and central nucleus of the amygdala (CeA)
Bello et al. (2009)	The neural consequences of exposure to different dietary and scheduled-access feeding constraints	Sprague-Dawley (n=42)	Standard Palatable		Immunohistochemistry	Consumption of a standardized meal resulted in more c-Fos ⁺ cells in the NTS in the binge-access group than in naive controls
Bello et al. (2011)	The involvement of the opiodergic system present in the caudal brainstem on binge eating	Sprague-Dawley (n=40)	Standard Palatable		In situ hybridization	↓ mu-opioid receptor mRNA in the NTS in the binge-access and continuous-access groups
Blevins et al. (2008)	The participation of neuropeptide PYY(3–36) in the inhibition of feeding by activating catecholaminergic neurons	Sprague-Dawley (n=18)	Standard	PYY (3-36)	Immunohistochemistry	PYY(3–36) ↑ Fos in the arcuate nucleus (ARC), NTS and AP. Approximately 10% of Fos ⁺ neurons in the NTS are tyrosine hydroxylase ⁺ (TH)

Table 1: Characteristics of the studies included in the review (continued)

Study	Parameter Evaluated	Species	Diet	Drugs/ Peptides	Techniques	Results
Date et al. (2006)	The transmission of ghrelin orexigenic signals from the NTS to the hypothalamus	Wistar (n=118)	Standard	Ghrelin Prazosin Yohimbine Atenolol ICI 118	RT-PCR Immunohistochemistry	Ghrelin ↑ dopamine β hydroxylase mRNA levels in the NTS and ARC and activates NPY via noradrenergic neurons in the NTS; prazosin and ICI 118 reduce the effects of ghrelin
Donovan et al. (2009)	The effects of the activation of the vagal afferent pathway on the long-term maintenance of a high-fat diet in mouse strains resistant to and with a propensity for obesity	C57BL/6J /DIO-P (n= 8-18) 129S6/SvEv /DIO-R (n= 8-18)	Standard High-fat diet		Immunohistochemistry	Lipid-induced activation of NTS neurons in mice with a propensity for obesity was attenuated after the maintenance of a high-fat diet compared with chow-fed controls
Ellacott et al. (2006)	The responsiveness of NTS POMC neurons to peripherally administered leptin.	C57BL/6J (n= 18-24)	Standard	Leptin	Immunohistochemistry	Peripheral leptin induces p-STAT3-IR in approximately 30% of POMC-EGFP neurons in the NTS, which do not co-localize with CART-expressing neurons
Emond et al. (2001) Paper A	The role of leptin in the modification of satiety signals	Sprague-Dawley (n=102)	Ensure liquid diet	Leptin	Immunohistochemistry	Intraventricular leptin, intragastric Ensure, or a combination of these ↑ the number of c-Fos-positive cells in the NTS and AP

Table 1: Characteristics of studies included in the review (continued)

Study	Parameter Evaluated	Species	Diet	Drugs/ Peptides	Techniques	Results
Emond et al. (2001) Paper B	Level of activation of c-Fos in the NTS and AP after gastric infusion and food intake	Sprague-Dawley (n=25)	Ensure liquid		Immunohistochemistry Gastric distention	Ingestion of a liquid diet, gastric distention, or pyloric cuffs blocking flow with gastric preload induce c-Fos at multiple levels of the NTS
Faipoux et al. (2008)	The relationship between satiety induced by high-protein meals and the activation of brain areas involved in the onset of satiety	Wistar (n=32)	High-protein		Immunohistochemistry	In the NTS, the acute or chronic intake of high-protein meals led to ↑ activation of the noradrenergic/adrenergic neurons involved in CCK-induced satiety
Faulconbridge et al. (2008)	Activation of hypothalamic and NTS neurons by ghrelin	Sprague-Dawley (n=22)	Standard	Ghrelin	Immunohistochemistry	Ghrelin ↑ Fos expression and the number of TH ⁺ neurons in the NTS; ghrelin did not increase Fos expression in the Arc or paraventricular nuclei (PVN) in rats with open or occluded cerebral aqueducts
Giraud et al. (1998)	Potential opioid–opioid signaling between the CeA and rostral NTS (rNTS)	Sprague-Dawley (n=104)	Standard	Naltrexone DAMGO	Histological analysis	Administration of naltrexone to the rNTS blocks DAMGO-induced food intake.
Hayes and Covasa (2006) Paper A	Participation of the 5-HT ₃ receptor in the control of meal size and reduction of food intake	Sprague-Dawley (n=19)	Sucrose solution	Ondansetron CCK		Administration of 1 or 2 µg of ondansetron to the medial NTS (mNTS) ↑ sucrose intake; 10 µg of ondansetron 4° i.c.v. attenuates food intake by CCK; ondansetron alone has no effects on food intake

Table 1: Characteristics of studies included in the review (continued)

Study	Parameter Evaluated	Species	Diet	Drugs/ Peptides	Techniques	Results
Hayes and Covasa (2006) Paper B	The role of 5-HT ₃ receptors in CCK-induced Fos-LI in the dorsal hindbrain	Sprague-Dawley (n=31)	Standard	CCK-8 Ondansetron	Immunohistochemistry Gastric distention	Ondansetron ↓ Fos-LI in the NTS and AP after CCK administration and gastric distention; CCK and gastric distention ↑ Fos-LI and the activation of 5-HT ₃ receptors in the NTS and AP
Hayes et al. (2009)	The role of endogenous GLP-1R activation in NTS neurons in the contribution to the physiological control of food intake	Sprague-Dawley (n=32)	Ensure	Exidín- 9	Gastric distention	Food intake ↑ after the administration of a GLP-1R antagonist directly to the medial NTS. Feeding suppression after gastric distension was ↓administration of. Exidín-9.
Huo et al. (2006)	The regulation of POMC neurons in the NTS and ARC by leptin	Mice POMC-CRE, Z/EG-EGFP and C57BL6.	Standard	Leptin	Immunohistochemistry	Leptin does not induce either p-STAT3 in POMC neurons in the NTS or the expression of c-Fos; food deprivation ↓ POMC mRNA in the NTS and ARC; leptin does not reverse the ↓ POMC mRNA in the NTS
Huo et al. (2007)	The effects of leptin and gastric distention on the activation of the mNTS neurons	Sprague-Dawley (n=27)	Standard	Leptin	Immunohistochemistry Imunofluorescence Gastric Distention	Leptin or gastric distention have no effects on inhibition of food intake; Leptin + gastric distention reduce food intake.
Huo et al. (2008)	Regulation of NTS proglucagon neurons by leptin	Sprague Dawley (n=14) C57BL/6 (n=10)	Standard	Leptin	RT-PCR Immunohistochemistry	Leptin Induced P-STAT3 in 100% of GLP-1 cells in the caudal brainstem of mice, but not in rats. Only in mice leptin administration prevents the reduction of proglucagon mRNA by fasting

Table 1: Characteristics of studies included in the review (continued).

Study	Parameter Evaluated	Species	Diet	Drugs/ Peptides	Techniques	Results
Koegler and Ritter (1998)	The ability of hindbrain galanin receptors to independently stimulate feeding in the absence of the PVN	Sprague-Dawley (n=55)	Dietary fat	Galanin mercaptoacetate 2-deoxy-D-glucose	Histological analysis	PVN lesions did not abolish feeding induced by the injections of galanin into the NTS; galanin ↑ food intake in rats with PVN lesions
Li et al. (2007)	The role of the brainstem melanocortin system in long-term energy regulation	F344xBN (n= ~56)	Standard	rAAV-POMC	RT-PCR Western blot	↓ Food intake and body weight in the NTS; improved insulin sensitivity and increased α -MSH in the NTS, whereas hypothalamic α -MSH remained unchanged
Lutz et al.(1998)	The role of the NTS/AP region in mediating the anorectic effects of amylin and CGRP in NTS/AP	Sprague-Dawley (n=36)	18% fat diet	Amylin CCK Bombesin CGRP	Histological analysis	↓ effects of amylin, CGRP, CCK and bombesin in rats with PVN lesion in the NTS/AP
Menani et al. (1996)	Food intake, body weight and glucose and insulin plasma levels after lesions in the commissural NTS	Sprague-Dawley (N=)	Standard		Histological analysis	↓ Food intake and body weight; water intake, plasma glucose and insulin were unchanged
Perello et al. (2007)	POMC gene expression, biosynthesis and posttranslational levels in the ARC compared with the NTS	Sprague-Dawley (n=23)	Standard	Leptin	RT-PCR, Immunohistochemistry RIA analysis	Fasting ↓ POMC in the ARC and NTS; POMC-derived peptides and prohormone convertase PC1/3 ↓ during fasting, and the administration of leptin reversed these effects only in the ARC

Table 1: Characteristics of studies included in the review (continued)

Study	Parameter Evaluated	Species	Diet	Drugs/ Peptides	Techniques	Results
Schwartz and Moran (2002)	The responsiveness of NTS neurons to gastric distention and the administration of leptin and NPY	Long-Evans (n=35)	Standard	Leptin NPY	Histological analysis Neurophysiological recordings	Leptin (↑) and NPY (↓) have opposite effects in their responses to gastric loads in the NTS. NTS neurons are dose-dependently activated by gastric loads
Solomon et al. (2006)	The involvement of specific extrahypothalamic areas in ghrelin and glucose signaling in the stimulation of appetite	Wistar (n=22)	Standard	Anti-ghrelin antibody Non-immunospecific antibody	Immunohistochemistry	Anti-ghrelin antibody ↓ food intake and c-Fos expression in the NTS; ↑ c-Fos expression in the NTS after insulin administration
Sutton et al. (2005)	The involvement of the ERK signaling pathway in the integration of the melanocortin receptor in the caudal brainstem	Sprague- Dawley (n=89)	Standard	MTII CCK U0126 cAMPS-Rp SHU9119	Western blot	MTII ↑ phosphorylation of ERK1/2; MTII and CCK ↑ meal size and satiety rate; U0126 and cAMP-Rp inhibit the effects of MTII
Williams et al. (2006)	The anorexic effects of GLP-1 after leptin and exidin-4 treatment	Koletsky Fa ^k /Fa ^k and fa ^k /fa ^k , Wistar (n=87)	Standard	Leptin GLP-1 Exidin-4 (Ex4)	Immunohistochemistry	Leptin pretreatment ↑ anorexia and weight loss induced by GLP-1 or Ex4 over 24 h; fasting attenuated the anorexic response to GLP-1 or Ex4 treatment via a leptin-dependent mechanism

Table 1: Characteristics of studies included in the review (continued)

Study	Parameter Evaluated	Species	Diet	Drugs/ Peptides	Techniques	Results
Williams et al. (2008)	The involvement of catecholaminergic neurons in the caudal brainstem in the interaction between leptin and CCK in the rat NTS	Wistar (n=8-10)	Standard	Leptin CCK-8	Immunofluorescence Laser capture RT-PCR	Leptin pretreatment ↑ the number of NTS cells expressing c-Fos and the number of TH ⁺ cells; leptin and CCK ↑c-Fos mRNA in the TH cell-enriched samples
Williams et al. (2009)	The effects of leptin signaling on the responses to CCK	Wistar (n= 90)	Standard	CCK Leptin Devazepine	Immunohistochemistry	Leptin inhibited food intake and enhanced the anorectic responses to CCK. Devazepine blocked the responses of leptin
Zittel et al. (1999)	The expression of c-Fos protein in NTS neurons in response to exogenous CCK or food intake	Sprague-Dawley (n=98)	Standard	CCK-8	Immunohistochemistry	↑ c-Fos expression in the NTS in response to CCK; there was a positive relationship between the expression of c-Fos and the amount of food intake

*α-MSH: alpha-melanocyte-stimulating hormone; cAMP- response element- binding protein CGRP: calcitonin gene-related peptide; EGFP: enhanced green fluorescent protein; ERK: extracellular signal-regulated kinase; p-STAT3: phospho-signal transducer and activator of transcription 3; rAAV: recombinant adeno-associated viral vector.

DISCUSSION

Through the analysis of selected studies in this systematic review, it was possible to observe the activation patterns of neurons in the nucleus of the solitary tract in response to food stimuli. The majority of evidence suggests that in this nucleus, the neuronal representation of food-related stimuli is able to modulate certain aspects of feeding behavior that regulate the initiation and termination of food intake and meal size in the short-term [1,44,45,48,64].

This food intake regulation that leads to satiety was analyzed from studies involving the quantification and expression of specific subpopulations of neurons in the NTS after stimulation by lesions, palatable/high-protein diets, gastric distention/infusion and peripheral and/or central administration of gastrointestinal peptides and hormones [48,52,61]. This last evaluated parameter allows us to clarify the important aspects of anorexigenic signaling in the NTS, particularly with regard to the action of gastrointestinal signals, such as CCK and GLP-1, in the regulation of feeding behavior [1, 50,57-59,65,66].

Zittel and colleagues (1999), assessing the responsiveness of neurons in the NTS to the administration of exogenous CCK, observed increased expression of the c-Fos protein in the medial and rostral regions of the nucleus; this increase was associated with reduced food intake. According to the authors of this study, the administration of this peptide activates neurons in the NTS in different ways, either through an interaction with receptors present on vagal nerve fibers or through direct action on the NTS through the area postrema. Moreover, this activation also appears to be the result of signaling by extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2), as observed by Sutton and colleagues (2005), and the interaction of this peptide with neurotransmitters, such as serotonin.

Hayes and Covasa (2006), in two different studies that evaluated the participation of the 5-HT₃ receptor in the mediation of the effects of CCK in the NTS, observed that this

receptor is involved in both the control of meal size and in mediating the signals produced by CCK. The 5-HT₃ receptor is responsible for the activation of approximately 50% of neurons in the medial region of the NTS in response to gastric distension. This receptor also exerts its influences over other gastrointestinal signals, such as GLP-1.

According to Hayes and colleagues (2009) and Baumgartner et al. (2010), gastric distention or the infusion of GLP-1 via the hepatic portal vein activates NTS neurons, contributing to the inhibition of food intake. The action of GLP-1 on the NTS is similar to that of CCK; both peptides modulate the size but not the frequency of meals. The inhibitory actions of CCK and GLP-1 on food intake seem to be amplified by leptin [55,57-59]. This hormone activates catecholaminergic neurons in the NTS, thereby inducing the reduction of food intake and amplifying the effects of CCK. In the NTS, the leptin receptor (Ob-Rb) is coexpressed with the A2 and C2 catecholamine receptors, where the action of this hormone appears to be mediated by both the direct action of leptin on the NTS and via the hypothalamus [57-59].

This ability of leptin to modulate the signals of satiety and influence other food-related hormones, such as CCK, has also been studied by other researchers in previous years. Emond and colleagues (2001) observed that leptin, when combined with gastric distension, promotes the activation of neurons of both the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the medial and rostral regions of the NTS. Similar results were also obtained by Huo and colleagues (2007) and Schwartz and Moran (2002). The latter also observed that in the NTS, neuropeptide Y (NPY) and leptin exert opposite effects in the regulation of feeding behavior in response to gastric load. According to these authors, the inhibitory actions of leptin on food intake through the NTS may occur in two ways: a) by the action of leptin in hypothalamic regions that express NPY and POMC and which project from the ARC and PVN to the NTS and b) by direct leptin signaling in neurons located in the NTS.

Despite evidence to corroborate the hypothesis that leptin acts on specific sites in the NTS, the neurochemical identity of these neurons and the mechanisms behind these actions are still controversial and require more thorough elucidation.

Ellacott and colleagues (2006), evaluating the neurochemical composition of the NTS POMC neurons and their responsiveness to the peripheral administration of leptin, observed that approximately 30% of these neurons are activated by leptin and thus regulate the long-term effects of this hormone. Conversely, Huo et al. (2006) and Perello and colleagues (2007) suggested that the action of leptin is mediated exclusively by the hypothalamus. One possible explanation for this result is that leptin reduces the activation of POMC neurons located in the caudal region of the NTS. However, these authors believe that the POMC neurons play a role in regulating energy balance because changes in the biosynthesis and expression of these neurons are induced in response to food deprivation.

This phenomenon occurs by another mechanism, perhaps similar to that found in the hypothalamus, involving insulin, glucose and glucocorticoid signaling. It is important to note that the differences in the results obtained by Ellacott and colleagues (2006) and other researchers may only portray the different methodologies employed. In these studies, the experimental models differ according to the time of observation of responses to leptin (30 to 90 minutes) and the strain of mice analyzed. Huo and colleagues (2006) used mice from crosses with animals resistant to the development of obesity.

Like CCK, GLP-1, melanocortin and leptin interact among one another in the control of satiety in the NTS. Other peptides, such as amylin and peptide YY (3-36), also play roles in the control of satiety. Although these gastrointestinal signals may activate neurons in the NTS, the activation of this nucleus does not occur exclusively through this process. The caloric value and composition of food also influence the regulation of food intake via the NTS [45,60,65].

Faipoux and colleagues (2008), analyzing the relationship between the satiety induced by a high-protein diet and the activation of neurons in the NTS, noted that there is a reduction in food intake and an increase in the activity of neurons in the NTS, particularly those that are noradrenergic. A high-protein diet appears to activate multiple pathways, such as the anorectic melanocortin pathway in the ARC and the vagus nerve, that mediates the action of various gastrointestinal signals. Unlike Faipoux et al. (2008), Donovan et al. (2009) observed that animals with a propensity to develop obesity subjected to palatable diets had decreased activity of neurons in the NTS and short-term regulatory changes in termination and meal size. These authors observed that the maintenance of a high-fat diet reduces NTS neuronal activation, possibly due to changes in receptor expression at the level of vagal afferents.

Similarly, Bello and colleagues (2009) evaluated the neural responses of the NTS after acute episodes of caloric restriction and access to palatable diets. Unlike Donovan et al. (2009), Bello and colleagues (2009) observed an increase in neuronal activation in the NTS. These researchers correlated this phenomenon to the increased plasma levels of circulating ghrelin that activates NTS neurons, controlling appetite and metabolism. Ghrelin exerts hyperphagic effects in the NTS, and its action appears to be mediated by noradrenergic neurons. These neurons integrate and establish important connections with other brain areas, such as the lateral hypothalamus, arcuate nucleus, paraventricular nuclei, and dorsomedial nucleus of the amygdala [5,46, 51]. Like ghrelin, galanin is also involved in orexigenic signaling in the NTS, but the role of these peptides in regulating spontaneous food intake in this nucleus is still the subject of debate [5,51,65].

In conclusion, the NTS is involved in the short-term regulation of the initiation, termination and size of the meal independent of the hypothalamus. This regulation can be activated by several mechanisms, of which the signaling and interaction between gastrointestinal peptides and hormones have been studied the most thoroughly. Despite

advances in recent years, many aspects of the mechanism and signaling pathway that the NTS uses to perform its role in the control of feeding behavior remain controversial and need to be further clarified.

REFERENCES

- [1] Menani JV, Colombari E, Talman WT, Johnson AK. Commissural nucleus of the solitary tract lesions reduce food intake and body weight gain in rats. *Brain Res* 1996; 740: 102-8.
- [2] Sanchez-Lasheras C, Konner AC, Bruning JC. Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31: 4-15.
- [3] Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 2002; 26: 393-428.
- [4] Solomon A, De Fanti BA, Martínez JA. The nucleus tractus solitarius (NTS) participates in peripheral ghrelin glucostatic hunger signalling mediated by insulin. *Neuropeptides* 2006; 40: 169-75.
- [5] Grill HJ, Kaplan JM. Interoceptive and integrative contributions of forebrain and brainstem to energy balance control. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:S73-7.
- [6] Berthoud HR. The caudal brainstem and the control of food intake and energy balance. In: Stricker E, Woods S. *Handbook of behavioral neurobiology*. 2nd ed. New York: Springer Science; 2004, 14(5): 195-240.
- [7] Grill HJ. Leptin and the systems neuroscience of meal size control. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31: 61-78.
- [8] Schwartz GJ. Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1275-80.
- [9] Rinaman L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Res* 2010; 1350: 18-34.
- [10] Ellacott KL, Halatchev IG, Cone RD. Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem. *Endocrinology* 2006; 147: 3190-5.
- [11] Hayes MR, Bradley L, Grill HJ. Endogenous hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation contributes to the control of food intake by mediating gastric satiation signaling. *Endocrinology* 2009; 150: 2654-9.
- [12] Baumgartner I, Pacheco-Lopez G, Ruttimann EB, Arnold M, Asarian L, Langhans W, et al. Hepatic-portal vein infusions of glucagon-like peptide-1 reduce meal size and increase c-Fos expression in the nucleus tractus solitarius, area postrema and central nucleus of the amygdala in rats. *J Neuroendocrinol* 2010; 22: 557-63.

- [13] Bello NT, Guarda AS, Terrillion CE, Redgrave GW, Coughlin JW, Moron TH. Repeated binge access to a palatable food alters feeding behavior, hormone profile, and hindbrain c-Fos responses to a test meal in adult male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297: R622-31.
- [14] Blevins JE, Chelikani PK, Haver AC, Reidelberger RD. PYY(3-36) induces Fos in the arcuate nucleus and in both catecholaminergic and non-catecholaminergic neurons in the nucleus tractus solitarius of rats." *Peptides* 2008; 29: 112-9.
- [15] Date Y, Shimbara T, Shuichi K, Toshinai K, Ida T, Muramali N, et al. Peripheral ghrelin transmits orexigenic signals through the noradrenergic pathway from the hindbrain to the hypothalamus. *Cell Metab* 2006; 4: 323-31.
- [16] Donovan MJ, Paulino G, Raybould HE. Activation of hindbrain neurons in response to gastrointestinal lipid is attenuated by high fat, high energy diets in mice prone to diet-induced obesity. *Brain Res* 2009; 1248: 136-40
- [17] Emond M, Ladenheim EE, Schwartz GJ, Moran TH. Leptin amplifies the feeding inhibition and neural activation arising from a gastric nutrient preload. *Physiol Behav* 2001; 72: 123-8.
- [18] Emond M, Schwartz GJ, Moran TH. Meal-related stimuli differentially induce c-Fos activation in the nucleus of the solitary tract." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: R1315-21.
- [19] Faipoux R, Tome D, Gougis S, Darcel N, Fromentin G. Proteins activate satiety-related neuronal pathways in the brainstem and hypothalamus of rats." *J Nutr* 2008; 138: 1172-8.
- [20] Faulconbridge LF, Grill HJ, Kaplan JM, Daniels D. Caudal brainstem delivery of ghrelin induces fos expression in the nucleus of the solitary tract, but not in the arcuate or paraventricular nuclei of the hypothalamus. *Brain Res* 2008; 1218: 151-7.
- [21] Hayes MR, Covasa M. Dorsal hindbrain 5-HT₃ receptors participate in control of meal size and mediate CCK-induced satiation. *Brain Res* 2006; 1103: 99-107
- [22] Huo L, Grill HJ, Bjorbaek C. Divergent regulation of proopiomelanocortin neurons by leptin in the nucleus of the solitary tract and in the arcuate hypothalamic nucleus." *Diabetes* 2006; 55: 567-73.
- [23] Huo L, Maeng L, Bjorbaek C, Grill HJ. Leptin and the control of food intake: neurons in the nucleus of the solitary tract are activated by both gastric distension and leptin." *Endocrinology* 2007; 148(5): 2189-97.
- [24] Huo L, Gamber KM, Grill HJ, Bjorbaek C. Divergent leptin signaling in proglucagon neurons of the nucleus of the solitary tract in mice and rats. *Endocrinology* 2008; 149: 492-7.
- [25] Perello M, Stuart RC, Nillni EA. Differential effects of fasting and leptin on proopiomelanocortin peptides in the arcuate nucleus and in the nucleus of the solitary tract." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E1348-57.
- [26] Williams DL, Baskin DG, Schwartz MW. Leptin regulation of the anorexic response to glucagon-like peptide-1 receptor stimulation. *Diabetes* 2006; 55: 3387-93.

- [27] Williams DL, Schwartz MW, Bastian LS, Blevins JE, Baskin DG. Immunocytochemistry and laser capture microdissection for real-time quantitative PCR identify hindbrain neurons activated by interaction between leptin and cholecystokinin." *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 285-93.
- [28] Williams DL, Baskin DG, Schwartz MW. Hindbrain leptin receptor stimulation enhances the anorexic response to cholecystokinin." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297: R1238-46.
- [29] Zittel TT, Glatzle J, Kreis ME, Starlinger M, Eichner M, Raybould HE, et al. C-fos protein expression in the nucleus of the solitary tract correlates with cholecystokinin dose injected and food intake in rats. *Brain Res* 1999; 846:1-11
- [30] Li G, Zhang Y, Rodrigues E, Zheng D, Matheny M, Cheng KY, et al. Melanocortin activation of nucleus of the solitary tract avoids anorectic tachyphylaxis and induces prolonged weight loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293:E252.
- [31] Sutton GM, Duos B, Patterson LM, Berthoud HR. Melanocortinergic modulation of cholecystokinin-induced suppression of feeding through extracellular signal-regulated kinase signaling in rat solitary nucleus. *Endocrinology* 2005; 146:3739-47.
- [32] Bello NT, Patinkin ZW, Moran TH. Opioidergic consequences of dietary-induced binge eating. *Physiol Behav* 2011; 104:98-104.
- [33] Giraudo SQ, Kotz CM, Billington CJ, Levine AS. Association between the amygdala and nucleus of the solitary tract in mu-opioid induced feeding in the rat. *Brain Res* 1998; 802:184-8.
- [34] Koegler FH, Ritter S. Galanin injection into the nucleus of the solitary tract stimulates feeding in rats with lesions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Physiol Behav* 1998; 63:521-7.
- [35] Lutz TA, Senn M, Althaus J, Del Prete E, Ehrensperger F, Scharrer E. Lesion of the area postrema/nucleus of the solitary tract (AP/NTS) attenuates the anorectic effects of amylin and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in rats. *Peptides* 1998; 19:309-17.
- [36] Schwartz GJ, Moran TH. Leptin and neuropeptide y have opposing modulatory effects on nucleus of the solitary tract neurophysiological responses to gastric loads: implications for the control of food intake. *Endocrinology* 2002; 143:3779-84.
- [37] Hayes MR, Covasa M. Gastric distension enhances CCK-induced Fos-like immunoreactivity in the dorsal hindbrain by activating 5-HT₃ receptors. *Brain Res* 2006; 1088:120-30.
- [38] Goldstone AP, Mercer JG, Gunn I, Moar KM, Edwards CM, Rossi M, et al. Leptin interacts with glucagon-like peptide-1 neurons to reduce food intake and body weight in rodents. *FEBS Lett* 1997; 415:134-8.
- [39] Helwig M, Archer ZA, Heldmaier G, Tups A, Mercer JG, Klingenspor M. Photoperiodic regulation of satiety mediating neuropeptides in the brainstem of the seasonal Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 2009; 195(7):631-42.

- [40] Zheng H, Patterson LM, Morrison C, Banfield BW, Randall JA, Browning KN, et al. Melanin concentrating hormone innervation of caudal brainstem areas involved in gastrointestinal functions and energy balance. *Neuroscience*2005; 135(2):611-25.
- [41] Morton GJ, Blevins JE, Williams DL, Niswender KD, Gelling RW, Rhodes CJ, et al. Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. *J Clin Invest*2005; 115(3):703-10.
- [42] Hironaka S, Shirakawa T, Toki S, Kinoshita K, Oguchi H. Feeding-induced c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and dorsal medullary reticular formation in neonatal rats. *Neurosci Lett*2000; 293(3):175-8.
- [43] Vrang N, Larsen PJ, Jensen PB, Lykkegaard K, Artmann A, Larsen LK, et al. Upregulation of the brainstem preproglucagon system in the obese Zucker rat. *Brain Res*2008; 1187:116-24.
- [44] Grill HJ, Ginsberg AB, Seeley RJ, Kaplan JM. Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting effects on feeding and body weight. *J Neurosci*1998;18(23):10128-35.
- [45] Qian M, Johnson AE, Kallstrom L, Carrer H, Sodersten P. Cholecystokinin, dopamine D2 and N-methyl-D-aspartate binding sites in the nucleus of the solitary tract of the rat: possible relationship to ingestive behavior. *Neuroscience*1997; 77(4):1077-89.
- [46] Appleyard SM, Bailey TW, Doyle MW, Jin YH, Smart JL, Low MJ, et al. Proopiomelanocortin neurons in nucleus tractus solitarius are activated by visceral afferents: regulation by cholecystokinin and opioids. *J Neurosci*2005; 25(14):3578-85.
- [47] Hayes MR, Skibicka KP, Leichner TM, Guarnieri DJ, DiLeone RJ, Bence KK, et al. Endogenous leptin signaling in the caudal nucleus tractus solitarius and area postrema is required for energy balance regulation. *Cell Metab*2010; 11(1): 77-83.

3. HIPÓTESE

A desnutrição e o tratamento neonatal com ISRS diminuem a responsividade do núcleo do trato solitário na recepção de informações alimentares para manutenção do balanço energético.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral:

Analisar os efeitos da desnutrição ou tratamento neonatal com ISRS sobre a ativação de neurônios do núcleo do trato solitário em resposta a estímulo alimentar.

4.2 Específicos:

Nos diferentes grupos experimentais avaliar:

- ✓ O ganho ponderal;
- ✓ O consumo alimentar;
- ✓ O número de neurônios ativados, através da expressão da proteína FOS, no núcleo do trato solitário em resposta a estímulo alimentar.

5. METODOLOGIA

5.1 Animais

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

Após a adaptação, as ratas em período estral foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho, sendo a prenhez diagnosticada pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. Durante o período de prenhez, as ratas foram alocadas em gaiolas individuais. Após o nascimento dos filhotes foram escolhidos aleatoriamente 8 machos neonatos, considerando o peso entre 6 a 8g, para compor a nutriz. Durante a gestação e/ou lactação foram realizadas manipulações nutricionais e farmacológicas. Na manipulação nutricional, as fêmeas, durante a gestação e lactação, foram submetidas à dieta normoproteica (Grupo Controle (C)/caseína 17%) ou hipoproteica (Grupo Desnutrido (D)/caseína 8%). Após o desmame os filhotes foram submetidos à dieta padrão de laboratório. Na manipulação farmacológica, os animais receberam durante toda a lactação injeções subcutâneas de salina (Grupo Salina (GS)/NaCl 0.9%, 1µl/g) ou fluoxetina (Grupo Fluoxetina (GF)/10mg/Kg [1µl/g]). Durante todo o experimento os animais foram mantidos em condições padrão de biotério seguindo recomendação ética do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Todos os procedimentos foram aprovados de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UFPE (nº 23076.024837/2009-11) (Anexo A).

5.2 Obtenção dos Grupos Experimentais

Inicialmente, os grupos experimentais foram obtidos aleatoriamente de acordo com o tipo de manipulação, se dietética no período perinatal ou farmacológica durante o período neonatal (Figura 1).

Na manipulação dietética, as fêmeas gestantes foram submetidas a uma dieta normoprotéica ou a hipoprotéica durante o período de gestação e lactação (Tabela 1). Em cada ninhada, os animais foram distribuídos aleatoriamente no Grupo Controle (GC) e no Grupo Desnutrido (GD) conforme o descrito a seguir:

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

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

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

Na manipulação farmacológica foi utilizada a Fluoxetina (10 mg/Kg), um inibidor seletivo de recaptação de serotonina, durante a lactação. O fármaco foi obtido na forma de cloridrato de fluoxetina (Bristol-USA) e dissolvido em solução salina (NaCl 0.9%) (MENDES DA SILVA; GONÇALVES et al., 2010). Os ratos neonatos receberam o tratamento uma hora após o início do ciclo escuro (07h00minh), devido ao pico de liberação de 5-HT (SÁNCHEZ; SÁNCHEZ et al., 2008).

Os grupos experimentais foram formados segundo tratamento dos filhotes com fluoxetina ou solução salina durante toda a lactação. Em cada ninhada, os animais foram distribuídos aleatoriamente no Grupo Salina (GS) e no Grupo Fluoxetina (GF) conforme o descrito a seguir:

- **Grupo Salina (GS):** Composto por filhotes que receberam solução de salina (NaCl 0.9%, 1µl/g) via subcutânea, diariamente, durante a lactação (1º ao 21º dia de vida).
- **Grupo Fluoxetina (GF):** Composto por filhotes submetidos ao tratamento com solução de Fluoxetina 10mg/Kg (1µl/g), diariamente, via subcutânea, durante a lactação (1º ao 21º dia de vida).

Posteriormente, esses grupos experimentais foram subdivididos de acordo com a idade dos animais se 35 ou 180 dias de vida, formando os grupos: Controle 35 ou 180, Desnutrido

35 ou 180, Salina 35 ou 180 e fluoxetina 35 ou 180 (Figura 1). Estas idades foram escolhidas por representar indivíduos jovens (35 dias) e adultos (180 dias).

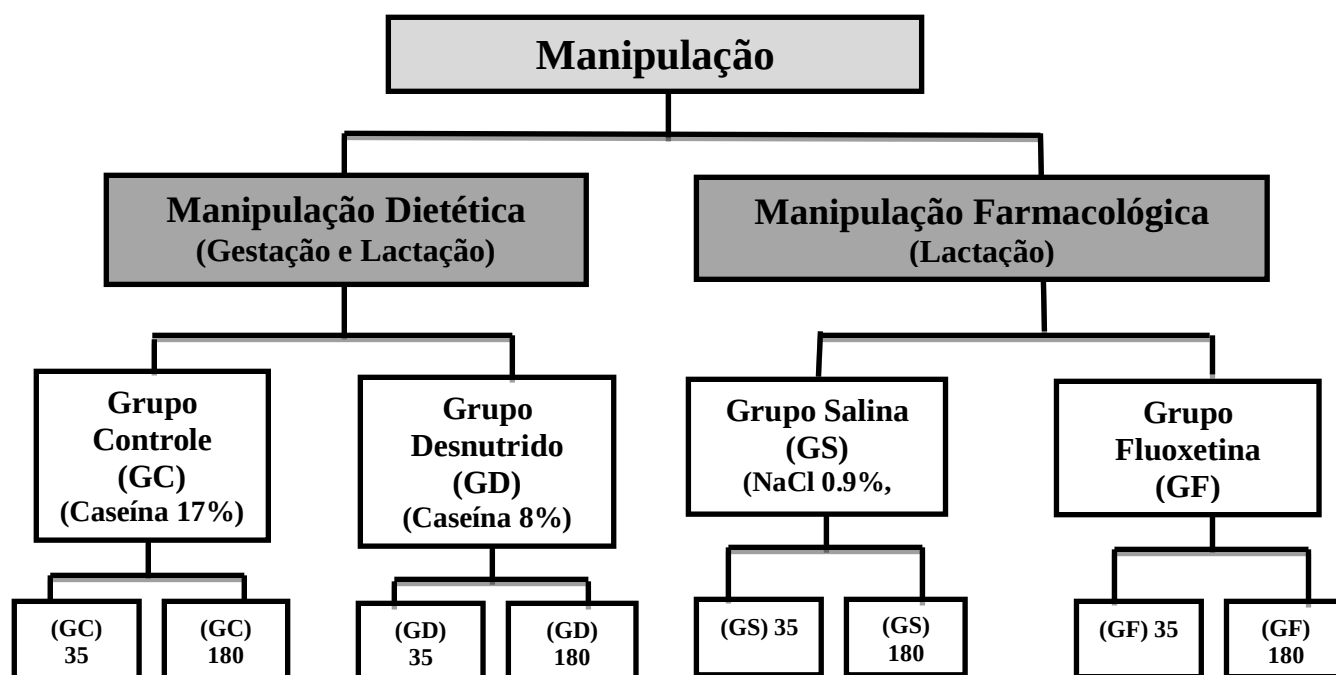


Figura 1: Esquema dos grupos experimentais.

5.3 Procedimentos Experimentais

5.3.1 Peso Corporal

O peso corporal dos animais de cada grupo experimental (GC; GD; GS e GF) foi acompanhado periodicamente, sendo avaliados do 1º ao 35º dia de vida, e aos 180 dias de vida sempre no início do ciclo escuro (07h00min). Em todos os grupos o peso corporal foi registrado utilizando balança digital (Marte, modelo S-100/ sensibilidade de 0,01g).

5.3.2 Consumo Alimentar

Em todos os grupos experimentais o registro da ingestão alimentar foi realizado aos 35 e 180 dias de idade. Os animais foram alojados em gaiolas individuais para adaptação (7 dias) e posterior quantificação da ingestão alimentar. Após quatro horas de privação alimentar, foi disponibilizada uma quantidade conhecida de dieta padrão de biotério (Labina – Purina) por noventa minutos. O consumo alimentar (g) foi obtido pela diferença entre a

quantidade de alimento oferecido e o rejeitado utilizando balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000). Na descrição dos resultados, o consumo alimentar está representado por quilocalorias relativas ao peso corporal de cada animal (Kcal/g peso corporal).

5.3.3 Estímulo Alimentar para expressão da Proteína FOS

Aos 35 ou 180 dias de vida, os animais pertencentes aos grupos GC, GD, GS e GF foram submetidos a estímulos específicos para estudo da expressão da proteína FOS. Assim, estes animais foram privados de alimentos por quatro horas seguida da exposição a um estímulo alimentar (dieta padrão) por 90 minutos. Após esse período, os animais foram anestesiados e perfundidos para obtenção dos encéfalos. A proteína FOS pertencente ao grupo de proteínas nucleares que se ligam a sítios reguladores e promotores do DNA, controlando a transcrição de inúmeros genes alvos e efetores. Esta proteína é codificada pelo proto-oncogene de ativação imediata (IGEs) c-FOS, um gene transitório e rapidamente expresso (entre 20 a 90 minutos) em muitos tecidos em resposta a estímulos variados como proliferação celular, despolarização de neurônios, apoptose, estímulo nociceptivo, alimentar, entre outros (MORGAN; CURRAN, 1986; DEL BEL; TITZE-DE-ALMEIDA et al., 1993; HOFFMAN; SMITH et al., 1993, PRADO; DEL BEL, 1998). A utilização da técnica de marcação da proteína FOS é uma das mais utilizadas para avaliação dos efeitos de estímulos ambientais, mapeamento da atividade celular e identificação de áreas encefálicas determinadas, uma vez que essa proteína participa no armazenamento de informações, na percepção e mudanças exteriores, no processo adaptativo, além de influenciar as atividades neuronais que podem resultar em mudanças duradouras no sistema nervoso (HERRERA; ROBERTSON, 1996; HOFFMAN; LYO, 2002)

5.3.4 Perfusão Transcardíaca

Os animais foram anestesiados profundamente com pentobarbital (50mg/Kg pc), em seguida foram fixados em superfície apropriada para o procedimento de abertura da cavidade torácica. Para acesso ao ventrículo esquerdo, onde foi introduzida a cânula para perfusão, foi realizado inicialmente um corte na parede do abdome expondo-se o processo xifóide. Este corte 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%) a temperatura ambiente para remoção do sangue dos vasos. Este procedimento previne a formação de coágulos e propicia a correta penetração do fixador nos tecidos. A perfusão com salina foi seguida com a infusão de 400 mL solução fixadora (4% de paraformaldeído, pH 7,4, em 4^o C). Quando foi observada a contração dos membros superiores, indicando a chegada do fixador nesta região, foi adicionado gelo sobre a cabeça do animal para minimizar a degradação protéica no encéfalo. Ao final da passagem do fixador, os encéfalos foram retirados do crânio e pós-fixados na mesma solução fixadora acrescida de sacarose (20%) durante 4 horas. Após esse período, foram armazenados em solução crioprotetora (Tampão fosfato de sódio PBS - mais sacarose 20%) por 6-24 h.

5.3.5 Imunohistoquímica

Os encéfalos obtidos após o procedimento de perfusão foram crio-seccionados em cortes coronais de 40µm de espessura utilizando-se criomicrotomo de congelamento (ANCAP-297). Cinco séries de cortes foram coletadas, para cada animal, em placa de acrílico (25 cavidades) com solução anticongelante e armazenadas a -20^oC.

Uma série de cortes foi submetida a reações de imunohistoquímica contra proteína Fos. Nesse procedimento os cortes coronais da série foram removidos da solução anti-congelante e submetidos a três séries de lavagens. Na primeira foram lavados em PBS (3 x 10 min), na segunda com água oxigenada 0,6% (1 x 5 min) (para bloquear a atividade da peroxidase endógena e de alguns sítios inespecíficos de união ao anticorpo) e na terceira novamente em PBS (3 x 10 min) para remover os resíduos do pós fixador. Em seguida foram incubados em solução com anticorpos primários anti-FOS (feito em coelho) por 48 h. Esta solução é composta por PBS, Triton (0,3 %), soro normal de cabra (NGS 5 %) e anticorpo contra a proteína FOS (1:10.000) (Calbiochem, Bad Soden, Alemanha). Durante a incubação os cortes permaneceram em recipientes de 1,5 ml posicionados em uma incubadora agitadora refrigerada (Marconi- MA83) protegido da luz. Após a incubação os cortes foram submetidos a lavagens em PBS (3 x 10 min) e posteriormente incubados em solução com anticorpo

secundário por 90 min. Esta solução é composta por Triton (0,3%), PBS e anticorpo secundário biotinilado feito em cabra contra coelho (1:200) (Sigma- B8895). Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens com KPBS (3 x 10 min) e outra incubação (90 min) com complexo avidina-biotina-peroxidase 1 % (Vectastain, Camon, Wiesbaden, Alemanha). Após esse período de incubação, os cortes foram lavados em PBS (2 x 10 min) e acetato de sódio (2X 10 min) sendo em seguida realizada, durante 5 minutos, a reação de revelação imunoperoxidase com 3,3-diaminobenzidina (DAB/Sigma D5637) diluído em solução de água destilada, níquel sulfato amônio (NAS), acetato de sódio (0.2 M), cloreto de amônio e β -d-Glucose. Após esta reação foi acrescentada na solução anterior a Glucose oxidase até os cortes obterem a cor marrom claro/púrpura. Para neutralizar esta reação, os cortes foram submetidos a lavagens com acetato de sódio (2 x 10 min) e PBS (3 x 10 min).

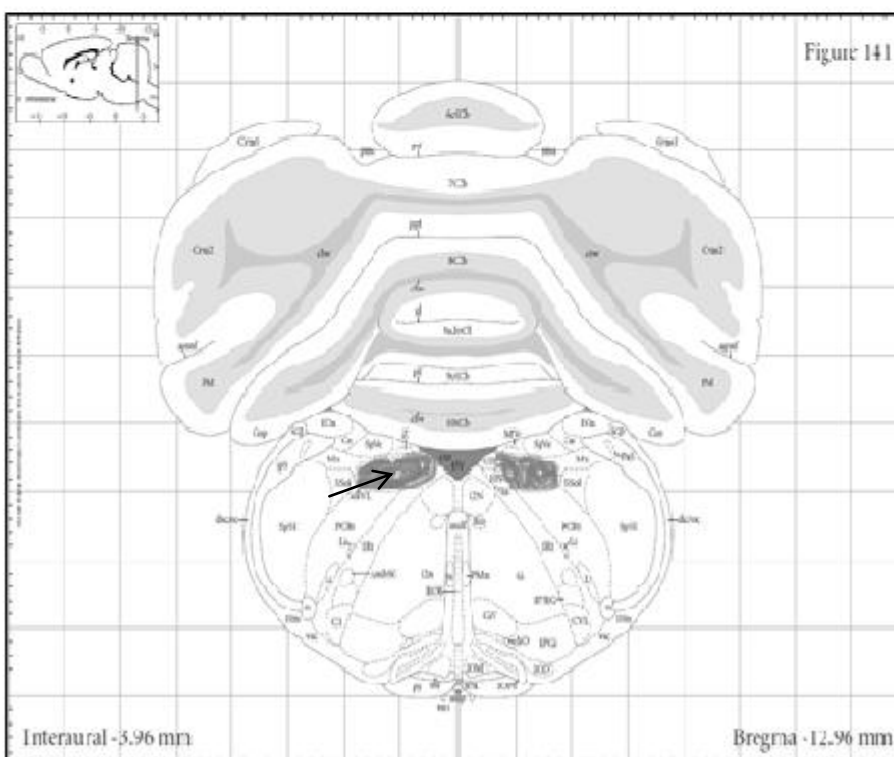
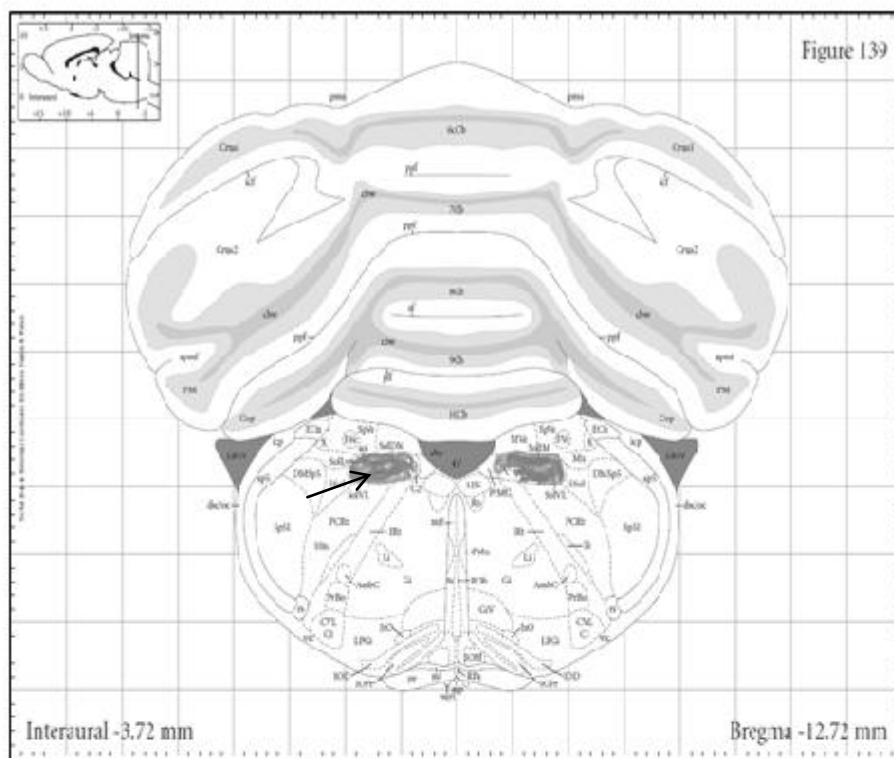
Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas, passaram por processos de desidratação e diafanização e foram, por fim, cobertos com lamínulas e DPX. No processo de desidratação ocorre imersão dos cortes em uma sequência crescente de concentrações de álcoois (50 %, 70 %, 95 %-I, 95 %-II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

5.3.6 Análise quantitativa de neurônios imunorreativos a proteína FOS no NTS

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

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

A



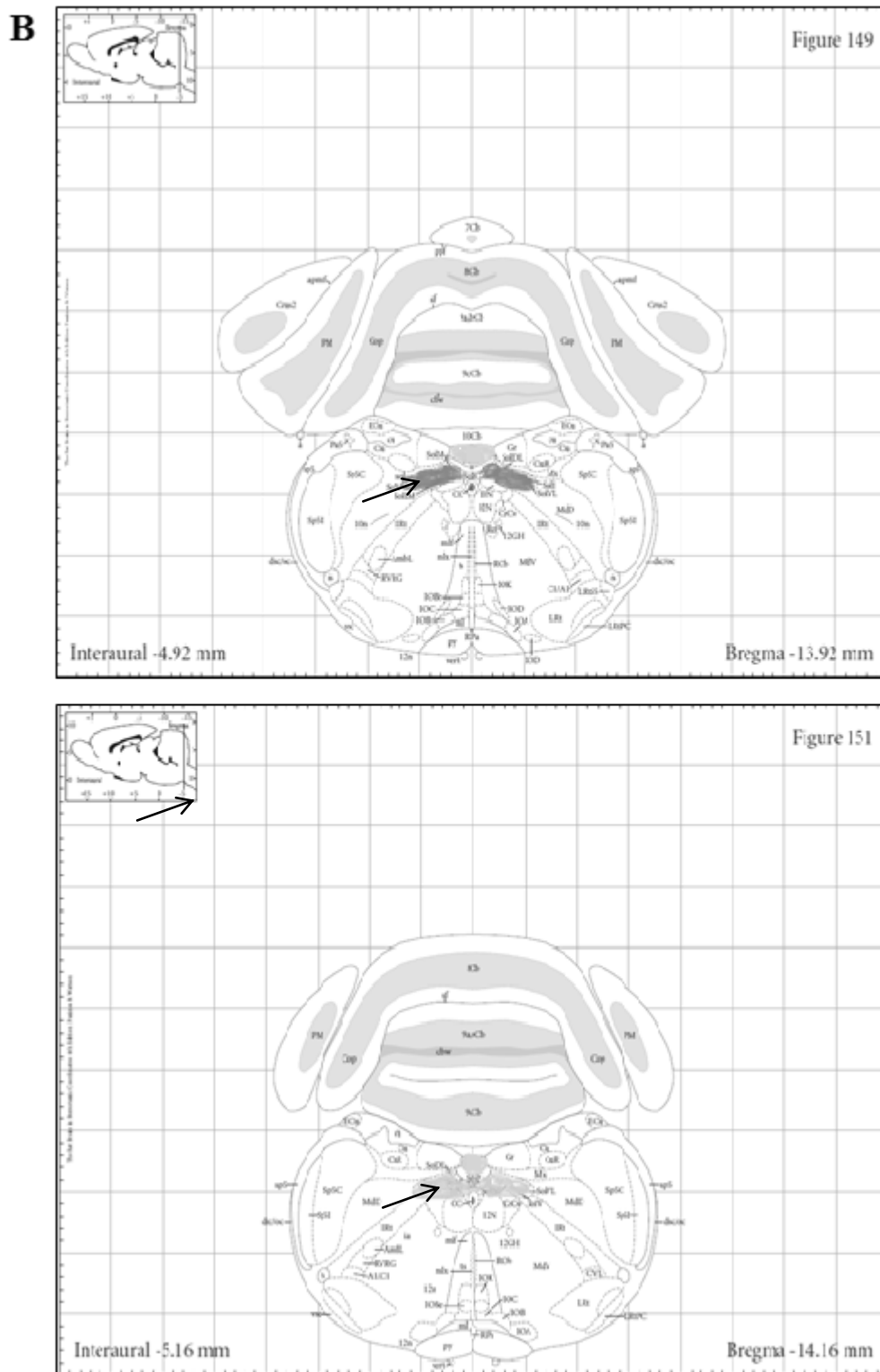


Figura 2- Faixas de Bregmas utilizadas para delimitação do NTS. (A) Faixas relativas à porção rostral do NTS (seta); (B) Faixas de Bregma relativa à porção medial do NTS (seta).

A análise quantitativa dos neurônios imunorreativos a proteína FOS nestas faixas de Bregma foi realizada a partir do programa ImageJ versão 1.45, sendo quantificados em cada área apenas as marcações evidentes na coloração preta ou marrom escuro (Figura 3).

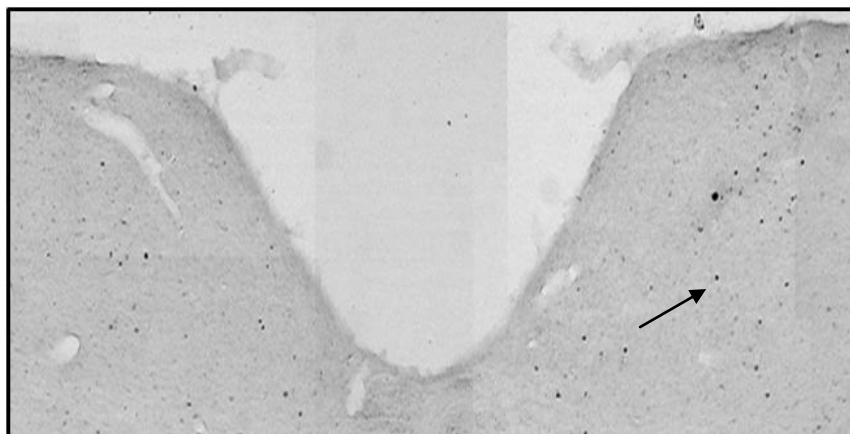


Figura 3- Fotomicrografia do Núcleo do Trato Solitário evidenciando as marcações na coloração preta ou marrom escuro (seta) incluídos nas análises quantitativas dos neurônios imunorreativos a proteína FOS.

5.4 Análises Estatísticas

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

6. RESULTADOS

Título: A desnutrição perinatal e o tratamento neonatal com Fluoxetina modificam a quantidade de neurônios ativados no núcleo do trato solitário em resposta ao estímulo alimentar

Autores: ¹ Lívia de Almeida Lira, ²Larissa Cavalcanti do Amaral Almeida, ¹Tássia Karin Ferreira Borba, ¹Amanda Alves Marcelino da Silva, ¹Lígia Cristina Galdino;^{1,3}Sandra Lopes de Souza, ⁴Raul Manhães de Castro

Afiliação dos autores: ¹ Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil; ² Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. ³ Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Endereço para correspondência: Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Anatomia, Centro de Ciências Biológicas – CCB/UFPE Av. Prof Moraes Rêgo, 1235 Recife - PE, 50670-420. E-mail: sanlopesufpe@gmail.com

RESUMO

Nos períodos iniciais do desenvolvimento, isto é, a gestação e lactação, as influências de estímulos como a desnutrição e fármacos como inibidores seletivos da receptação da serotonina (ISRS) podem conduzir a vários prejuízos morfofuncionais e comportamentais nos órgãos e sistemas em geral, inclusive nas vias e estruturas que controlam o balanço energético e comportamento alimentar. Apesar de um relativo número de trabalhos enfocarem os efeitos destes estímulos sobre estruturas como hipotálamo, poucos estudos tem direcionado suas atenções para consequências a longo prazo da desnutrição ou do tratamento neonatal com ISRS sobre o Núcleo do Trato Solitário (NTS). O objetivo desse trabalho foi investigar no NTS os efeitos da desnutrição ou tratamento com ISRS durante os estágios iniciais do desenvolvimento sobre o controle da ingestão alimentar. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar distribuídos nos grupos Controle e Desnutrido formados por animais cujas mães receberam durante a gestação e lactação dieta contendo 17% ou 8% de caseína respectivamente e nos grupos Salina e Fluoxetina, compostos por filhotes que receberam, respectivamente, solução de salina (NaCl 0.9%,) ou Fluoxetina (10mg/Kg) via subcutânea,

diariamente, do 1º ao 21º dia de vida. Foram avaliados aos 35 e 180 dias de vida: a) Peso corporal; b) Ingestão Alimentar; c) Expressão da proteína Fos por imunohistoquímica no NTS em resposta a estímulo alimentar. As áreas estudadas foram identificadas e os neurônios imunorreativos quantificados através do microscópio ótico de campo claro com auxílio do atlas estereotático de Paxinos e Watson (1998). Com base nessas avaliações, o presente trabalho demonstrou que: a) a desnutrição perinatal promoveu aumento no consumo alimentar e número de células ativadas nas porções rostral (Controle= $166,3 \pm 33,8$ vs Desnutrido= $297,8 \pm 33$, $P=0.028$) e medial (Controle= $167,8 \pm 47,44$ vs Desnutrido= $291,2 \pm 28,3$, $P=0.0043$) do NTS em resposta a estímulo alimentar apenas em animais com 35 dias de vida; b) o tratamento neonatal com fluoxetina promoveu aumento no número de neurônios ativados em resposta a estímulo alimentar na porção rostral (Salina= $218,3 \pm 6,6$; Fluoxetina= $367 \pm 25,9$, $P=0.005$) de animais adultos (180 dias). Estes resultados indicam que o núcleo do trato solitário é uma estrutura particularmente vulnerável as influências da manipulação nutricional e farmacológica nos estágios iniciais do desenvolvimento.

Palavras-Chave: Desnutrição perinatal, Programação, Núcleo do trato solitário, Tratamento neonatal com ISRS

1. INTRODUÇÃO

A ideia de que a exposição a ambientes hostis ainda durante a vida intrauterina e pós-natal pode predispor o organismo a desenvolver doenças metabólicas na vida adulta, em particular a obesidade, já está bem estabelecida na literatura (HALES; BARKER, 2001; BELLINGER; LILLEY et al., 2004; GLUCKMAN; HANSON et al., 2010; PATEL; SRINIVASAN, 2011; VIEAU, 2011).

Um grande corpo de evidências aponta a desnutrição, seja calórica ou proteica, e a exposição ao tratamento com fármacos inibidores seletivos da receptação da serotonina (ISRS), como importantes indutores de alterações morfofisiológicas e comportamentais que podem conduzir ao desenvolvimento destas desordens (MANHÃES-DE-CASTRO; BARRETO MEDEIRO et al., 1998; MENDES DA SILVA; DESAI; GAYLE et al., 2005; LI; SLOBODA, 2011).

Além de promover alterações no desenvolvimento sensório-motor (TORRERO; REGALADO et al.,2000), déficit de aprendizado e memória (MORGANE; MOKLER et al., 2002), diminuição das medidas craniais e do encéfalo (MAGALHÃES; LIMA et al.,2006), anormalidades cardiovasculares (TOSCANO; AMORIM et al, 2008), entre outras desordens, a desnutrição e/ou o tratamento com ISRS nas fases iniciais da vida também estão associado a modificações nas vias e estruturas que controlam o balanço energético e o comportamento alimentar (BARRETO MEDEIRO; MENDES DA SILVA et al., 2001; LOPES DE SOUZA;OROZCO-SOLÍS et al.,2008; OROZCO-SOLÍS; LOPES DE SOUZA et al.,2009;).

Modelos animais para desnutrição demonstram que a exposição precoce a dietas com baixo teor de proteínas ou calorias induz a hiperfagia, preferência por alimentos palatáveis, redução do peso corporal e retardo na saciedade acompanhada do aumento do tamanho das refeições (BELLINGER; LILLEY et al., 2004; DESAI; GAYLE et al., 2005; LOPES DE SOUZA;OROZCO-SOLÍS et al.,2008; OROZCO-SOLÍS; LOPES DE SOUZA et al.,2009).

Após a manipulação nutricional perinatal ainda são observadas alterações nos níveis de insulina, leptina e de neurotransmissores como dopamina, relacionados à motivação e recompensa e serotonina, cujos níveis hipotalâmicos se encontram elevados em organismos desnutridos (OROZCO-SOLÍS; LOPES DE SOUZA et al.,2009; OROZCO-SOLÍS; MATOS et al., 2010; REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Semelhantes efeitos são observáveis após o tratamento perinatal com ISRS que é capaz ainda de promover modificações nos níveis de expressão de receptores serotoninérgicos associados ao comportamento alimentar (CABRERA; BATTAGLIA, 1994; HOMBERG; SCHUBERT et al., 2010)

Grande parte das pesquisas que estudam essa temática relacionam os efeitos adversos de ambientes nutricionalmente inadequados e da exposição precoce a fármacos como ISRS sobre estruturas como o hipotálamo, responsável pelo controle do balanço energético (NOWAK; GORE,1999;AHIMA;HILEMAN, 2000; ONG;AHMED et al., 2000; GROVE; BROGAN et al.,2001; SWITHERS, 2003; OROZCO-SOLÍS; LOPES DE SOUZA et al.,2009; OROZCO-SOLÍS; MATOS et al., 2010).

Embora esta estrutura tenha um papel fundamental na regulação do comportamento alimentar, outras regiões encefálicas também contribuem, de forma significativa, no controle deste comportamento (WILLIAMS; BING et al., 2001; BADMAN; FLIER, 2005; GRILL, 2006; SHÁNCHEZ-LASHERAS; KONNER et al, 2010). Dentre estas regiões, o núcleo do trato solitário (NTS) localizados no tronco encefálico exerce importantes funções mediadoras, integrativas e interoceptivas envolvidas na modulação de determinados aspectos do

comportamento alimentar como o início, o término bem como o tamanho das refeições (GRILL; KAPLAN, 2001; GRILL, 2006; GRILL; HAYES, 2009; GRILL, 2010). Este núcleo possui um impressionante conjunto de neurônios e circuitos que atuam diretamente no controle da ingestão, digestão e absorção dos alimentos (BERTHOUD, 2004). O NTS além de integrar as informações periféricas provenientes do trato gastrointestinal, pâncreas e tecido adiposo, é responsivo a estímulos gustatórios e a informações relacionadas à motivação e recompensa (GRILL, 2006; GRILL; HAYES, 2009; KENNY, 2011). Além disso, mantém conexões diretas e recíprocas com outras estruturas encefálicas envolvidas no controle da ingestão e balanço energético como o núcleo accumbens, vários núcleos hipotalâmicos, a amígdala, a área tegumentar ventral, o núcleo dorsal da rafe e a área postrema (BERTHOUD, 2002; GRILL, 2010; RINAMAN 2010).

Embora o NTS exerça um papel fundamental no controle do comportamento alimentar, poucos estudos abordam as consequências a longo prazo do aporte nutricional inadequado e da exposição a fármacos como ISRS em fases iniciais do desenvolvimento sobre a capacidade deste núcleo em regular o comportamento alimentar, bem como suas implicações para etiologia da obesidade

Neste sentido, este trabalho buscou investigar no NTS os efeitos da desnutrição ou tratamento com ISRS durante os estágios iniciais do desenvolvimento sobre o controle da ingestão alimentar.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações éticas do colégio brasileiro Experimentação Animal (COBEA). Ratas fêmeas da linhagem Wistar pesando entre 200-250g foram obtidas do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco e mantidas sob ciclo claro-escuro de 12/12 horas invertido (escuro: 6:00h às 18:00h / claro: 18:00h às 6:00h) e livre acesso à água e à alimentação (dieta Labina – Purina S/A) por 10 dias antes da manipulação experimental. Essas ratas em período estral foram acasaladas com machos de 3 meses de idade da mesma linhagem sendo a prenhez diagnosticada pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. Após a confirmação da prenhez, as ratas foram alojadas em gaiolas individuais durante toda gestação. Um dia após o nascimento dos filhotes, oito neonatos machos foram escolhidos aleatoriamente para compor

a nutriz. Durante a gestação e/ou lactação foram realizadas manipulações nutricionais e farmacológicas. Na manipulação nutricional, as fêmeas durante a gestação e lactação foram submetidas à dieta normoproteica (Grupo Controle (C)/caseína 17%) ou hipoproteica (Grupo Desnutrido (D)/caseína 8%). Após o desmame os filhotes foram submetidos a dieta padrão de laboratório. Na manipulação farmacológica, os animais receberam durante toda a lactação injeções subcutâneas de salina (Grupo Salina (GS)/NaCl 0.9%, 1µl/g) ou fluoxetina (Grupo Fluoxetina (GF)/10mg/Kg [1µl/g]) (MENDES DA SILVA; GONÇALVES et al., 2010). Posteriormente, os animais de cada grupo experimental foram subdivididos em grupos de acordo com a idade de 35 ou 180 dias de vida. Um total de 8-10 animais foi utilizado por grupo.

2.2 Avaliação do Peso Corporal e Consumo Alimentar

O peso de cada filhote foi aferido do primeiro dia de nascimento até a idade de 22 dias. O peso também foi avaliado aos 35 e 180 dias de idade. Na avaliação do consumo alimentar, cada animal foi alojado em gaiolas individuais e privado de alimentos por 4 horas. O consumo foi mensurado durante 90 minutos e determinado pela diferença entre a quantidade de alimentos ofertada e rejeitado. O peso corporal e consumo alimentar foram registrados utilizando uma balança digital (Marte, modelo S-100/ sensibilidade de 0,01g).

2.3 Imunohistoquímica para expressão da proteína FOS

Os animais pertencentes a cada grupo experimental (controle, desnutrido, salina ou fluoxetina) foram submetidos a um estímulo alimentar (dieta padrão) para estudo da expressão da proteína FOS durante 90 minutos. Após esse período, esses animais foram anestesiados com pentobarbital (50mg/Kg pc) e perfundidos para obtenção dos encéfalos que foram armazenados em solução crioprotetora (Tampão fosfato de sódio PBS - mais sacarose 20%) por 6-24 h. Estes encéfalos foram crio-seccionados em cortes coronais de 40 µm., sendo coletado, para cada animal, cinco séries de cortes em placa de acrílico (25 cavidades) com solução anticongelante e armazenadas a -20°C. Uma série de cortes foi submetida a três séries de lavagens. A primeira série em solução tampão (3x10min em PBS), seguida da incubação por 5 minutos em solução contendo peróxido de hidrogênio 0,6%. Após este período foram novamente lavados em PBS (3x10min) e incubados por 1 hora em solução contendo 5% de

soro normal de cabra, Triton-X 0,3% e PBS. Seguido a este procedimento, os cortes foram expostos ao anticorpo primário anti-Fos (feito em coelho) (Calbiochem) na diluição de 1:10000 por 48 horas à 4°C. Após a remoção da solução contendo o anticorpo primário, os cortes foram lavados em PBS (3X10 min), incubados por 90 minutos em anticorpo secundário biotilado feito em cabra contra coelho (1:1000) e em complexo avidina-biotina-peroxidase 1 % (Vector Laboratories) por mais 90 minutos. Após a remoção dos cortes da incubação, estes foram lavados em PBS (2X10 min) e em solução de acetato de sódio (0.1 m, pH 6.0). Os cortes foram submetidos à reação de revelação com 3,3-diaminobenzidina (DAB/Sigma).

2.4 Análise Quantitativa de neurônios imunorreativos a proteína FOS

Os neurônios imunorreativos a proteína FOS foram identificados e quantificados a partir de fotomicrografias adquiridas através de uma câmera digital (Samsung SHC-410NAD) adaptada ao microscópio Olympus BX50 e um computador FUNTHEC. A aquisição das imagens foi realizada utilizando a objetiva de 10x e o software Tv Turner Application. A delimitação do NTS foi realizada com auxílio do Atlas Estereotático de Rato (PAXINOS; WATSON, 2005) e a quantificação de neurônios que expressam c-FOS nas áreas estudadas foi realizada através do software ImageJ. Foram analisadas as faixas de bregma -12,72 e -12,96 correspondente a porção rostral do NTS e as faixas -13,96 e -14,16 correspondente a porção medial do NTS.

2.5 Análises Estatísticas

Os valores referentes ao peso corporal, consumo alimentar e análise quantitativa dos neurônios imunorreativos a proteína FOS no NTS foram apresentados em média e erro padrão, sendo utilizado o Teste t para comparação de cada grupo com o seu controle. Em todas as avaliações o nível de significância foi considerado P igual ou menor que 0.05. Todos os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism 5, versão 7.

3. RESULTADOS

3.1 Efeitos da restrição proteica perinatal e o tratamento neonatal com fluoxetina sobre o peso corporal e consumo alimentar

Durante a lactação foi observado que animais desnutridos apresentaram redução no peso corporal a partir do 7º dia ($8,4 \pm 1,1$, $p = 0.0004$) quando comparado ao seu controle ($17,6 \pm 1,1$) (figura 1A). Esta redução persistiu até os 35 dias de idade ($74,2 \pm 2$), não sendo observada em animais desnutrido de 180 dias de vida (Tabela 1). Semelhantes resultados foram observados em animais submetidos ao tratamento neonatal com fluoxetina que apresentaram diminuição do peso corporal a partir do 7º dia de vida pós-natal ($17,1 \pm 0,2$, $p = 0,0069$), porém nestes animais esta redução persistiu após o desmame estando presente aos 35 dias e 180 dias de idade (Tabela 1).

Em relação ao consumo alimentar, o grupo desnutrido apresentou maior ingestão de alimentos aos 35 e aos 180 dias de vida quando comparado ao seu controle. Porém, quando avaliamos os efeitos do tratamento neonatal com fluoxetina sobre o consumo alimentar, não foram observadas diferenças entre o grupo salina e fluoxetina nas idades analisadas (Tabela 1).

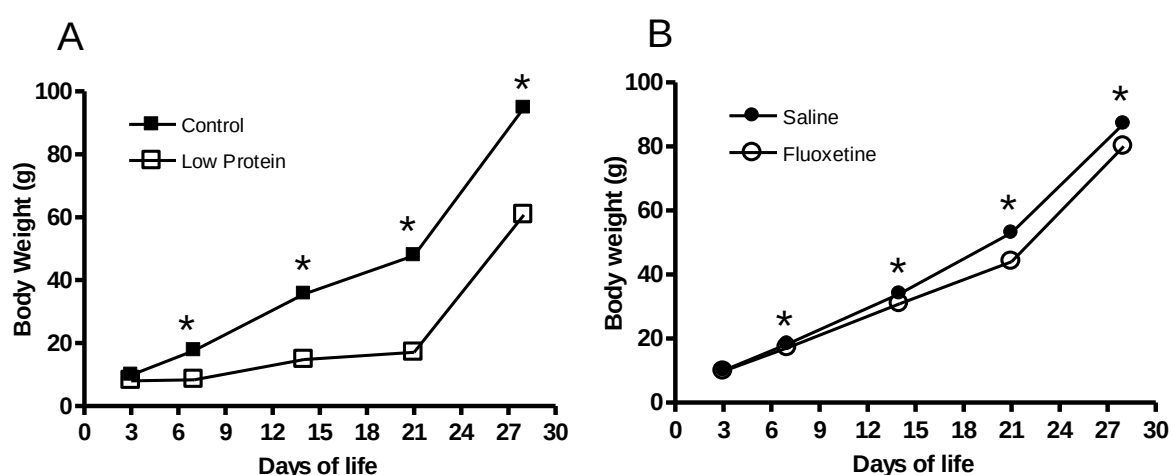


Figura 1: Peso corporal de animais submetidos à desnutrição perinatal ou tratamento neonatal com Fluoxetina. Os filhotes foram submetidos à dieta normoprotéica ou hipoproteica (17% ou 8% de caseína, respectivamente) durante toda gestação e lactação (A). Os filhotes receberam, diariamente, solução salina (NaCl 0,9%, s.c) ou fluoxetina (10mg/Kg) do 1º ao 21º dia de vida (B). Os dados estão representados em média $\pm$ desvio padrão. * Indica diferença entre os grupos ($p < 0.01$). T test –student.

Tabela 1: Peso Corporal e Consumo alimentar de animais submetidos à desnutrição perinatal ou tratamento neonatal com fluoxetina.

Grupos	Peso Corporal		Consumo Alimentar	
	35 dias	180 dias	35 dias	180 dias
Controle	95,8±2,9	442,2±21,1	6,8±0,6	6,6±0,4
Desnutrido	74,2±2*	376,1±20,3	11,9±0,9*	10±0,8*
Salina	87,1±2,1	448±12,4	9,9±0,9	3,4±0,9
Fluoxetina	80±2,1*	388±12*	9,5±0,4	4,1±0,7

Valores representados em média±erro padrão. *p<0.05, Teste t student.

3.2 Efeito da restrição proteica perinatal sobre a expressão de FOS no NTS

Quando comparados ao seu controle, ratos desnutridos no período perinatal apresentaram aumento no número de células FOS imunorreativas na porção rostral (C=166,3±33,8, n=4 vs D=297,8±33, n=5, P=0.028) quanto medial (C=167,8±47,4, n=4 vs D=291,2±28,3, n=6, P=0.043) do NTS aos 35 dias de vida (Figura 2A e 2B). No entanto, não foram observadas diferenças no número de células FOS imunorreativas em nenhuma das regiões do NTS analisadas em animais desnutridos de 180 dias de idade (Rostral: C=214,5±48,2, n=4 vs D=255±36,9, n=4; Medial: C=184,6±59,3, n=5 vs D=286,8±9,7, n=4,). Foi possível observar tendência para maior número de células imunorreativas em animais desnutridos comparado aos seus controles. Fotomicrografias representativas evidenciando marcações FOS na porção rostral e medial do NTS podem ser observadas nas Figuras 3 e 4.

3.3 Efeito do tratamento neonatal com fluoxetina sobre a expressão de FOS no NTS

O tratamento neonatal com fluoxetina promoveu aumento no número de células c-fos positiva (GS=218,3±66, n=3 vs GF=367±25,9, n=4, P=0.005) na porção rostral do NTS de animais de 180 dias (Figura 2C). Não foram observadas diferenças significativas no número de marcações na porção rostral (GS=143,7±27,1, n=4 vs GF=187±56,8, n=4) do NTS de animais de 35 dias. Na porção medial do NTS não foram observadas alterações na expressão

de Fos no grupo Fluoxetina quando comparado ao grupo salina aos 35 ou 180 dias de vida (35 dias: GS=200,3±37,8, n=3 vs GF=278,8±37,9, n=4; 180 dias: GS=102,7±18,3, n=3 vs GF=355,8±50,1, n=4) (Figura 2D). Fotomicrografias representativas evidenciando marcações c-FOS na porção rostral e medial do NTS pode ser observado nas Figuras 5 e 6.

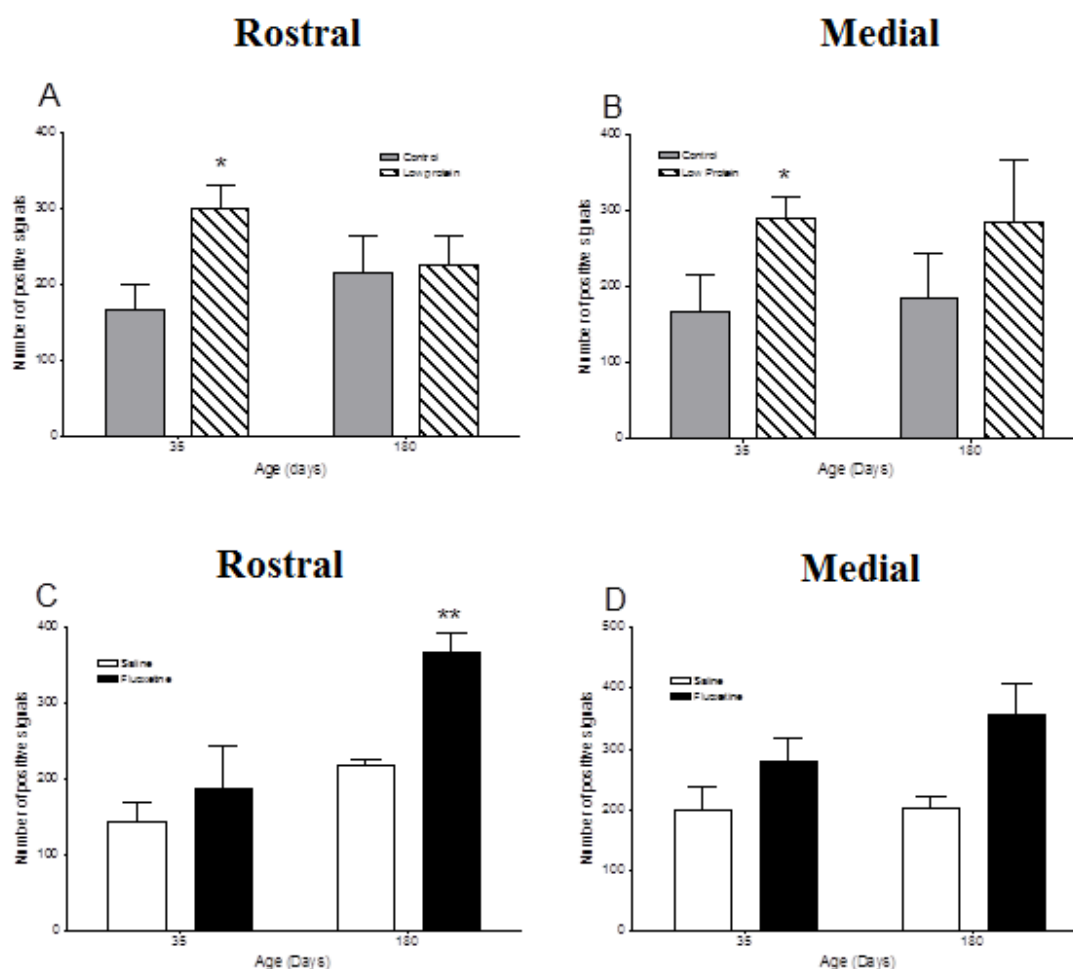


Figura 2- Análise quantitativa do número de células c-FOS positiva no NTS de animais submetidos a desnutrição perinatal (A e B) ou tratamento neonatal com fluoxetina (C e D). Número de células c-FOS positiva na porção rostral (A) e medial (B) do NTS em animais submetidos a desnutrição perinatal. Número de células c-FOS positiva na porção rostral (C) e medial (D) do NTS em animais submetidos ao tratamento neonatal com Fluoxetina. Valores representados em média e $\pm$ EP. Foi utilizado Test t para a comparação entre os grupos, * $p < 0,05$.

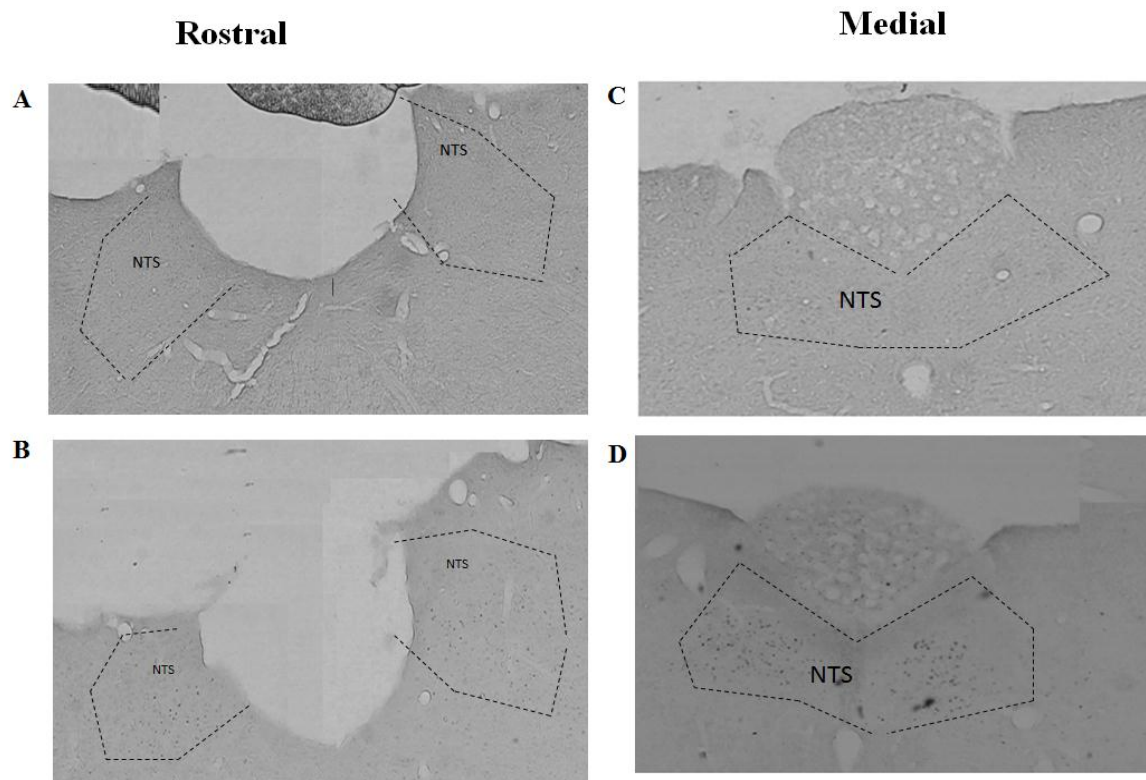


Figura 3- Fotomicrografias evidenciando células c-FOS positivas no NTS de animais de 35 dias submetidos à manipulação nutricional. (A) Controle-Porção rostral do NTS; (B) Desnutrido-Porção rostral do NTS; (C) Controle-Porção medial do NTS; (D) Desnutrido-Porção Medial do NTS. (NTS- núcleo do trato solitário).

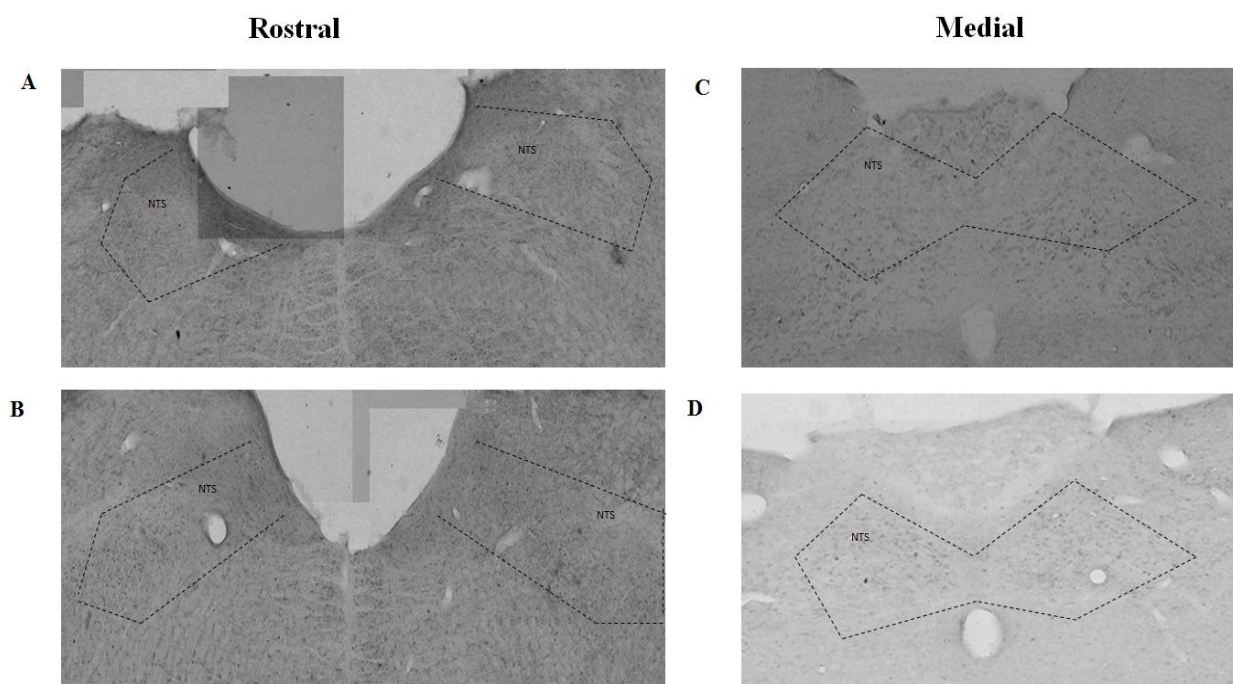


Figura 4- Fotomicrografias evidenciando células c-FOS positivas no NTS de animais de 180 dias submetidos à manipulação Nutricional. (A) Controle-Porção rostral do NTS; (B) Desnutrido-Porção

rostral do NTS; (C) Controle-Porção medial do NTS; (D) Desnutrido-Porção Medial do NTS.(NTS-núcleo do trato solitário).

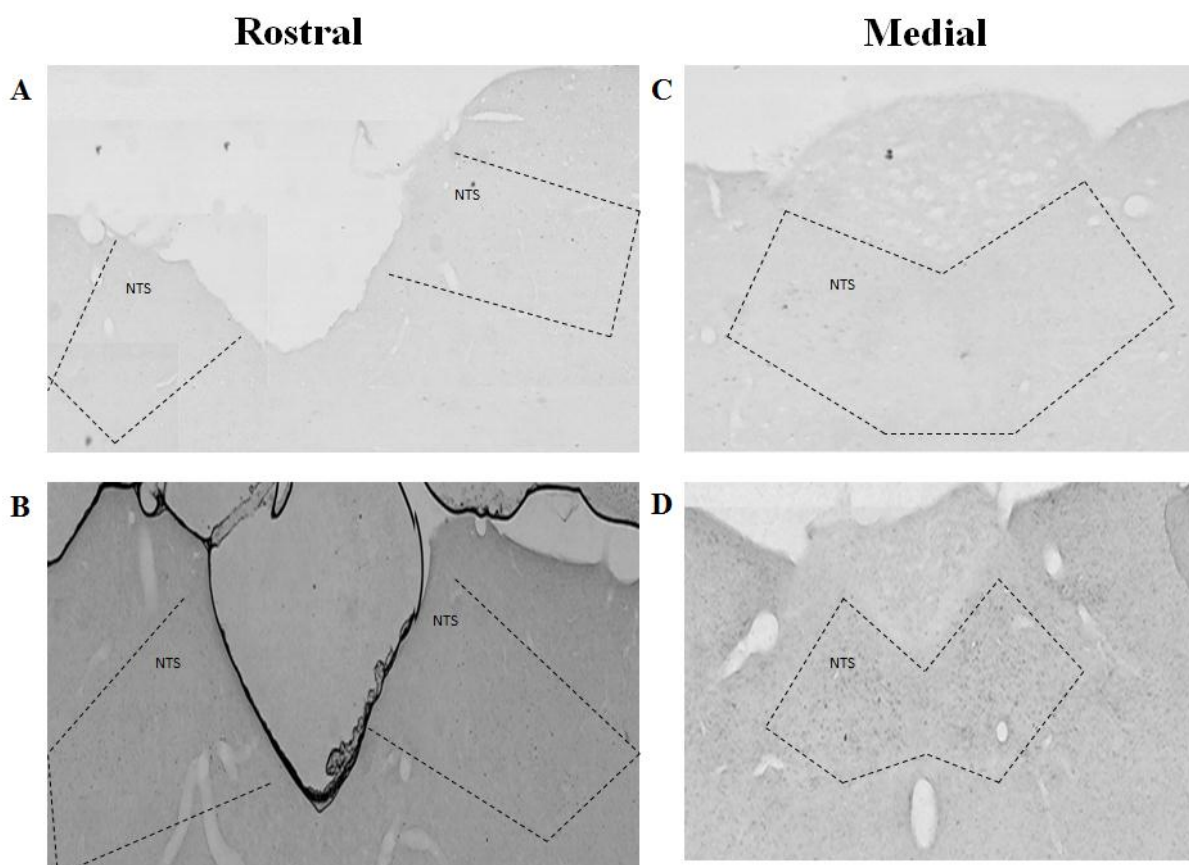


Figura 5- Fotomicrografias evidenciando células c-FOS positivas no NTS de animais de 35 dias submetidos à manipulação Farmacológica. (A) Salina-Porção rostral do NTS; (B) Fluoxetina-Porção rostral do NTS; (C) Salina-Porção medial do NTS; (D) Fluoxetina-Porção Medial do NTS. (NTS-núcleo do trato solitário).

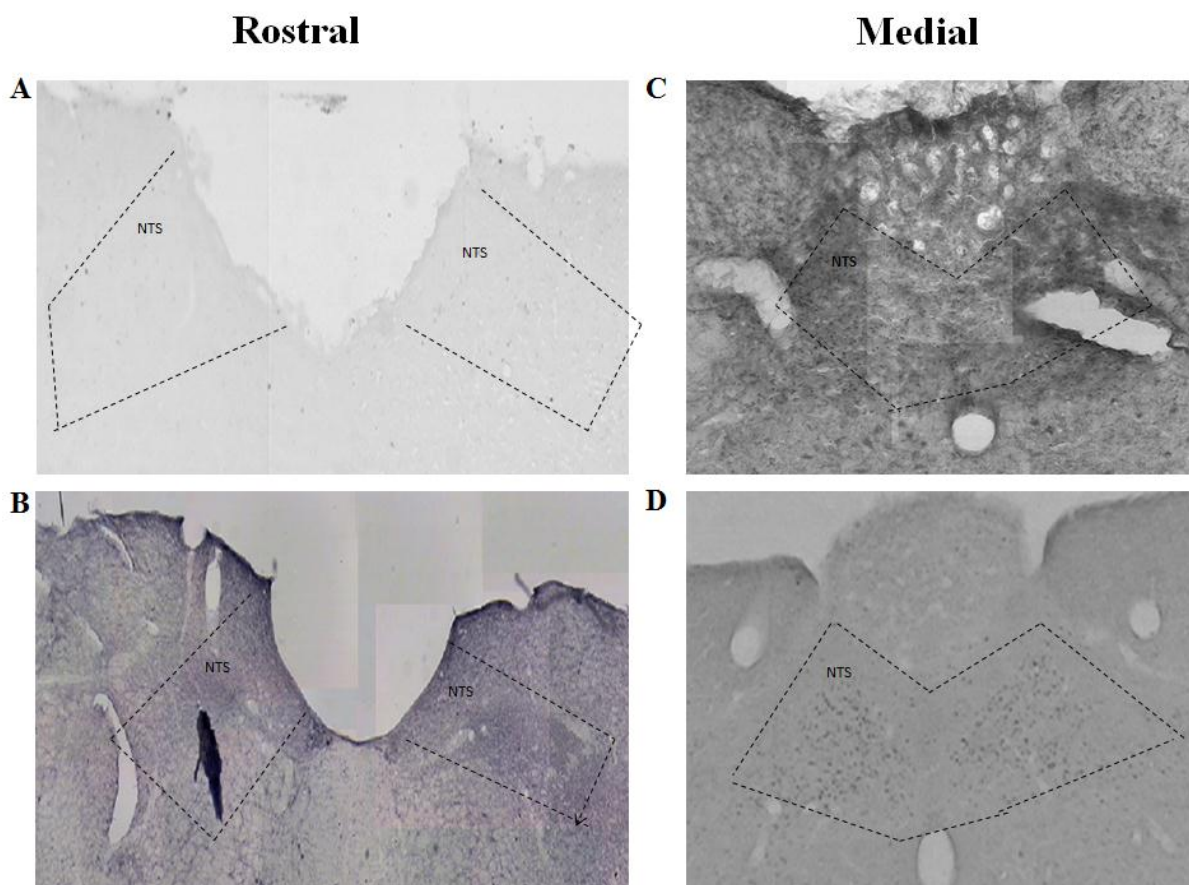


Figura 6- Fotomicrografias evidenciando células c-FOS positivas no NTS de animais de 180 dias submetidos à manipulação Farmacológica. (A) Salina-Porção rostral do NTS; (B) Fluoxetina-Porção rostral do NTS; (C) Salina-Porção medial do NTS; (D) Fluoxetina-Porção Medial do NTS. (NTS- núcleo do trato solitário).

4. DISCUSSÃO

Os resultados descritos neste estudo demonstram que a desnutrição perinatal e o tratamento neonatal com fluoxetina induzem reduções no peso corporal que podem persistir na vida adulta. Embora ambos promovam efeitos semelhantes sobre o peso corporal, essas manipulações durante os estágios iniciais do desenvolvimento exercem efeitos diferentes sobre o consumo alimentar e responsividade do núcleo do trato solitário ao estímulo alimentar. A desnutrição perinatal promove hiperfagia na vida adulta, não observada em animais tratados com ISRS. Além disso, a restrição proteica perinatal induz a maior ativação neuronal na porção rostral e medial do NTS em animais de 35 dias de idade, diferente do tratamento neonatal com ISRS que induz tal ativação apenas na porção rostral do NTS de animais com 180 dias de vida.

Relevantes investigações epidemiológicas e experimentais têm demonstrado que a manipulação nutricional e farmacológica com ISRSs durante o período de rápido desenvolvimento do sistema nervoso (HALES; BARKER, 1992; LANGLE-EVANS 2001) está associada a vários prejuízos no desenvolvimento sensorio motor (BARREITO-MEDEIROS; MENDES DA SILVA et al.,2001), crescimento somático (DE SOUZA; NOGUEIRA et al., 2004), no comportamento agressivo e locomotor (MANHÃES-DE-CASTRO et al.,2004). Além disto, está também relacionado a anormalidades na função cardiovascular (TOSCANO; AMORIM et al., 2008), redução do comportamento exploratório e nos níveis de expressão de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A/2C}, relacionados ao controle do comportamento alimentar (LOPES DESOUSA; OROZCO-SOLÍS et al., 2008; CABRERA E BATTAGLIA, 1994) . Alguns estudos mostram ainda que a desnutrição perinatal e o tratamento neonatal com ISRS são capazes de reduzir o peso corporal e consumo alimentar (JAQUET; LEGER et al., 1999; VICKERS; BREIER et al., 2000; DEIRÓ; MANHÃES-DE-CASTRO et al.,2004; REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011).

No presente estudo, a desnutrição proteica perinatal promoveu redução do peso corporal a partir do 7º dia de vida pós-natal até o 35º dia de idade, sendo normalizado na vida adulta. Estes resultados são corroborados com estudos que apontam que a exposição a dietas com baixo teor de proteínas durante a gestação conduz a consideráveis reduções no peso corporal sem necessariamente afetar o peso ao nascer, uma vez que neste período, podem ocorrer eventuais processos adaptativos que conduzem a redução do número de filhotes nascidos garantindo a preservação da prole (BIESWAL; AHN et al., 2006; LANGLEY-EVANS;SCULLY, 2006 COUPÉ; GRITT, et al., 2009). Além disto, a manutenção de dieta hipoproteica na lactação geralmente está associada à redução mais duradoura no peso corporal, fato observado em animais desnutridos de 35 dias de idade e que pode estar relacionado às deficiências proteicas impostas às mães durante esta fase (BARREITO-MEDEIROS; MENDES DA SILVA et al.,2001; PATEL; SRINIVASAN, 2011). O aporte inadequado de proteínas pode promover alterações na quantidade e qualidade do leite refletindo em prejuízos no crescimento corporal (BARREITO-MEDEIROS;MENDES DA SILVA et al.,2001;PATEL; SRINIVASAN, 2011). O restabelecimento do peso corporal observado em animais desnutrido de 180 dias pode está relacionado à hiperfagia apresentada por estes animais após o desmame. Este aumento da ingestão de alimentos ocorre como forma de compensar o déficit de nutrientes oriundos daqueles períodos críticos de desenvolvimento,

ocasionando um catch-up de crescimento e um acelerado ganho de peso, como observado por Desai e colaboradores (2005) e Coupé e colaboradores (2009).

Em relação ao consumo alimentar, a hiperfagia apresentada pelos animais desnutridos de 35 dias pode está associada ao fenômeno de cath-up descrito acima. A persistência deste estado hiperfágico aos 180 dias de vida nestes animais está relacionado às perturbações nos centros reguladores do comportamento alimentar (OROZCO-SOLÍS; LOPES DE SOUZA et al., 2009; OROZCO-SOLÍS; MATOS et al., 2010 REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Orozco- Sólis e colaboradores (2009) avaliando as diferenças intrínsecas no comportamento alimentar de animais normonutridos e desnutridos durante a gestação e lactação observaram que a hiperfagia decorrente da exposição precoce a dietas hipoproteicas está associada ao retardo na saciedade, diminuição na latência para comer e aumento do tamanho e duração das refeições. Alterações na expressão de peptídeos e neurotransmissores como proteína relacionada ao gene agouti (AgRP), Neuropeptídeo Y (NPY), pro-ópiomelanocortina (POMC), serotonina e colecistocinina (CCK) também vem sendo correlacionados a possíveis mecanismos que conduzem ao aumento da ingestão de alimento em animais desnutridos (BOURET; SIMERLY 2006; REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011).

Apesar de um relativo número de estudos destacarem a desnutrição perinatal como um importante agente programador do comportamento alimentar, capaz de induzir alterações em várias vias e estruturas centrais como o hipotálamo (BOURET; SIMERLY 2006; LOPES DE SOUZA; OROZCO-SOLÍS et al.; 2008; OROZCO-SOLÍS; LOPES DE SOUZA et al., 2009; OROZCO-SOLÍS; MATOS; ROZCO-SOLIS et al., 2010; REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011), ainda pouco se sabe sobre as suas implicações morfo-fisiológicas sobre o NTS.

Foi observado que a manipulação nutricional nos estágios iniciais do desenvolvimento induz maior ativação neuronal em resposta a estímulo alimentar na porção rostral e medial do NTS apenas em animais de 35 dias de idade. Este fato pode estar relacionado à hiperfagia apresentada pelos animais desnutridos nesta idade. Em condições normais, durante uma refeição, múltiplos sinais são gerados no interior da cavidade oral e do trato gastrointestinal e funcionam como importantes mediadores no controle do tamanho das refeições (BADMAN; FLIER, 2005; NASLUND; HELLSTROM, 2007; CHAUDHRI; SALEM et al., 2008).

Esses sinais originados, em sua maioria, a partir da estimulação gustatória, distensão gástrica ou pela presença de peptídeos e hormônios periféricos como a CCK, o GLP-1 e a leptina, são transmitidos até o NTS através das aferências vagais e outros nervos cranianos

como o glossofaríngeo, facial e trigêmeo onde ativam neurônios presentes nesta região (BERTHOUD; SUTTON, 2006; GRILL; HAYES, 2009; RINAMMAN, 2010). A ativação dos neurônios do NTS por estes estímulos conduz à redução do tamanho das refeições e consequentemente a inibição do consumo alimentar e promoção da saciedade (SCHWARTZ, 2006; GRILL, 2010).

Emond e colaboradores (2001), avaliando diferentes padrões de ativação neuronal no NTS em resposta a diferentes estímulos alimentares, observaram que a ativação deste núcleo está intimamente relacionada ao tamanho da refeição. Esses autores observaram que grandes refeições aumentam o número de células ativadas no NTS a fim de promover a saciedade. Assim é possível que o aumento visto no número de neurônios ativados no NTS de animais de 35 dias esteja associado ao aumento do consumo alimentar nessa idade. O NTS aumenta a sua ativação na tentativa de reduzir a ingestão de alimentos e conduzir a saciedade.

Por outro lado, aos 180 dias de vida, apesar da hiperfagia observada em desnutridos, a quantidade de neurônios ativados se manteve em níveis normais. Isto possivelmente está associado a alterações das vias envolvidas na promoção da saciedade durante os períodos de maturação deste núcleo. Estudos mostram que os neurônios do NTS se originam entre o 11º dia (G11) e 14º dias de gestação (G14), sendo o pico de neurogênese no G12. Entre o G17 e G19, rápidas mudanças ocorrem neste núcleo que se apresenta mais heterogêneo e dividido em subnúcleos discerníveis (LASITER; WONG et al., 1989; ZHANG; ASHWELL, 2001; DUFOUR; TELL et al., 2010).

Embora nessa fase de rápida diferenciação algumas sinapses possam surgir, um grande corpo de evidências mostra que intensa sinaptogênese, mudanças nos sistemas de neurotransmissão, maturação de neurônios e de funções autonômicas ainda ocorrem no NTS após o nascimento e podem perdurar por até seis semanas (MAY; ALEVERISIR, 2008; DUFOUR; TELL et al., 2010). Assim, este período de grande plasticidade representa a fase crítica onde o NTS se torna mais suscetível a influências ambientais que podem alterar os padrões de maturação de seus circuitos neuronais, inclusive os relacionados ao comportamento alimentar (DUFOUR; TELL et al., 2010).

Neste contexto, os níveis semelhantes de ativação de neurônios nos animais controle e desnutrido aos 180 dias estejam relacionados a mudanças adaptativas nos circuitos neuronais envolvidos no controle do comportamento alimentar, que se sobrepõem a função do NTS e diminuem a sua capacidade em promover a saciedade.

Em relação à manipulação farmacológica, observamos que o tratamento neonatal com fluoxetina promoveu redução do peso a partir do 7º dia de vida e persistiu durante todo

período de avaliação. Esta redução pode estar associada à atividade da serotonina sobre o comportamento alimentar. A maior disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica decorrente da utilização deste fármaco pode desencadear um efeito hipofágico considerável com conseqüentes comprometimentos do peso corporal (FULLER; SNODDY *et al.*, 1988; RATTRAY; WOTHERSPOON *et al.*, 1994; VICKERS; CLIFTON *et al.*, 1996; MANHÃES DE CASTRO; MANHÃES-DE-CASTRO, *et al.*, 2001). Alterações no sistema serotoninérgico decorrente do tratamento neonatal com ISRSs pode também conduzir a perda significativa de peso na vida adulta sem necessariamente afetar a ingestão alimentar, sugerindo que este neurotransmissor também esteja envolvido no controle do gasto energético (LAM; HEISLER, 2007; GARFIELD; HEISLER, 2009).

Embora estudos mostrem que o tratamento neonatal com ISRS exerça efeito anoréxico sobre o consumo alimentar na vida adulta (MENDEZ DA SILVA; LOPES DE SOUZA *et al.*, 2002), no presente trabalho esse efeito não foi observado em nenhuma das idades analisadas. Outros estudos também não observaram alteração na ingestão alimentar após o tratamento com ISRS. Essas diferenças podem estar associadas a diferentes doses utilizadas nestes estudos (AIGRAIN; KOREN, 2005).

Esses resultados encontrados no presente estudo podem estar relacionados aos níveis de ativação apresentados pelos neurônios do NTS em resposta a um estímulo alimentar. Neste caso, a administração neonatal com fluoxetina promoveu aumento no número de neurônios ativados apenas na porção rostral do NTS de animais de 180 dias. Como a administração neonatal com fluoxetina promove redução à expressão de receptores serotoninérgicos 5HT_{2A/2C} (HOMBERG; SCHUMBERT *et al.*, 2010), receptores envolvidos no controle do comportamento alimentar, é possível que para manter o consumo alimentar em níveis normais, seja necessário recrutar um número maior de neurônios no NTS para compensar essa redução da expressão de receptores serotoninérgicos e assim ser capaz de promover a saciedade.

Em resumo, os resultados do presente estudo sugerem que o NTS é uma estrutura particularmente vulnerável as influências da manipulação nutricional e farmacológica do sistema serotoninérgico nos estágios iniciais do desenvolvimento que podem modular aspectos do comportamento alimentar relacionados à saciedade. Embora esses resultados nos mostrem a potencial vulnerabilidade do NTS a influências ambientais nos estágios iniciais da vida, estudos ainda se fazem necessários para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahima, R. S. e S. M. Hileman. Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation. Regul Pept, v.92, n.1-3, Aug 25, p.1-7. 2000.
- Aigrain, J.E e G. Koren. Effects of drugs on the fetus. Semin Fetal Neonatal Med, v.10,n.2, pp.139-47. 2005.
- Badman, M. K. e J. S. Flier. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. Science, v.307, n.5717, Mar 25, p.1909-14. 2005.
- Barreto Medeiros, J. M. et al. Action of selective serotonin reuptake inhibitor on aggressive behavior in adult rat submitted to the neonatal malnutrition. Arq. Neuropsiquitr. v.59, n. 3A, p. 499-503, 2001
- Bellinger, L., C. Lilley, *et al.* Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. Br J Nutr, v.92, n.3, Sep, p.513-20. 2004.
- Berthoud, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. Neurosci Biobehav Rev, v.26, n.4, Jun, p.393-428. 2002.
- Berthoud HR. The caudal brainstem and the control of food intake and energy balance. In: Stricker E, Woods S. Handbook of behavioral neurobiology. 2nd ed. New York: Springer Science; 2004, 14(5): 195-240.
- Berthoud, H. R., G. M. Sutton, *et al.* Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. Physiol Behav, v.89, n.4, Nov 30, p.517-24. 2006.
- 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.
- Bouret, S. G. e R. B. Simerly. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. Clin Genet, v.70, n.4, Oct, p.295-301. 2006.
- Cabrera, T. M. e G. Battaglia. Delayed decreases in brain 5-hydroxytryptamine_{2A/2C} receptor density and function in male rat progeny following prenatal fluoxetine. J Pharmacol Exp Ther, v.269, n.2, May, p.637-45. 1994.
- Chaudhri, O. B., V. Salem, *et al.* Gastrointestinal satiety signals. Annu Rev Physiol, v.70, p.239-55. 2008.
- Coupe, B., I. Grit, *et al.* The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.297, n.3, Sep, p.R813-24. 2009.
- 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.

Deiró, T. C., R. Manhaes-de-Castro, *et al.* Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. Braz. J. Med. Res., v.37, n.19, pp.1503-09.2004.

Dufour, A., F. Tell, *et al.* Perinatal development of inhibitory synapses in the nucleus tractus solitarii of the rat. Eur J Neurosci, v.32, n.4, Aug, p.538-49.

Fuller, R.W, A.D Snoddy, *et al.* Mechanisms of effects of d-fenfluramine on brain serotonin metabolism in rats: uptake inhibition versus release. Pharmacology Biochem & Behavior, v.30, n.3, p.715-721, 1988.

Garfield A.S, L.K Heisler. Pharmacological targeting of the serotonergic system for the treatment of obesity. J Physiol, v. 587(Pt 1), pp. 49-60. 2009.

Gluckman, P. D., M. A. Hanson, *et al.* Developmental origins of health and disease: reducing the burden of chronic disease in the next generation. Genome Med, v.2, n.2, p.14.

Grill, H. J. Leptin and the systems neuroscience of meal size control. Front Neuroendocrinol, v.31, n.1, Jan, p.61-78.

Grill, H. J. Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. Obesity (Silver Spring), v.14 Suppl 5, Aug, p.216S-221S. 2006.

Grill, H. J. e M. R. Hayes. The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. Int J Obes (Lond), v.33 Suppl 1, Apr, p.S11-5. 2009.

Grill, H. J. e J. M. Kaplan. Interoceptive and integrative contributions of forebrain and brainstem to energy balance control. Int J Obes Relat Metab Disord, v.25 Suppl 5, Dec, p.S73-7. 2001.

Grove, K. L., R. S. Brogan, *et al.* Novel expression of neuropeptide Y (NPY) mRNA in hypothalamic regions during development: region-specific effects of maternal deprivation on NPY and Agouti-related protein mRNA. Endocrinology, v.142, n.11, Nov, p.4771-6. 2001.

Hales, C. N. e D. J. Barker. The thrifty phenotype hypothesis. Br Med Bull, v.60, p.5-20. 2001.

Homberg, J. R., D. Schubert, *et al.* New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. Trends Pharmacol Sci, v.31, n.2, Feb, p.60-5.

Jaquet, D., J. Leger, *et al.* High serum leptin concentrations during catch-up growth of children born with intrauterine growth retardation. J Clin Endocrinol Metab, v.84, n.6, Jun, p.1949-53. 1999.

Kenny, P. J. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. Nat Rev Neurosci, v.12, n.11, Nov, p.638-51.

Lam, D.D, L.K Heisler. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. Expert Reviews in Molecular Medicine, v.9,n.5, pp. 1-24. 2007.

Langley-Evans, S. C. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. Proc Nutr Soc, v.60, n.4, Nov, p.505-13. 2001.

Lasiter, P. S. e D. L. Kachele. Postnatal development of the parabrachial gustatory zone in rat: dendritic morphology and mitochondrial enzyme activity. Brain Res Bull, v.21, n.1, Jul, p.79-94. 1988.

Li, M., D. M. Sloboda, *et al.* Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. Exp Diabetes Res, v.2011, p.592408.

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

Magalhães, C.P, L.O. Lima. Efeitos do tratamento neonatal com inibidor seletivo de recaptura da 5-ht sobre o desenvolvimento anatômico crânio-encefálico. Arq Neuropsiquiatr, v.64, n.4,pp.990-993. 2006

Manhães de Castro, R., J.M Barreto Medeiros. Tratamento com inibidor de recaptura de serotonina no período neonatal, reduz agressividade intraespecífica em ratos adulto. Neurobiol, v.61, n.2,pp.61-69. 1998.

Matos, R. J., R. Orozco-Solis, *et al.* Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. Neuroscience, v.196, Nov 24, p.16-24.

May, O. L., A. Erisir, *et al.* Modifications of gustatory nerve synapses onto nucleus of the solitary tract neurons induced by dietary sodium-restriction during development. J Comp Neurol, v.508, n.4, Jun 1, p.529-41. 2008.

Mendes da silva,C., J.M. Barreto Medeiros *et al.* Tratamento neonatal com inibidor seletivo de receptação da serotonina: evolução nutricional e efeito tardio sobre a depressão experimental. Neurobiologia, v.63, n.3-4, pp. 75-79. 2000.

Morgane, P. J., D. J. Mokler, *et al.* Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. Neurosci Biobehav Rev, v.26, n.4, Jun, p.471-83. 2002.

Naslund, E. e P. M. Hellstrom. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. Physiol Behav, v.92, n.1-2, Sep 10, p.256-62. 2007.

Nowak, F. V. e A. C. Gore. Perinatal developmental changes in expression of the neuropeptide genes preoptic regulatory factor-1 and factor-2, neuropeptide Y and GnRH in rat hypothalamus. J Neuroendocrinol, v.11, n.12, Dec, p.951-8. 1999.

Ong, K. K., M. L. Ahmed, *et al.* Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. BMJ, v.320, n.7240, Apr 8, p.967-71. 2000.

Orozco-Solis, R., S. Lopes De Souza, *et al.* Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. Physiol Behav, v.96, n.3, Mar 2, p.481-92. 2009.

Patel, M. S. e M. Srinivasan. Metabolic programming in the immediate postnatal life. Ann Nutr Metab, v.58 Suppl 2, p.18-28.

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

Remmers, F. e H. A. Delemarre-Van De Waal. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. Endocr Rev, v.32, n.2, Apr, p.272-311.

Rinaman, L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. Brain Res, v.1350, Sep 2, p.18-34.

Sanchez-Lasheras, C., A. C. Konner, *et al.* Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. Front Neuroendocrinol, v.31, n.1, Jan, p.4-15.

Swithers, S. E. Do metabolic signals stimulate intake in rat pups? Physiol Behav, v.79, n.1, Jun, p.71-8. 2003.

Torrero, C., M. Regalado *et al.* Pattern of sucking movements during artificial feeding of neonatally undernourished rats. Nutrit Neurosci, v.3, pp.245-254.2000.

Toscano, A. E., M. A. Amorim, *et al.* Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? Life Sci, v.82, n.21-22, May 23, p.1131-6. 2008.

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.

Vickers, S.T, P.G. Clifton, *et al.* Behavioural evidence that d- fecluramine-induced anorexia in the rat is not mediated by the 5-HT1A receptor subtype. Pyscopharmacol, v. 125, p. 168-175, 1996

Vieau, D. Perinatal nutritional programming of health and metabolic adult disease. World J Diabetes, v.2, n.9, Sep 15, p.133-6.

Williams, G., C. Bing, *et al.* The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. Physiol Behav, v.74, n.4-5, Nov-Dec, p.683-701. 2001.

Zhang, L. L. e K. W. Ashwell. Development of the cyto- and chemoarchitectural organization of the rat nucleus of the solitary tract. Anat Embryol (Berl), v.203, n.4, Apr, p.265-82. 2001

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estes resultados indicam que o NTS é uma estrutura particularmente vulneráveis as influências da manipulação nutricional e farmacológica do sistema serotoninérgico nos estágios iniciais do desenvolvimento, e pode ser alvo de processos adaptativos do controle do balanço energético observados nesses animais na vida adulta.

8. REFERÊNCIAS

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

BARKER, D. J. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. Nutrition, v.13, n.9, Sep, p.807-13. 1997.

BELIK, J. Fetal and neonatal effects of maternal drug treatment for depression. Semin Perinatol, v.32, n.5, Oct, p.350-4. 2008.

BELLINGER, L., C. LILLEY, *et al.* Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. Br J Nutr, v.92, n.3, Sep, p.513-20. 2004.

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.

BERRIDGE, K. C. E. H. J. GRILL. Alternating ingestive and aversive consummatory responses suggest a two-dimensional analysis of palatability in rats. Behav Neurosci, v.97, n.4, Aug, p.563-73. 1983.

BERTHOUD, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. Neurosci Biobehav Rev, v.26, n.4, Jun, p.393-428. 2002.

BERTHOUD HR. The caudal brainstem and the control of food intake and energy balance. In: Stricker E, Woods S. Handbook of behavioral neurobiology. 2nd ed. New York: Springer Science; 2004, 14(5): 195-240.

BINGHAM, N. C., K. K. ANDERSON, *et al.* Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. Endocrinology, v.149, n.5, May, p.2138-48. 2008.

DATTA, S., E. H. PATTERSON, *et al.* Prenatal protein malnourished rats show changes in sleep/wake behavior as adults. J Sleep Res, v.9, n.1, Mar, p.71-9. 2000.

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

DEIRÓ, T. C., R. MANHAES-DE-CASTRO, *et al.* Neonatal treatment with citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor, alters the growth of organs in rats. An.Fac.Med. Univ. Fed. Pernamb, v.47, n.2, pp.107-11. 2002

DEIRÓ, T. C., R. MANHAES-DE-CASTRO, *et al.* Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. Braz. J. Med. Res, v.37, n.19, pp.1503-09.2004.

DEIRÓ, T. C., R. MANHAES-DE-CASTRO, *et al.* Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. Physiol Behav, v.87, n.2, Feb 28, p.338-44. 2006.

DEL ANGEL-MEZA, A. R., L. RAMIREZ-CORTES, *et al.* A tryptophan-deficient corn-based diet induces plastic responses in cerebellar cortex cells of rat offspring. Int J Dev Neurosci, v.19, n.4, Jul, p.447-53. 2001.

DELAHAYE, F., C. BRETON, *et al.* Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. Endocrinology, v.149, n.2, Feb, p.470-5. 2008.

DEL-BEL, E. A., R. TITZE-DE-ALMEIDA, *et al.* Induction of the c-fos proto-oncogene in the rat pineal gland during stress. Braz J Med Biol Res, v.26, n.9, Sep, p.975-81. 1993.

DIROCCO, R. J. E. H. J. GRILL. The forebrain is not essential for sympathoadrenal hyperglycemic response to glucoprivation. Science, v.204, n.4397, Jun 8, p.1112-4. 1979.

DOBBING, J. The Influence of Early Nutrition on the Development and Myelination of the Brain. Proc R Soc Lond B Biol Sci, v.159, Feb 18, p.503-9. 1964.

ELLACOTT, K. L., I. G. HALATCHEV, *et al.* Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem. Endocrinology, v.147, n.7, Jul, p.3190-5. 2006.

GLUCKMAN, P. D. E. M. A. HANSON. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. Pediatr Res, v.56, n.3, Sep, p.311-7. 2004.

GLUCKMAN, P. D., M. A. HANSON, *et al.* Predictive adaptive responses and human evolution. Trends Ecol Evol, v.20, n.10, Oct, p.527-33. 2005.

GONZALEZ, E. M., L. A. PENEDO, *et al.* Neonatal tryptophan dietary restriction alters development of retinotectal projections in rats. Exp Neurol, v.211, n.2, Jun, p.441-8. 2008.

GRILL, H. J. Leptin and the systems neuroscience of meal size control. Front Neuroendocrinol, v.31, n.1, Jan, p.61-78.

GRILL, H. J. Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. Obesity (Silver Spring), v.14 Suppl 5, Aug, p.216S-221S. 2006.

GRILL, H. J. E. M. R. HAYES. The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. Int J Obes (Lond), v.33 Suppl 1, Apr, p.S11-5. 2009.

GRILL, H. J. E. J. M. KAPLAN. Interoceptive and integrative contributions of forebrain and brainstem to energy balance control. Int J Obes Relat Metab Disord, v.25 Suppl 5, Dec, p.S73-7. 2001.

GRILL, H. J. E. R. NORGREN. Chronically decerebrate rats demonstrate satiation but not bait shyness. Science, v.201, n.4352, Jul 21, p.267-9. 1978.

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

HALES, C. N. E D. J. BARKER. The thrifty phenotype hypothesis. Br Med Bull, v.60, p.5-20. 2001.

HAYES, M. R., K. P. SKIBICKA, *et al.* Endogenous leptin signaling in the caudal nucleus tractus solitarius and area postrema is required for energy balance regulation. Cell Metab, v.11, n.1, Jan, p.77-83.

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

HOFFMAN, G. E., M. S. SMITH, *et al.* c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. Front Neuroendocrinol, v.14, n.3, Jul, p.173-213. 1993.

HOMBERG, J. R., D. SCHUBERT, *et al.* New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. Trends Pharmacol Sci, v.31, n.2, Feb, p.60-5.

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

JOUSSE, C., L. PARRY, *et al.* Perinatal undernutrition affects the methylation and expression of the leptin gene in adults: implication for the understanding of metabolic syndrome. FASEB J, v.25, n.9, Sep, p.3271-8.

LANGLEY-EVANS, S. C. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. Proc Nutr Soc, v.60, n.4, Nov, p.505-13. 2001.

LANGLEY-EVANS, S. C. E D. V. SCULLEY. The association between birthweight and longevity in the rat is complex and modulated by maternal protein intake during fetal life. FEBS Lett, v.580, n.17, Jul 24, p.4150-3. 2006.

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.

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

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., 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.

- MATOS, R. J., R. OROZCO-SOLIS, *et al.* Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. Neuroscience, v.196, Nov 24, p.16-24.2011
- MENDES DA SILVA,C., J.M. BARRETO MEDEIROS *et al.* Tratamento neonatal com inibidor seletivo de receptação da serotonina: evolução nutricional e efeito tardio sobre a depressão experimental. Neurobiologia, v.63, n.3-4, pp. 75-79. 2000.
- MENDES DA SILVA, C.; L. GONÇALVES, *et al.* Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. Neurosc Letters, v.483, p.179–183, 2010.
- MORGANE, P.J.; M., MILLER,;. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. Neuroscience and Behavioral Reviews, v.2, pp. 137-230. 1978.
- MORGAN, J. I. E T. CURRAN. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. Trends Neurosci, v.12, n.11, Nov, p.459-62. 1989.
- 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.
- MORGANE, P. J., D. J. MOKLER, *et al.* Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. Neurosci Biobehav Rev, v.26, n.4, Jun, p.471-83. 2002.
- OROZCO-SOLIS, R., S. LOPES DE SOUZA, *et al.* Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. Physiol Behav, v.96, n.3, Mar 2, p.481-92. 2009.
- OZANNE, S. E. E C. N. HALES. Pre- and early postnatal nongenetic determinants of type 2 diabetes. Expert Rev Mol Med, v.4, n.24, Dec, p.1-14. 2002.
- PAXINOS, G.; WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney:Academic Press, 2005.
- PRADO, P.T.C E E.A. DEL BEL. C-fos, um gene de ativação imediata como marcador neural da nocicepção. Medicina, v.31, pp. 424-33.1998.
- REMMERS, F. E H. A. DELEMARRE-VAN DE WAAL. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. Endocr Rev, v.32, n.2, Apr, p.272-311.
- SANCHEZ, S., C. SANCHEZ, *et al.* Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of rats. Mol Cell Biochem, v.317, n.1-2, Oct, p.105-11. 2008.
- SANCHEZ-LASHERAS, C., A. C. KONNER, *et al.* Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. Front Neuroendocrinol, v.31, n.1, Jan, p.4-15.
- SCHWARTZ, G. J. Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v.361, n.1471, Jul 29, p.1275-80. 2006.

SIMMONS, R. A. Developmental origins of adult disease. Pediatr Clin North Am, v.56, n.3, Jun, p.449-66, Table of Contents. 2009.

SIMPSON, K. L., K. J. WEAVER, *et al.* Perinatal antidepressant exposure alters cortical network function in rodents. Proc Natl Acad Sci U S A, v.108, n.45, Nov 8, p.18465-70.

SMART, J. L. Under nutrition during early life and its effects on animal development and behaviour. Neuropharmacology, v.20, n.12B, Dec, p.1251-2. 1981.

TATLI, M., A. GUZEL, *et al.* Comparison of the effects of maternal protein malnutrition and intrauterine growth restriction on redox state of central nervous system in offspring rats. Brain Res, v.1156, Jul 2, p.21-30. 2007.

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

VICKERS, M. H. Developmental programming of the metabolic syndrome - critical windows for intervention. World J Diabetes, v.2, n.9, Sep 15, p.137-48.

VIEAU, D. Perinatal nutritional programming of health and metabolic adult disease. World J Diabetes, v.2, n.9, Sep 15, p.133-6.

YAMAMOTO, T. Neural substrates for the processing of cognitive and affective aspects of taste in the brain. Arch Histol Cytol, v.69, n.4, Dec, p.243-55. 2006.

ZHENG, H., N. R. LENARD, *et al.* Appetite control and energy balance regulation in the modern world: reward-driven brain overrides repletion signals. Int J Obes (Lond), v.33 Suppl 2, Jun, p.S8-13. 2009.

9. ANEXO

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 220/09

Recife, 11 de novembro de 2009.

Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE

Para: **Prof.: Sandra Lopes de Souza**

Departamento: Anatomia / UFPE

Processo nº 23076.024837/2009-11

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEAA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado: **"PROGRAMAÇÃO DO SISTEMA DE RECOMPENSA ALIMENTAR: UM ENFOQUE SOBRE O SISTEMA SEROTONINÉRGICO"**

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 CEEAA-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,

Observação: Aluno de pós-graduação: Amanda Alves Marcelino da Silva; Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição/UFPE; Animais: Ratos, linhagem: Wistar; Sexo: Machos e fêmeas; Idade: Adultos e filhotes; Nº de Animais previsto no projeto: 60 animais ..


 Prof. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEAA

