



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



Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE
Fone: (81)21268463, Fax: (81)21268473
<http://www.posnutri.ufpe.br>, posnutri@propesq.ufpe.br

**PODEM A ONTOGÊNESE DE REFLEXOS E O CONSUMO
ALIMENTAR SER ALTERADOS DE MODO SEXO-
DEPENDENTE POR INIBIÇÃO NEONATAL DA
RECAPTAÇÃO SEROTONINÉRGICA? Um estudo
experimental da plasticidade fenotípica.**

Raquel de Medeiros Maia Campos

**Recife-PE
2015**

RAQUEL DE MEDEIROS MAIA CAMPOS

**PODEM A ONTOGÊNESE DE REFLEXOS E O
CONSUMO ALIMENTAR SER ALTERADOS DE MODO
SEXO-DEPENDENTE POR INIBIÇÃO NEONATAL DA
RECAPTAÇÃO SEROTONINÉRGICA? Um estudo
experimental da plasticidade fenotípica.**

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

Orientador: Profº Drº Raul Manhães de Castro
Co-Orientadora: Profª Drª Ana Elisa Toscano
Departamento de Nutrição
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE-PE

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C198p Campos, Raquel de Medeiros Maia.
Podem a ontogênese de reflexos e o consumo alimentar ser alterados de modo sexo-dependente por inibição neonatal da recaptação serotoninérgica? Um estudo experimental da plasticidade fenotípica / Raquel de Medeiros Maia Campos. – Recife: O autor, 2015.
87 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Raul Manhães de Castro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Serotonina. 2. Fluoxetina. 3. Plasticidade neuronal. 4. Reflexo. 5. Comportamento alimentar. I. Castro, Raul Manhães de (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-134)

RAQUEL DE MEDEIROS MAIA CAMPOS

**PODEM A ONTOGÊNESE DE REFLEXOS E O
CONSUMO ALIMENTAR SER ALTERADOS DE MODO
SEXO-DEPENDENTE POR INIBIÇÃO NEONATAL DA
RECAPTAÇÃO SEROTONINÉRGICA? Um estudo
experimental da plasticidade fenotípica.**

Dissertação aprovada em: 02/03/2015

Prof. Dra. Ana Elisa Toscano

Prof Dr. José Eulálio Cabral Filho

Prof. Dra. Lígia Cristina Monteiro Galindo

É com muito amor e carinho que dedico este mestrado, assim como todas as conquistas em minha vida, aos meus pais, **Rubem e Marilda**, que desde sempre souberam passar a importância dos estudos, me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los, e por sempre apoiarem minhas escolhas e decisões. Amo muito e tenho muito orgulho de vocês!

Ao meu noivo, **Ygor**, companheiro de todas as horas, fonte de inspiração e amor para tudo que me proponho a realizar. Te amo muito!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo, pela vida, pela proteção, por guiar o meu caminho, colocando nele pessoas maravilhosas, me dando força e coragem para os desafios.

Agradeço aos meus pais por serem minha referência como pessoa e de vida. À minha amada mãe, minha querida, Marilda, simplesmente por existir, por me mostrar o melhor caminho sempre, e que é preciso ter fé, e confiar em Deus. Ao meu pai, Rubem, por todos os ensinamentos, pelo apoio em todas as horas, meu exemplo para a vida toda. Às minhas irmãs, Rúbia e Rafa, meus avós (in memória), tios e primos queridos, Aucilene, Lulu e toda minha família maravilhosa, Medeiros e Campos, por sempre me incentivarem, vibrarem a cada conquista e torcerem por mim! Obrigada pelos melhores momentos de felicidade em família! Amo vocês.

Ao meu noivo, Ygor, que se faz presente em cada minuto da minha vida, minha felicidade diária, meu melhor momento, inspiração de força e dedicação, obrigada por todo amor que me transforma no melhor que eu posso ser.

Aos meus sogros, tio Omar, tia Nora e dona Iolanda, pela amizade, incentivo e carinho todo especial, por ser minha segunda família ao longo desses anos.

Ao meu orientador, professor Raul Manhães, pessoa muito especial que eu aprendi a admirar, obrigada pela confiança, por toda a paciência, cuidado, conselhos, broncas, reflexões, pelos valiosos ensinamentos e por me guiar em cada etapa deste trabalho, indicando sempre o melhor caminho e os melhores professores que poderiam me auxiliar. À você a minha enorme gratidão e carinho!

A professora Ana Elisa, pela orientação imprescindível. Obrigada por ter sido uma co-orientadora tão maravilhosa, por estar sempre disponível a me ajudar na construção da dissertação, pela enorme paciência, dedicação e trabalho despendido, pela orientação no planejamento e realização de cada etapa da pesquisa. Muito obrigada por tudo!

Ao Professor Eulalio e a Lúcia Pires pela grande contribuição nas orientações estatísticas.

A Tâmara Kelly, por ter me acolhido e me introduzido na pesquisa em Bases Experimentais, por todo conhecimento e experiência que me foi passada. Você foi muito importante nesse processo, agradeço demais!

As estagiárias mais eficientes e comprometidas, Bárbara, Laryssa e Ana Paula, que me ajudaram durante todo o experimento e o cuidado com os animais, e Carol que me ajudou nos momentos iniciais. Obrigada pela disponibilidade e trabalho, meninas!

Ao veterinário, Sr. França, por toda disponibilidade, gentileza e orientações com o manejo dos animais no biotério e as reflexões para toda a vida. Também agradeço aos funcionários Cláudio e Vagner, sempre solícitos em ajudar no que fosse preciso.

Aos colegas da pós graduação e do biotério: Tássia, Madge, Mária Claudia, Antônio, Adriano, Renata, Gisélia, Raquel, Isabeli, Lígia e Sueli, que me ajudaram e me orientaram em vários momentos.

Aos colegas da turma de mestrado, e em especial as amigas de bases experimentais Amanda, Jéssica, Lanni, Elian e Cynthia, que acompanharam e compartilharam junto comigo as alegrias e aflições das disciplinas e a convivência nesses dois anos.

A todos os meus amigos que se preocupavam comigo, com minha nova vida em Recife e com “meus ratinhos”. Em especial a Célia Regina que me incentivou a fazer o mestrado em Bases Experimentais, e me apoiando durante todo o curso.

Aos colegas do grupo de caronas, que tornou minhas idas a Natal muito mais fáceis e prazerosas, em especial as amigas Gláucia e Giuliane, que tornaram a rotina em Recife muito mais feliz. E as amigas, Clara e Alexciane, obrigada pela convivência tranquila e solidária.

Aos professores da Pós graduação em Nutrição pelos ensinamentos.

Aos professores Eulálio Cabral, Tereza Deiró e Sandra Lopes pela disposição e atenção na avaliação do trabalho.

A Secretaria da pós-graduação em nutrição, Neci, Cecília e professora Elisabeth, muito obrigada pelas orientações, incentivo e auxílio durante esses dois anos.

“O Senhor é o meu pastor, nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas. Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome. Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam. Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias.”
(Salmo 23:1-6)

RESUMO

A serotonina (5HT) atua como um neuromodulador amplamente distribuído no sistema nervoso central e desempenha função essencial na regulação do desenvolvimento do encéfalo. Alterações na sinalização de 5-HT através da exposição a inibidores da recaptação de serotonina durante a fase perinatal têm o potencial de afetar o desenvolvimento neural e podem resultar em alterações comportamentais na vida adulta. Mais investigações são necessárias de forma a incluir ambos os sexos no estudo desses efeitos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar as repercussões do tratamento neonatal com fluoxetina, sobre a ontogênese de reflexos, desenvolvimento somático e o consumo alimentar em ratos machos e fêmeas. Foram utilizados quatro grupos experimentais segundo o gênero (macho ou fêmea) e tratamento (fluoxetina ou salina): Machos Salina (MS, n=16); Machos Fluoxetina (MF, n=18); Fêmeas Salina (FS, n=19) e Fêmeas Fluoxetina (FF, n=18). Os animais do grupo fluoxetina receberam fluoxetina na dose de 1µl/g do 1º ao 21º dia pós-natal e os animais que fizeram parte do grupo salina solução salina a 0,9%, 1µl/g. Foram registrados no período neonatal (1 a 21 dias): a ontogênese reflexa, o desenvolvimento somático, as características físicas e a consumo alimentar durante a lactação, bem como no período pós natal (22 - 31 dias): o peso corporal e consumo alimentar pós-desmame. Apesar da administração crônica de fluoxetina no período neonatal não ocasionar alterações no consumo alimentar, causa retardo na ontogênese reflexa, menor ganho de peso e desenvolvimento somático mais marcante no sexo masculino. Esses achados sugerem uma resposta sexo-específica relativa à manipulação do sistema serotoninérgico. Essas alterações confirmam que a serotonina desempenha um papel importante na plasticidade durante o período de desenvolvimento do sistema nervoso, de forma diferente entre machos e fêmeas.

Palavras chave: Serotonina. Fluoxetina. Plasticidade Neuronal. Reflexo. Comportamento alimentar.

ABSTRACT

Serotonin (5HT) acts as a neuromodulator widely distributed in the central nervous system and plays a critical role in the regulation of brain development. Changes in 5-HT signaling by serotonin reuptake inhibitors exposure during the perinatal period can affect neural development and may result in behavioral changes in adulthood. Further investigations are necessary including both sexes to study these effects. Thus, the aim of this study was to investigate the impact of neonatal treatment with fluoxetine on the ontogeny of reflexes, somatic development and food intake in male and female rats. The animals were formed by four groups according to gender (male or female) and treatment (fluoxetine or saline). Animals in the fluoxetine group received fluoxetine at 1µl/g on 1^o to 21 postnatal day and the animals that were part of the saline group received saline 0.9%, 10 ml / kg. In the neonatal period (1-21 days) were recorded: reflex ontogeny, somatic development, physical characteristics and food intake during lactation. In the postnatal period (22-31 days) were recorded: body weight and post-weaning food intake. Despite the chronic administration of fluoxetine in the neonatal period did not cause changes in food intake, it causes delay in the reflex ontogeny, lower weight gain and somatic development and most striking in males. In summary, these findings suggest a sex-specific response on the manipulation of the serotonergic system. These changes confirm that serotonin plays an important role in regulating the plasticity of the nervous system during development period, differently from males and females.

Keywords: Serotonin. Fluoxetine. Neuronal Plasticity. Feeding Behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Figura esquemática da neurotransmissão serotoninérgica.	20
Figura 2	Processos epigenéticos.	27
Figura 3	Mecanismo de ação dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina.	33
Figura 4	Efeitos a longo prazo do aumento dos níveis serotoninérgicos durante o desenvolvimento.	34
Figura 5	Formação dos grupos experimentais.	38
Figura 6	Procedimento para avaliação de reflexos (parte 1).	41
Figura 7	Procedimento para avaliação de reflexos (parte 2).	42
Figura 8	Procedimento para avaliação de reflexos (parte 3).	43
Figura 9	Procedimentos para avaliação das medidas de crescimento somático.	45
Figura 10	Procedimentos para avaliação da maturação das características físicas.	47
 Artigo		
Figura 1	Medidas de desenvolvimento somático durante a lactação	71
Figura 2	Peso corporal durante a lactação e Peso corporal pós-desmame.	73
Figura 3	Consumo alimentar durante a lactação.	74
Figura 4	Consumo alimentar pós-desmame.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Desenvolvimento da ontogênese de reflexos	24
Artigo		
Tabela 1	Descrição dos testes de reflexos	66
Tabela 2	Dia do aparecimento do reflexo durante o período neonatal	70
Tabela 3	Dia da maturação das características físicas durante o período neonatal	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA	5-hidroxiindolacetaldeído	E12	décimo segundo dia gestacional
5-HT	Serotonina	E19	décimo nono dia gestacional
5-HTP	5-hidroxitriptofano	GAP-43	Proteína Associada à Crescimento 43
AADC	ácido-amino-aromático descarboxilase		Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
AgRP	proteína derivada do gene agouti	ISRS	
AHL	Área hipotalâmica lateral	ir-SERT	Imunoreatividade da proteína transportadora de serotonina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico	S-100β	Fator trófico secretado por astrócitos
a-MSH	hormônio estimulador de melanócito alfa	LPS	Lipopolissacarídeo
APF	Área hipotalâmica perifornical	MAO	enzima monoamina oxidase
ARC	Núcleo arqueado	MAPS	proteínas associadas à microtubulos
BHE	Barreira hematoencefálica	MBD	proteínas metil-CpG
CART	transcrito regulado por anfetamina e cocaína	MC4R	Receptor 4 de melanocortina
CB1	receptor canabinoide 1	MeCP2	proteína methyl-CpG binding 2
DMN	Núcleo dorsomedial	POMC	pró-piomelanocortina
DNA	ácido desoxirribonucleico	PVN	Núcleo paraventricular
DNMTs	DNA metiltransferases	SERT	Proteína transportadora de serotonina
		SNC	Sistema Nervoso central
		VMN	Núcleo ventromedial

Grupos experimentais

MS	Machos Salina
MF	Machos Fluoxetina
FS	Fêmeas Salina
FF	Fêmeas Fluoxetina

Crescimento somático

ELLC	Eixo latero-lateral do crânio
EAPC	Eixo antero-posterior do crânio
EL	Eixo Longitudinal
CC	Comprimento da cauda

Características físicas

ACA	Abertura do conduto auditivo
APA	Abertura do pavilhão auditivo
AO	Abertura dos olhos
EIS	Erupção dos dentes incisivos superiores
EII	Erupção dos dentes incisivos inferiores

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 <i>Desenvolvimento do Sistema Nervoso e Plasticidade</i>	16
2.3 <i>Serotonina</i>	17
2.4 <i>Serotonina e desenvolvimento do Sistema Nervoso</i>	21
2.6 <i>Serotonina e ontogênese de reflexos</i>	22
2.8 <i>Serotonina e diferenças sexo-específicas no desenvolvimento do desenvolvimento do sistema nervoso</i>	27
2.7 <i>Sistema serotoninérgico e Comportamento Alimentar</i>	31
2.5 <i>Inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS)</i>	33
3. HIPÓTESE	35
4. OBJETIVOS	35
4.1 <i>Objetivo geral</i>	35
4.2 <i>Objetivos específicos</i>	35
5. MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1 <i>Animais</i>	36
5.2 <i>Tratamento</i>	36
5.3 <i>Via de Manipulação</i>	37
5.4 <i>Grupos Experimentais</i>	37
5.5 <i>Procedimentos Experimentais</i>	38
5.5.1 <i>Avaliação da ontogênese dos reflexos</i>	38
5.5.2 <i>Avaliações do crescimento somático</i>	43
5.5.3 <i>Avaliação das características físicas</i>	46
5.5.4 <i>Peso corporal e consumo alimentar</i>	48
5.6 <i>Análises estatísticas</i>	49
6. RESULTADOS	49
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	50
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE - Artigo original	61
ANEXOS	86

1. APRESENTAÇÃO

A maturação e desenvolvimento do sistema nervoso central estão sujeitos às diretrizes genéticas e a complexidade e grau de estimulação ambiental, incluindo a nutrição adequada como principais fatores determinantes (MORGANE *et al.*, 2002). Devido à plasticidade fenotípica, um genótipo pode dar origem a uma gama de diferentes estados fisiológicos ou morfológicos em resposta a diferentes condições ambientais durante o desenvolvimento do sistema nervoso (WEST-EBERHARD, 1989). A vulnerabilidade desse sistema depende da ação de um agente ou seu metabólito ativo e do período de exposição que estão sujeitos aos eventos celulares de proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose. Nos roedores, há maior desenvolvimento da diferenciação e mielinização no período pós-natal, portanto, o período de aleitamento pode ser considerado um período crítico de desenvolvimento nesses animais (RICE e BARONE, 2000).

Estudos que utilizam agentes agressores são utilizados para a compreensão dos efeitos causados por insultos ocorridos durante as fases de crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso (MORGANE *et al.*, 1993). Desta forma, estudos recentes têm demonstrado que manipulações farmacológicas dos sistemas de neurotransmissores podem induzir alterações drásticas de características funcionais e morfológicas no sistema nervoso durante períodos de vulnerabilidade (SILVA *et al.*, 2010; DENNIS, FAHEY e CHENG, 2013; BERG *et al.*, 2013; RENTESI *et al.*, 2013).

Evidências experimentais indicam que neurotransmissores são utilizados como sinais de desenvolvimento, que modulam a construção e plasticidade dos circuitos neurais (LIPTON e KARTER, 1989). A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT), por exemplo, foi o primeiro neurotransmissor a demonstrar esse papel e os neurônios serotoninérgicos estão entre os primeiros a serem formados. A 5-HT pode modular eventos do desenvolvimento, incluindo a divisão celular, migração neuronal, diferenciação das células e sinaptogênese, através de uma grande variedade de receptores com ações limitadas e diferenciadas durante períodos específicos do desenvolvimento (GASPAR *et al.*, 2003; AZMITIA, 2001). Nesse contexto, a modulação do sistema serotoninérgico através do aumento da disponibilidade de serotonina na fenda sináptica causada pela manipulação farmacológica dos inibidores

seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs) tem sido bastante estudada.

Existem várias maneiras de avaliar os efeitos desses fármacos, como por exemplo, através da avaliação da ontogênese de reflexos, que são respostas motoras estereotipadas do sistema nervoso central em meio a estímulos internos ou externos (ZEHR E STEIN, 1999), considerados indicadores do desenvolvimento do sistema nervoso, pois caracterizam a ocorrência simultânea de vários eventos do desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), obedecendo a uma sequência predeterminada de acordo com a idade dos animais (FOX, 1965; SMART e DOBBING, 1971).

O sistema serotoninérgico tem um papel modulador essencial no desenvolvimento de reflexos devido a sua anatomia na função sensório-motora, pois no neocórtex sensorial primário há hiperinervação dos neurônios serotoninérgicos, assim como em nível de neurônios α -motores (DOLY et al. , 2004). Assim, o sistema serotoninérgico pode controlar o comportamento através do estímulo pelo córtex sensorial e da resposta pelos neurônios α -motores. O comportamento alimentar também pode ser alterado devido influência da serotonina, que difusamente inerva os centros de reflexo do tronco encefálico e os centros integrados do hipotálamo envolvidos no controle da ingestão alimentar (LAM *et al.*, 2010).

Nesse contexto, estudos experimentais têm mostrado que o aumento da disponibilidade da serotonina na fenda sináptica devido ao tratamento com ISRS em ratos machos causa retardo na ontogênese de reflexos e no crescimento somático (SOUZA *et al.*, 2004; DEIRÓ *et al.*, 2006; DEIRÓ *et al.*, 2008), além de reduzir a ingestão de alimentos e o peso corporal em ratos (DEIRÓ *et al.*, 2008; HEAL *et al.*, 2008; FOX *et al.*, 2010; SINGH e SINGH , 2013; LAUZURICA *et al.*, 2013).

Além disso, a manipulação deste sistema durante as fases iniciais do neurodesenvolvimento pode resultar em diferentes modificações neurocomportamentais entre os gêneros e que persistem na idade adulta (CSABA et al, 2003;. HOHMANN et al, 2007;. UÇEYLER et al., 2010). Em animais, há evidências convergentes que os machos tem comportamento mais vulnerável ao estresse do que as fêmeas no início da vida (SANDMAN et al., 2013; GOEL e BALE, 2009; WELLS, 2000), enquanto que as fêmeas são mais suscetíveis ao estresse após a puberdade (DALLA et al., 2010).

Assim, existe a possibilidade de que o uso de agentes serotoninérgicos na fase inicial da vida possa ter efeitos sobre a ontogênese de reflexos, desenvolvimento somático e o consumo alimentar. Porém não há estudos que comparem as variações

desses efeitos entre ratos machos e fêmeas. Diante desse contexto, é de particular interesse, compreender os efeitos da modulação do sistema serotoninérgico através do uso de um ISRS durante a lactação, considerando as diferenças dessas variáveis entre ratos machos e fêmeas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Desenvolvimento do Sistema Nervoso e Plasticidade

A maturação encefálica abrange uma série de estágios sobrepostos temporalmente que seguem uma seqüência precisa, diferente para cada região encefálica, variando temporalmente de uma espécie animal para outra (MORGANE *et al.*, 2002). O conceito relativo ao impacto do agravo precoce ao cérebro está baseado na concepção de que há períodos do desenvolvimento durante os quais o organismo é particularmente vulnerável e que representam uma única janela de desenvolvimento, que não pode ser revertida ou repetida em um período posterior. (MORGANE *et al.*, 2002).

A capacidade de mudar é uma característica fundamental do sistema nervoso. A mudança estrutural do cérebro como resultado de insultos ambientais é referida como plasticidade fenotípica (KOLB e GIBB, 2011). O crescimento axonal, a morfologia dendritica, a apoptose, e a neurogênese são os mecanismos para a plasticidade do tamanho da célula, resultando em variações de densidade, distribuição de neurotransmissores e receptores, espessura cortical e tamanho do cérebro. Algumas partes do cérebro possuem maior potencial para plasticidade, por exemplo, o córtex encefálico (KOLB e GIBB, 2011).

O cérebro de mamíferos passa pelas mesmas etapas geneticamente programadas de desenvolvimento neural: neurogênese, migração, proliferação, diferenciação e maturação celular, sinaptogênese, morte celular e sináptica, e mielinização das fibras nervosas. Assim que as primeiras células são produzidas, a migração ao longo das células gliais radiais começa. As células do córtex formam seis camadas distintas, quando as células chegam em seus locais designados, elas se diferenciam em neurônios.

A maturação neuronal é adquirida com o crescimento de axónios e dendritos e este processo é guiado por sinais ambientais (KOLB e GIBB, 2011).

Os estágios variáveis de plasticidade ilustram a importância do momento em que ocorre o insulto ambiental no desenvolvimento do cérebro, afetando diferentes mecanismos em áreas específicas e com consequências comportamentais. Os períodos de vulnerabilidade ou períodos críticos do desenvolvimento do sistema nervoso referem-se aos períodos de pico de atividades de eventos específicos, como neurogênese, multiplicação glial, migração celular, diferenciação celular, em que os processos organizacionais são alterados mais facilmente (MORGANE *et al.*, 1993). Distorções na maturação coordenada de diferentes componentes cerebrais poderão romper o crescimento ordenado e a elaboração do circuito neural. Interferências temporais na progressão dos processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de desenvolvimento do sistema nervoso central, podem levar a um déficit funcional permanente (MORGANE *et al.*, 2002). No rato, na fase de lactação há crescimento rápido do encéfalo, com migração e diferenciação neuronal, sinaptogênese, multiplicação glial e mielinização (RICE e BARONE, 2000). A sinaptogênese é um marco do desenvolvimento do sistema nervoso, sendo a especificidade das conexões um processo altamente regulado pelo padrão temporal e espacial de atividade entre o tecido alvo e as células pré-sinápticas (WHITE e FITZPATRICK, 2007).

Assim, agressões durante as fases de desenvolvimento crítico do sistema nervoso, podem modificar os eventos ontogenéticos seqüenciais com efeitos diversos e persistentes sobre o sistema nervoso (MORGANE *et al.*, 1993). As repercussões de manipulações farmacológicas em sistemas de neurotransmissores estão entre os fatores externos que podem alterar o desenvolvimento. Estudos mostram que a manipulação serotoninérgica com inibidores seletivos da recaptação de serotonina, durante o período crítico de desenvolvimento do SNC, por exemplo, leva a um retardo na maturação reflexa, além de perda de peso e hipofagia em ratos (SOUZA *et al.*, 2004; DEIRÓ *et al.*, 2006; DEIRÓ *et al.*, 2008; HEAL *et al.*, 2008; FOX *et al.*, 2009; SINGH e SINGH, 2012; LAUZURICA *et al.*, 2013)

2.3 Serotonina

Por volta de 1930 Erspamer, interessado em substâncias que tivessem algum efeito vasoativo, acabou por descrever diversas moléculas, inclusive a serotonina, sendo

primeiramente chamada de enteramina. Em 1948, Page com o auxílio de Rapport e Arda Green, isolou uma substância proveniente do soro que induzia vasoconstrição e a chamou de serotonina. Um ano após, Rapport determinou a estrutura química da serotonina, a 5-hidroxitriptamina (5HT). Apenas na década de 50 que Beth Twarog com o auxílio de Page, encontrou a serotonina no sistema nervoso de mamíferos, descrevendo esta molécula como um neurotransmissor. Em 1963, na década seguinte, a serotonina foi relacionada a disfunções cerebrais por Woolley (WHITAKER-AZMITIA, 1999).

Atualmente a serotonina (5HT) tem sido descrita como um neurotransmissor modulador amplamente distribuído no sistema nervoso central, sendo sua expressão observada em etapas precoces do desenvolvimento, por volta do décimo segundo dia gestacional (E12) em ratos e, a maturação do sistema serotoninérgico só é considerada completa em um período que se estende do décimo nono dia gestacional (E 19) até o final do período crítico, 2 a 3 semanas após o nascimento (LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2000). Devido a essa expressão precoce, acredita-se que a serotonina desempenhe um papel essencial no desenvolvimento dos circuitos neurais, agindo inclusive como fator trófico em fases precoces do desenvolvimento, como na regulação da embriogênese e morfogênese (BUSNIKOV e LAUDER, 2001). Em mamíferos, os níveis de serotonina apresentam-se altos no cérebro imaturo, assim como dos seus respectivos receptores de alta afinidade no período perinatal (AZMITIA e WHITAKER-AZMITIA, 1997).

Não só como fator neurotrófico, a 5-HT tem efeito inibidor da conduta juntamente com um efeito modulador geral da atividade psíquica, influenciando, desta maneira, quase todas as funções cerebrais, inibindo ou estimulando o sistema GABAérgico (GILMAN e GOODMAN, 1987). É dessa forma que a serotonina regula o humor, o sono, a atividade sexual, o apetite, o ritmo circadiano, as funções neuroendócrinas, a temperatura corporal, a sensibilidade à dor, a atividade motora e as funções cognitivas (GILMAN e GOODMAN, 1987). Além disso, a 5-HT tem sido relacionada com a etiologia de diversas enfermidades e sintomas, incluindo ansiedade, depressão, fobia, esquizofrenia, transtorno obsessivo-compulsivo e distúrbios de pânico; além de hipertensão arterial, enxaqueca, hipertensão pulmonar, transtornos alimentares, vômitos e, mais recentemente, síndrome do intestino irritável (HOYER *et al.*, 2002).

Os neurônios serotoninérgicos localizam-se nos núcleos da rafe e, consistem em numerosos e distintos grupos de neurônios do tronco encefálico que se organizam ao longo da linha média emitindo projeções ascendentes e descendentes (WEISSMAN *et*

al., 1987). Em razão das características estruturais e organização do corpo celular, os neurônios serotoninérgicos foram agrupados e receberam nomenclatura alfanumérica desde a parte caudal do bulbo, grupo B1, até o mesencéfalo, grupo B9 (WEISSMAN *et al.*, 1987).

A síntese da serotonina ocorre nos núcleos da rafe mediana mesencefálica, a partir do aminoácido essencial triptofano que é captado de forma ativa do plasma por carreadores de aminoácidos neutros da barreira hematoencefálica (BHE). Uma vez captado, o triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela ação da enzima triptofano hidroxilase, a partir de uma hidroxilação na posição cinco do anel aromático (AZMITIA, 1999). Após a conversão do triptofano em 5-hidroxitriptofano, a enzima ácido-amino-aromático descarboxilase (AADC) descarboxila o 5-HTP originando assim a 5-hidroxitriptamina ou serotonina (AZMITIA, 1999).

Uma vez sintetizada, a serotonina será armazenada em vesículas através de um processo realizado por bombas de prótons (RAYMOND *et al.*, 2001). Ao ocorrer a despolarização do neurônio serotoninérgico e conseqüentemente o influxo de cálcio, o neurotransmissor será liberado na fenda sináptica, sendo esta liberação controlada por auto-receptores localizados nos neurônios pré-sinápticos. (RAYMOND *et al.*, 2001).

Entre suas várias funções, como neurotransmissor, a 5-HT exerce sua ação através da interação com estruturas moleculares específicas denominadas de receptores (HOYER *et al.*, 1994). Atualmente são conhecidos sete tipos de receptores para a 5-HT (5-HT₁ – 5-HT₇) divididos de forma heterogênea em 14 subtipos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F}; 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}; 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}; 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}) com funções e localizações específicas nas áreas pré e pós sinápticas (HOYER *et al.*, 1994).

A ação da 5-HT na manutenção da homeostase é regulada por mecanismos de feedback (ADELL, CELADA e ARTIGAS, 2001). Quando a concentração extracelular de 5-HT se eleva, a ativação de autoceptores (5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}) inibe tanto a síntese quanto a liberação da 5-HT das vesículas na fenda sináptica e quando diminui a 5HT extracelular facilita a síntese e a liberação (ADELL, CELADA e ARTIGAS, 2001).

Uma vez liberada a 5-HT, um eficiente mecanismo de recaptação é ativado para removê-la da fenda sináptica, através do transportador de serotonina (SERT), presente na membrana do neurônio pré-sináptico, controlando a disponibilidade de serotonina na fenda sináptica (BLAKELY *et al.*, 1994). Este transportador é uma proteína transmembrânica pertencente à família dos transportadores de

neurotransmissores dependentes Na^+/Cl^- , que é responsável pela captação da serotonina da fenda sináptica, trazendo a serotonina de volta para dentro do neurônio, regulando assim os níveis desse neurotransmissor e, conseqüentemente a ação do mesmo na sinapse, mantendo assim homeostasia do sistema (BLAKELY *et al.*, 1994).

Outro processo responsável pelo término da ação da serotonina é a degradação enzimática desse neurotransmissor pela enzima monoamina oxidase (MAO) (UPTON *et al.*, 2007). Essa enzima encontra-se no terminal pré-sináptico e na membrana mitocondrial onde converte a serotonina em 5-hidroxiindolacetaldeído (5-HIAA) e este produto é oxidado por uma NAD^+ -desidrogenase aldeído-dependente, formando ácido 5-hidroxi indoacético (UPTON *et al.*, 2007). A 5-hidroxiindoleacetaldeído também pode sofrer ação de um NADH -aldeído redutase-dependente, formando um álcool (UPTON *et al.*, 2007). O produto final da serotonina na via de degradação irá depender da razão de $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ no tecido. Existem pelo menos duas classificações da MAO: MAO-A e MAO-B, sendo a serotonina e a norepinefrina preferencialmente degradadas pela MAO-A ou novamente condicionadas em vesículas (UPTON *et al.*, 2007). As características que definem a 5-HT como neurotransmissor se encontram resumidas na Figura 1.

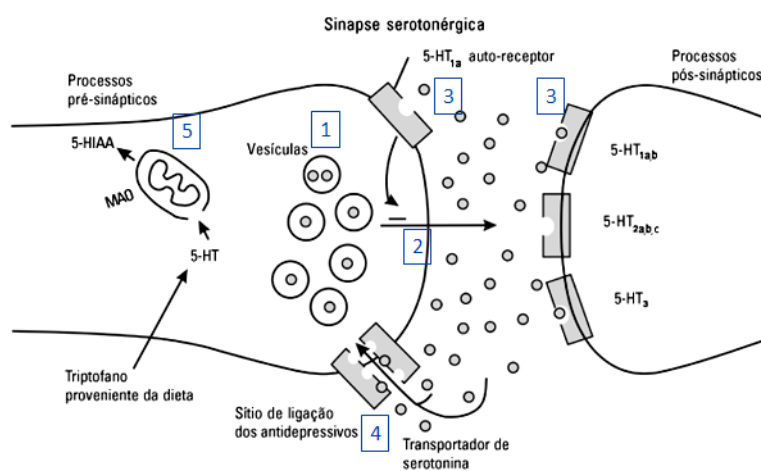


Figura 1: Figura esquemática da neurotransmissão serotoninérgica. 1. Armazenamento da 5-HT em vesículas nos terminação pré-sináptica; 2. Junção das vesículas a membrana plasmática e liberação da 5-HT na fenda sináptica; 3. Ação da 5-HT sobre receptores em neurônio pós e/ou pré-sinápticos; 4. Remoção da 5-HT na fenda sináptica por mecanismos de recaptura por proteínas transportadoras; 5. Metabolização da 5-HT recapturada por ação da MAO (adaptado de DEL-BEM, 2005).

2.4 Serotonina e desenvolvimento do Sistema Nervoso

A serotonina é um dos primeiros neurotransmissores a surgir no sistema nervoso central, mais abundante durante fases precoces do desenvolvimento, exerce um papel crucial, uma vez que age como fator trófico, antes de assumir sua função como neurotransmissor no cérebro maduro (GASPAR *et al.*, 2003; AZMITIA *et al.*, 2001). Walther e Bader (1999), observaram que a expressão de RNA mensageiro para a enzima triptofano hidroxilase é induzida imediatamente após a fertilização, ainda em estágios zigóticos.

O sistema serotoninérgico é capaz de regular sua própria diferenciação, através da ativação de seus auto-receptores, e o desenvolvimento dos tecidos alvos (WHITAKER-AZMITIA, 2001). A inibição do crescimento parece ser mediada principalmente através da ativação dos auto-receptores 5-HT_{1B}, enquanto que o crescimento parece ser mediado, em grande, parte pela liberação do fator S-100 β que é liberado por astrócitos após ativação do receptor 5-HT_{1A} (WHITAKER-AZMITIA, 2001).

Dentre as funções serotoninérgicas no desenvolvimento encefálico estão à regulação da neurogênese, migração celular, diferenciação, refinamento axonal, manutenção e remodelamento sináptico, sendo que os principais receptores serotoninérgicos envolvidos nessas ações mencionadas são 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} (WHITAKER-AZMITIA, 2001). De acordo com Normann & Clark (2005), a plasticidade sináptica pode ser modulada pelo sistema serotoninérgico, uma vez que altas concentrações de serotonina induzem uma hiperpolarização da membrana neuronal através dos receptores 5HT_{1A} e, assim, altera a despolarização pós-sináptica. Grande parte dessas ações serotoninérgicas é correlacionada com os efeitos da liberação do S-100 β , que exerce suas funções sobre o crescimento neurítico e plasticidade do SNC através da sua interação com proteínas do citoesqueleto. Esse fator interage com proteínas associadas à microtubulos (MAPs), através da inibição da fosforilação (WHITAKER-AZMITIA, 2001). A proteína associada ao crescimento (GAP-43) é inibida após a liberação de S-100 β , com isso ocorre à estabilização intracelular do citoesqueleto resultando em proliferação e diferenciação celular, promovendo dessa forma o desenvolvimento neuronal (WHITAKER-AZMITIA, 2001). Trabalhos recentes mostraram que elevados níveis de serotonina aumentam a expressão precoce da proteína GAP-43 na camada IV do córtex somatosensorial (KESTERSON *et al.*, 2002).

Evidências convergentes na literatura indicam que essa proteína exerce um papel importantíssimo por guiar axônios em crescimento e por modular a formação de novas conexões, principalmente por diferentes vias de sinalização que são sensíveis aos níveis de AMPc e Ca^{++} (BENOWITZ e ROUTTENBERG, 1997).

Acredita-se que as informações genéticas de um animal não sejam suficientes para especificar as interconexões neuronais que são estabelecidas, ocorrendo assim eventos epigenéticos que ativam genes específicos de maneira combinatória em diferentes momentos durante o desenvolvimento (AZMITIA, 2007). Desta forma, fatores externos como alterações nutricionais e/ou manipulações farmacológicas dos sistemas de neurotransmissores no período crítico, também podem alterar o crescimento e o desenvolvimento do SN, podendo ocorrer drásticas mudanças na diferenciação neuronal (MORGANE *et al.*, 1993).

2.6 Serotonina e ontogênese de reflexos

O sistema nervoso juntamente com o sistema musculoesquelético, é responsável pela constante interação entre o ser vivo e o meio ambiente através de receptores sensíveis aos diferentes estímulos do meio externo e do meio interno (BERG, 1994). Neurônios sensitivos conduzem as informações geradas no nível desses receptores até o sistema nervoso central, onde ocorre um processo de integração dessas informações (BERNE e LEVY, 1993). Circuitos neuronais responsáveis pela memória retêm esses dados, e desta forma emitem impulsos nervosos pelos neurônios motores, que promoverão a contração muscular (BERNE e LEVY, 1993). Dessa forma, ao se avaliar a integridade do sistema nervoso, é necessário verificar eventual comprometimento da sensibilidade, da motricidade ou das funções que refletem integração das informações derivadas de estímulos do meio ambiente, como por exemplo, o desenvolvimento de reflexos.

O reflexo é uma resposta motora estereotipada do sistema nervoso central em meio a estímulos internos ou externos (ZEHR E STEIN, 1999), que pode ser inconsciente em resposta a situações de medo e estresse, agindo como um mecanismo protetor ou de sobrevivência (SWERDLOW E MARK, 1998). Se a conexão sensório-motora é muito forte, pode resultar em excesso de reatividade motora ou se muito fraca, resulta em um baixo tônus muscular (MASGUTOVA *et al.*, 2010).

O reflexo, resultante da função nervosa, é um comportamento provocado por

estimulação preestabelecida e precisa, e que surge em períodos determinados durante o desenvolvimento ontogenético (FOX, 1965; SMART e DOBBING, 1971). Os diversos reflexos sobrepõem-se uns aos outros, o que caracteriza a ocorrência simultânea de vários eventos do desenvolvimento do SNC, obedecendo a uma sequência predeterminada de acordo com a idade dos animais (FOX, 1965; SMART e DOBBING, 1971). Isto vale especialmente para aqueles que envolvem os movimentos da cabeça e influenciam a posição das patas, como a recuperação do decúbito e geotaxia negativa (FOX, 1965). Assim, alguns reflexos expressam atividades labirínticas e parecem estar relacionados com a sobrevivência do animal, como por exemplo, a alimentação e a conservação da temperatura (FOX, 1965). A Tabela 1 mostra o desenvolvimento de reflexos avaliados por Fox (1965) de acordo com a idade das ninhadas.

Algumas respostas reflexas, após serem confirmadas, persistem durante o período de rápido crescimento do encéfalo, ou são modificadas, adquirindo padrões comportamentais do adulto (ADLARD e DOBBING, 1971). Ao avançar da idade, cada reflexo se faz presente e sobrepõe-se ao anterior pré-existente, sendo uma exceção os reflexos primitivos como o de preensão palmar que por serem primitivos desaparecem (ADLARD e DOBBING, 1971). Pode-se inferir, desta maneira, a existência de uma estreita correlação entre desenvolvimento estrutural e bioquímico do sistema nervoso e a ontogênese de reflexos (ADLARD e DOBBING, 1971).

Da mesma forma que os humanos os ratos apresentam reflexos primitivos, os quais aparecem inicialmente e desaparecem com o tempo, como o reflexo de preensão palmar, reflexo de busca e reflexo extensor cruzado (FOX, 1965). O reflexo postural de flexão e padrões locomotores de girar, rastejar e rolar também desaparecem e mediante o desenvolvimento do tônus muscular, vão sendo evoluídos para respostas mais elaboradas, importantes para o adequado padrão postural e conseqüentemente de locomoção (FOX, 1965).

TABELA 1. Desenvolvimento de reflexos da ontogênese em 45 ninhadas de ratos. Para o aparecimento dos reflexos, 1/100 significa uma resposta fraca em 100% das ninhadas enquanto que 9/75 representa uma resposta bem elaborada em 75% das ninhadas (FOX, 1965).

Response	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18 - 21 days in age
Righting	$\frac{1}{50}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$											
Crossed extensor	$\frac{1}{100}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$											
Forelimb placing	$\frac{1}{100}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$													
Hindlimb placing	$\frac{0}{0}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{9}{50}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$											
Acceleration righting	-	-	-	-	-	-	-	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{1}{75}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{5}{50}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{5}{200}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$	
Postural flexion	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{5}{50}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$										
Postural extension	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{5}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$								
Normal posture	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$							
Forelimb grasp reflex	$\frac{0}{0}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$	(hindlimb grasp appears later, 9 by 12-14 days) 100								
Pivoting	$\frac{1}{100}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{5}{25}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$									
Swimming	Circling until 6-8 days, then swim straight																	
Straight-line walking	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{9}{80}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$	(straight crawl, can later run, hop and jump)								
Hyperkinesias	Affecting head, limbs and trunk, reach a peak between 6-12 days, then gradually disappear																	
Rooting	$\frac{1}{100}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{1}{75}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$								
Vibrissa placing	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$						
Visual placing	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{1}{25}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$
Negative geotropism	$\frac{0}{0}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$	(less stereotyped at 14-16 days; (explore the slope) (pivoting predominates)									
Bar holding ability	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$
Cliff drop aversion	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{5}{75}$	$\frac{5}{100}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$										
Eyes open	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$		$\frac{5}{100}$	$\frac{9}{75}$	$\frac{9}{100}$	$\frac{9}{100}$					

A avaliação neurocomportamental do crescimento normal do rato pode ser investigada através de uma série de testes de reflexos sensório-motores desde o nascimento até a lactação, sendo a segunda semana pós natal um período crucial para a maturação neurocomportamental no rato (FOX, 1965). Desta forma, os reflexos são indicadores sensíveis da adaptação do neonato a vida extra-uterina durante seu desenvolvimento, e a maturação dos vários reflexos revela a maturação relacionada a diferentes regiões do SNC (ALLAM, 2008). Por isso, é essencial estudar o desenvolvimento pós natal das regiões do SNC juntamente com o desenvolvimento de reflexos (CASSIDY et al., 1994).

Várias estruturas cerebrais estão envolvidas no desenvolvimento de reflexos (ALLAM, 2008). Nicholls et al. (1992) mostrou que ações reflexas mais simples são mediadas pelo circuito neuronal da medula espinhal. Vários reflexos medulares ocorrem através de fibras nervosas ascendentes sensitivas que levam a níveis superiores as informações obtidas, por exemplo, na superfície do corpo (principalmente, tronco e membros) ou em órgãos internos, já as fibras nervosas descendentes influenciam neurônios motores que serão os responsáveis pela contração dos músculos esqueléticos (NICHOLLS *et al.*, 1992). Reflexos de preensão, colocação dos membros e de endireitamento na superfície são mediados por neurônios da medula espinhal (JACOBSON, 1970).

Outras estruturas, como o cerebelo, que tem importância para a coordenação motora e o equilíbrio, estão envolvidas no desenvolvimento de reflexos. O reflexo de endireitamento no ar é coordenado pelo cerebelo (CASSIDY et al., 1994). O cortex encefálico, por exemplo, está relacionado com o aparecimento de reflexos de colocação visual e pelas vibrissas (CASSIDY et al., 1992). O reflexo de colocação pelas vibrissas aparece anteriormente aos reflexos cerebelares e tardiamente aos reflexos medulares e requer o envolvimento de componentes do sistema nervoso central e periférico (ABDUL-HAMID et al., 2007). Já a expressão do reflexo de colocação visual está relacionada com a abertura dos olhos (CASSIDY et al., 1994).

Em relação ao padrão locomotor, o primeiro padrão de movimento do rato sobre o solo é o reflexo de rastejar, onde a superfície ventral do corpo permanece em contato com este (GRAMSBERGEN, 1998). Inicialmente, esse rastejar é realizado apenas com as patas anteriores, tendo a participação das quatro patas a partir de P4-P5 dias pós natal, entretanto os membros posteriores apresentam-se em extensão (CLARAC *et al.*,

1998; GRAMSBERGEN, 1998). Estes achados também são observados a partir de teste de excitabilidade dos motoneurônios, onde aqueles que inervam a musculatura extensora maturam sua função mais tardiamente que aqueles da musculatura flexora (VINAY, BROCARD e CLARAC, 2000). Movimentos de flexão e extensão laterais do tronco, apresentados nesse período, favorecem o pivoteamento do animal e auxiliam na ativação da musculatura de tronco (GRAMSBERGEN, 1998). Rastejar e pivoteamento são os tipos de locomoção predominantes até a metade da segunda semana pós-natal (CLARAC *et al.*, 1998).

A locomoção exige dois componentes: o componente físico, responsável pelas contrações rítmicas alternadas dos membros e músculos do tronco, produzido principalmente por um padrão gerador central na medula espinhal e o componente tônico associado ao tônus muscular postural necessário à locomoção com a superfície corporal acima do chão (GRILLNER, 1981). Estudos como os de Cazalets *et al.* (1990) e McEwen *et al.*, (1997) demonstram que o componente físico está presente ao nascimento mas, o tônico é imaturo ao nascimento. Uma significativa maturação do controle postural ocorrerá durante a primeira semana de vida pós-natal. E este depende de vários sistemas como o músculo esquelético, o sensorio motor, centros cerebrais superiores, vias descendentes da medula espinhal e tratos ascendentes de informações sensoriais e sinais eferentes do núcleo supra espinhal (ALTMAN e SUDARSHAN, 1975).

O sistema serotoninérgico tem um papel modulador essencial na função sensorio-motora e a utilização do comportamento exploratório eliciado pela variação na intensidade de estímulos é um importante caminho para a compreensão da relação do sistema serotoninérgico na cognição e comportamento (CAREY, 2010). Essa modulação está relacionada com a anatomia do sistema serotoninérgico, que reflete a importância desse sistema na função sensorio-motora, pois no neocórtex sensorial primário há hiperinervação dos neurônios serotoninérgicos, assim como em nível de neurônios α -motores (DOLY *et al.*, 2004). Assim, o sistema serotoninérgico pode controlar o comportamento através do estímulo pelo córtex sensorial e da resposta pelos neurônios α -motores.

É possível observar essa relação entre o sistema serotoninérgico e o desenvolvimento de reflexos, pois o período da segunda semana pós natal é considerado crucial para a maturação de reflexos em ratos (FOX, 1965). Este período é também quando ocorre pico da neurogênese serotoninérgica nos núcleos da rafe, entre 1º ao 12º

dia de vida pós-natal, sendo este momento, crítico para o aumento das projeções serotoninérgicas no cordão lombar (CLANCY *et al.*, 2001).

Neste sentido, os períodos críticos de desenvolvimento são relevantes para diversos níveis de aquisição de habilidades, tais como o desenvolvimento de acuidade sensorial e desenvolvimento motor (BERARDI *et al.*, 2000). Desta maneira, estudos têm relacionado os efeitos de alterações nutricionais e manipulação farmacológica como a utilização de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) em períodos críticos de desenvolvimento com o aparecimento do retardo na ontogênese de reflexos (DEIRÓ *et al.*, 2006; DEIRÓ *et al.*, 2008;; SMART e DOBBING, 1971).

2.8 Serotonina e diferenças sexo-específicas no desenvolvimento do sistema nervoso

O estresse ou a adversidade no início da vida podem modular a plasticidade típica do funcionamento neuronal, e seus efeitos podem ser mantidos a longo prazo, comprometendo a saúde e bem-estar do organismo (AUGER e AUGER, 2013). Nesse sentido, o sexo do indivíduo parece desempenhar um papel importante para influenciar a ocorrência, gravidade e o início de certas doenças mentais (AUGER e AUGER, 2013). A compreensão dos mecanismos epigenéticos que influenciam a diferenciação sexual do cérebro em desenvolvimento pode explicar o porquê de alguns indivíduos apresentarem maior vulnerabilidade a essas doenças.

A epigenética refere-se a mecanismos moleculares que modulam a expressão gênica, através do silenciamento ou ativação de genes nas modificações químicas de DNA e proteínas histonas, e que podem ser herdadas por mitose sem alterar a sequência de nucleotídeos do DNA (BATESON e GLUCKMAN, 2011). Essas interações DNA-histona, bem como a expressão de genes, também são influenciados por micro RNAs não-codificantes, que modulam o padrão de expressão gênica e define um fenótipo celular específico (Figura 2) (NICULESCU e HAGGARTY, 2011).

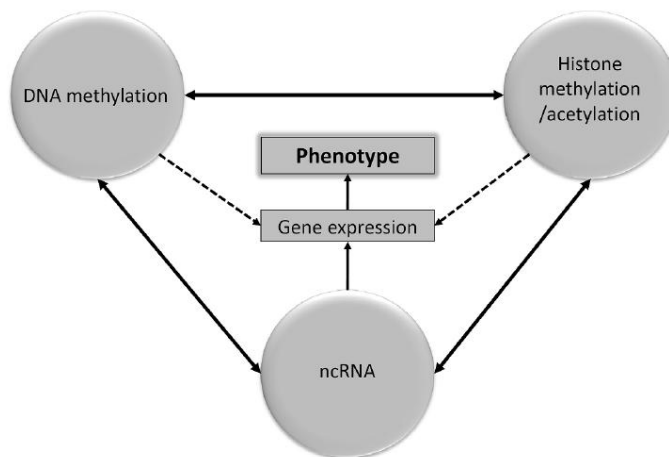


Figura 2. Processos epigenéticos (Interação entre a metilação do DNA, modificações de histonas e micro RNAs não codificantes) modulam o padrão da expressão gênica e o fenótipo celular (NICULESCU e HAGGARTY, 2011).

Vários mecanismos epigenéticos podem modular diferenças sexuais em resposta ao estresse (MCCARTHY et al., 2009). Estes incluem o grupo de DNA metiltransferases (DNMTs), que atuam diretamente para suprimir a transcrição ou agir em com o domínio de ligação de proteínas metil-CpG (MBD), que por sua vez podem recrutar histonas para modificar o acesso dos fatores de transcrição de DNA (MCCARTHY et al., 2009), gerando efeitos sexo-específicos em resposta a influências ambientais (MORGAN e BALE, 2011).

Nesse sentido, o gênero masculino está em maior risco de desenvolver deficiências do comportamento social como resultado de perturbações para maior expressão MeCP2 (proteína com methyl-CpG-binding 2) durante o desenvolvimento do cérebro (AUGER e AUGER, 2013). Os machos também parecem ser mais sensíveis a alterações a outras moléculas epigenéticas, tais como co-ativadores e co-repressores, durante o desenvolvimento inicial do cérebro, sugerindo uma vulnerabilidade maior para perturbações nos mecanismos epigenéticos importantes para o desenvolvimento do cérebro (AUGER e AUGER, 2013).

Estudos mostram que a 5-HT pode intervir nesse ambiente (GASPAR et al., 2003). Modelos experimentais genéticos e farmacológicos que visam a modulação de moléculas relacionadas ao funcionamento da 5-HT têm demonstrado como alterações nessas moléculas entre a concepção e a vida adulta podem alterar o neurodesenvolvimento com consequências para o fenótipo comportamental (GASPAR

et al., 2003). A inibição do SERT, através de administração pós-natal de fluoxetina em camundongos machos durante uma semana, resultou em comportamentos depressivo e de ansiedade e aumentou as respostas ao estresse na vida adulta (ANSORGE et al., 2004). Mais estudos são necessários para verificar se essas alterações são observadas em fêmeas.

A exposição a um determinado stress durante o período perinatal pode resultar em diferentes alterações persistentes no sistema serotoninérgico, incluindo a diminuição na inervação de 5-HT, no funcionamento dos receptores, expressão de proteínas e enzimas, densidade sináptica, (HUIZINK, MULDER e BUITELAAR, 2004; VAN DEN HOVE et al, 2014). Nesse sentido, mudanças na disponibilidade de serotonina na fenda sináptica causadas por inibidores ISRS durante o desenvolvimento do cérebro podem levar a alterações morfológicas e funcionais irreversíveis no sistema nervoso central de roedores (SILVA et al, 2010; SIMPSON et al., 2011; LEE e LEE, 2011).

A administração de fluoxetina diminuiu o número e tamanho dos neurônios 5-HT em núcleos da rafe dorsal e a quantidade de terminais de 5-HT no hipocampo (SILVA et al, 2010). Este ISRS também causou alterações morfológicas nos neurônios estriados e do córtex motor, conduzindo ao atraso no desenvolvimento das funções motoras (LEE e LEE, 2011). Já a exposição ao citalopram prejudicou a mielinização do axônio, conexões de neurônios dos núcleos da rafe caloso, e função sensorial (SIMPSON et al., 2011). Alguns destes efeitos parecem ter uma resposta sexo-específica (VAN DEN HOVE et al, 2014.; SLIWOWSKA et al, 2014.; SLOTKIN et al., 2007; SIMPSON et al., 2011).

Hohmann (2007) sugere que a serotonina pode não ter a mesma relevância na plasticidade do desenvolvimento cortical entre machos e fêmeas, tornando cada sexo susceptível a diferentes desequilíbrios de 5-HT em várias regiões cerebrais. No estudo de Coleman (2004), ao contrário dos machos, fêmeas BALB / CbyJ não apresentaram um pico pós-natal muito acentuado dos níveis de serotonina neocorticais, sugerindo que a inervação de 5-HT pode influenciar de forma mais sutil o desenvolvimento do córtex das fêmeas.

Estudos em roedores têm demonstrado diferenças sexo-específicas após a manipulação do sistema serotoninérgico no início da vida com maior vulnerabilidade nos machos e inclusive com efeitos em longo prazo (ZHANG et al., 2013; DARLING et al., 2011; SIMPSON et al., 2011; HOHMANN et al., 2007; UÇEILER et al., 2009;

CSABA *et al.*, 2003). Por exemplo, no estudo de Zhang *et al.*, 2013 foi observado uma redução na expressão de fibras ir-SERT no bulbo olfatório apenas em machos adultos que foram expostos a citalopram no período neonatal. Já os efeitos da exposição perinatal ao citalopram afetou a função do circuito locus cerulus masculino, sem efeito nas fêmeas (DARLING *et al.* 2011). Outro estudo, no qual uma única administração de 5HT em ratos recém-nascidos foi aplicada, reduziu os níveis de 5HT no corpo estriado de ratos machos adultos e mostrou aumento da atividade sexual, enquanto não foram detectadas quaisquer diferenças em fêmeas adultas (CSABA *et al.*, 2003). Em machos e fêmeas com 5HT depletada, houve menor inervação serotoninérgica no córtex anterior dos machos, além de demonstrarem comportamento com menor tempo de exploração em resposta a rearranjo espacial e objeto novo, porém esse efeito não foi encontrado nas fêmeas (HOHMANN *et al.*, 2007). Simpson *et al.*, (2011) mostrou que a manipulação de 5-HT perinatal causou distúrbios nas conexões dos núcleos da rafe e corpo caloso, prejuízos no processamento sensorial e na formação da bainha de mielina, gerando neofobia e menor motivação para brincar em ratos juvenis, com maior vulnerabilidade nos machos. E no estudo de Uçailer *et al.*, (2009), a falta do transportador de serotonina em ratos machos e fêmeas, reduziu a atividade locomotora e aumentou a predisposição a obesidade em machos.

Dessa forma, estudos que avaliam os efeitos específicos do sexo em resposta ao estresse no início da vida, são de extrema importância, pois fornecem subsídios para entender o porquê de um indivíduo adulto ter sensibilidade maior ao estresse e má adaptação do comportamento em resposta ao estresse (GOEL *et al.*, 2009). Essas diferenças na programação do desenvolvimento encefálico podem estar relacionadas à origem de desordens do sistema neurológico relacionadas ao gênero, portanto, mais investigações são necessárias de forma a incluir ambos os sexos no estudo desses efeitos.

2.7 Sistema serotoninérgico e Comportamento Alimentar

A ingestão de alimentos é controlada homeostaticamente tanto pelo tronco encefálico, atuando como mediador da saciedade a curto prazo por iniciar respostas gastrointestinais e motoras, quanto pelos centros hipotalâmicos ao integrar informações de reservas energéticas a longo prazo (LAM *et al.*, 2010). Já os aspectos motivacionais e compensatórios têm sido associados aos circuitos mesolímbicos (LAM *et al.*, 2010).

As áreas e núcleos hipotalâmicos envolvidos na regulação da ingestão de alimento e do balanço energético incluem os núcleos arqueado (ARC), paraventricular (PVN), ventromedial (VMN) e dorsomedial (DMN) e as áreas hipotalâmica lateral (AHL) e perifornical (APF) (SCHWARTZ *et al.*, 2000; MORTON *et al.*, 2006; SIMPSON *et al.*, 2009). Esses núcleos geram sinais através de vários neuropeptídios que estão envolvidos com o sistema serotoninérgico, e que através de seus receptores, com diferentes funções, principalmente em receptores 5-HT₁ e 5-HT₂, são responsáveis pela redução da ingestão de alimentar (SCHWARTZ *et al.*, 2000; MORTON *et al.*, 2006; SIMPSON *et al.*, 2009).

O núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo, por exemplo, é o principal centro integrador dos sinais metabólicos produzidos com a periferia, em resposta à ingestão de alimentos (SCHWARTZ *et al.*, 2000; MORTON *et al.*, 2006; SIMPSON *et al.*, 2009).. O ARC é constituído por neurônios que contém proteína derivada do gene agouti (AgRP) e neuropeptídeo Y que aumentam a ingestão alimentar e de neurônios que expressam transcrito regulado por anfetamina e cocaína (CART) e pró-piomelanocortina (POMC), estando estes últimos relacionados à saciedade (SCHWARTZ *et al.*, 2000; MORTON *et al.*, 2006; SIMPSON *et al.*, 2009).

A Serotonina, que difusamente inerva a maior parte do neuroeixo, pode coordenar ou influenciar as respostas dos centros de reflexos do tronco encefálico e os centros integrados do hipotálamo envolvidos no controle da ingestão alimentar (LAM *et al.*, 2010). Isso pode ser evidenciado através da hiperpolarização de neurônios NPY / AgRP mediados pelos receptores 5-HT_{2C}, causando inibição da liberação de NPY e a concomitante despolarização de neurônios POMC / CART (HEISLER *et al.*, 2006). Os neurônios POMC / CART liberam α -MSH, ativando o segundo mensageiro MC4R, principalmente no núcleo paraventricular do hipotálamo, mediados por receptores 5HT_{1B}, resultando em hipofagia (HEISLER *et al.*, 2006). A ativação inibitória de 5HT_{1B} também atenua a inibição pós sináptica para neurônios POMC/CART, potencializando

o efeito anorexigênico e consequentemente promovendo a saciedade e saciação da ingestão de alimentos (HEISLER *et al.* 2006).

Foi demonstrado experimentalmente que a depleção de 5-HT com injeção intracerebroventricular de p-clorofenilalanina (inibidor da triptofano hidroxilase, enzima limitante de síntese de 5-HT) induziu hiperfagia e ganho de peso em ratos (DRYDEN *et al.*, 1996). Por outro lado, a microinjeção de d-norfenfluramina no núcleo hipotalâmico paraventricular promoveu redução da ingestão alimentar (WEISS *et al.*, 1990). A 5-HT também promove uma supressão na ingestão de carboidratos, e esta pode ser menos seletiva em seus efeitos sobre a escolha dos macronutrientes por depender da dose da droga e do estado nutricional do animal (BLUNDELL, 1979). Experiências mostram que a estimulação serotoninérgica, através de receptores específicos 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} é mais eficaz em suprimir a ingestão de carboidratos no início do período ativo de alimentação na transição entre o período claro e o escuro do rato (BLUNDELL, 1979). Isso ocorre porque a maior atividade serotoninérgica se dá no início da fase escuro (LEIBOWITZ, 1998).

O sistema canabinoide, relacionado com o controle hedônico da ingestão alimentar, também apresenta interação com o sistema serotoninérgico (WARD *et al.*, 2008). Estes sistemas podem sinergicamente modular o comportamento alimentar, mas ainda são necessários estudos caracterizando as interações entre 5-HT e o receptor canabinoide 1 (CB1) para identificar os mecanismos subjacentes neste controle (WARD *et al.*, 2008).

Vários estudos têm mostrado que o tratamento com inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) reduz a ingestão de alimentos e o peso corporal em ratos (DEIRÓ *et al.*, 2008; HEAL *et al.*, 2008; FOX *et al.*, 2009; SINGH e SINGH, 2012; LAUZURICA *et al.*, 2013). Muitos antidepressivos, inibidores da recaptação de serotonina, tais como fluoxetina, citalopram ou clomipramina podem influenciar o comportamento alimentar, ao diminuir a ingestão de alimentos e suas ações são realizadas através da inibição da recaptação sináptica de serotonina (BLUNDEL e LATHAM, 1979). Essas drogas se ligam seletivamente ao SERT inibindo a recaptação de serotonina e aumentando a disponibilidade de serotonina na fenda sináptica (SPINKS e SPINKS, 2002).

2.5 Inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS)

Os Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRSs) pertencem a uma classe de fármacos utilizados para o tratamento de uma série de patologias relacionadas à fisiologia do neurotransmissor serotonina (SPINKS e SPINKS, 2002). Estes fármacos aumentam a concentração de 5-HT na fenda sináptica, bloqueando a sua recaptação pré-sináptica, por inibir o transporte ativo pré-sináptico do transportador de 5-HT (SERT) (SPINKS e SPINKS, 2002) (Figura 3).

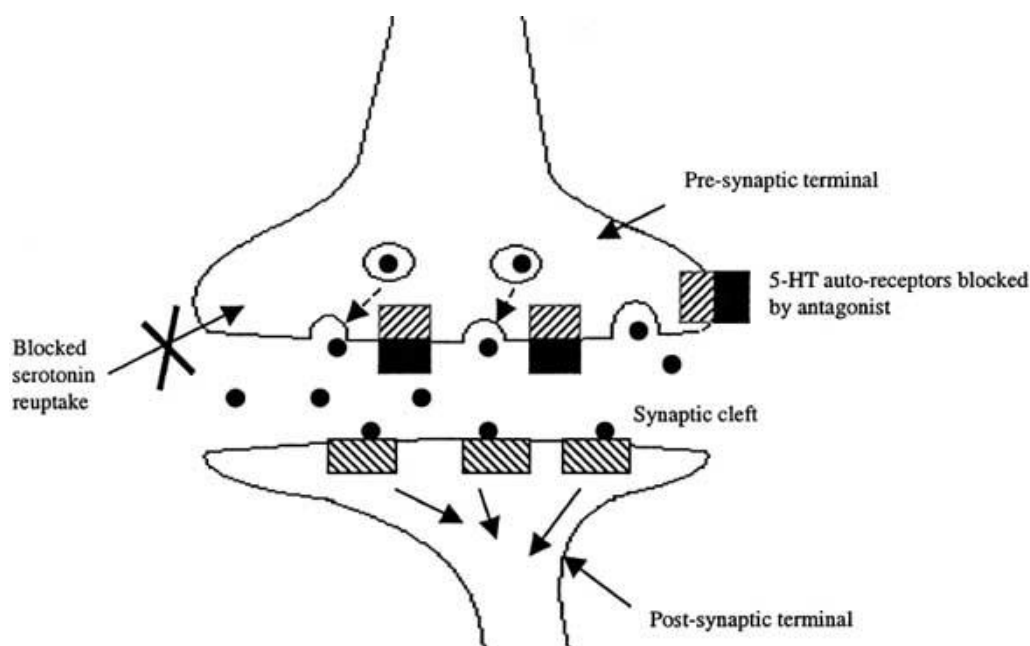


Figura 3- Mecanismo de ação dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (SPINKS e SPINKS, 2002).

Quando o ISRS é utilizado cronicamente, após algumas semanas os auto-receptores inibitórios 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} tornam-se dessensibilizados resultando em uma diminuída ação inibitória desses receptores sobre a liberação da 5-HT (WALDINGER, 2005). Conseqüentemente, a 5-HT volta a ser liberada novamente na sinapse. Entretanto, devido ao contínuo bloqueio do 5-HTT induzido pelo ISRS, a 5-HT não pode voltar para dentro do neurônio pré-sináptico e, assim, os níveis de 5-HT tornam-se mais altos na sinapse. Este aumento da neurotransmissão serotoninérgica exerce um forte efeito sobre todos os receptores pós-sinápticos que determina os efeitos clínicos da administração repetitiva dos ISRS (WALDINGER, 2005).

A exposição a ISRSs durante o desenvolvimento, resulta em um aumento agudo na disponibilidade de serotonina na fenda sináptica (OBERLANDER et al. 2009). No entanto,

reduções dos níveis de serotonina durante a idade adulta, devido a ativação de auto-receptores inibitórios 5-HT_{1A}, como consequência dessa exposição pode ser observado em animais expostos a ISRSs durante o período perinatal (HENSLE 2006;. OBERLANDER et al 2009) (Figura 4). Esse efeito demonstra, portanto, que a modulação serotoninérgica através da exposição SSRI perinatal, tem efeitos a longo prazo sobre o sistema serotoninérgico e provavelmente afeta muitos processos de desenvolvimento.

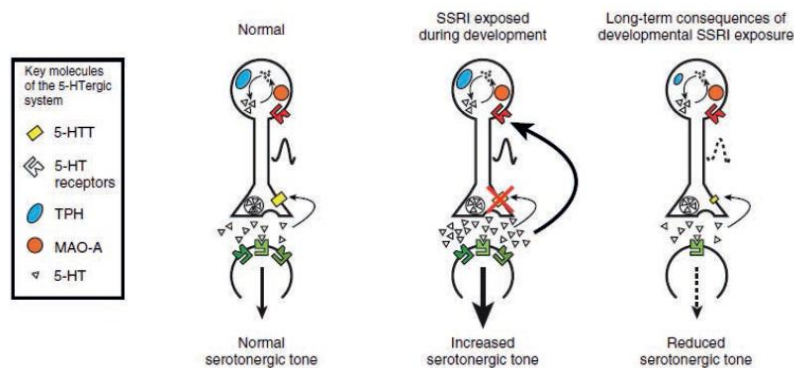


Figura 4. Efeitos a longo prazo do aumento dos níveis serotoninérgicos durante o desenvolvimento (Oberlander et al. 2009).

Em crianças, a exposição à ISRS durante o desenvolvimento também tem causado alterações comportamentais (OBERLANDER et al., 2007; OBERLANDER et al., 2010). No estudo de Oberlander et al., (2007), crianças, de 4 anos, expostas a ISRS durante o período pré-natal têm escores mais elevados de problemas de externalização como agressão, déficits de atenção, hiperatividade e comportamentos de oposição ou desafiadores. Por outro lado, a exposição pré-natal a ISRS juntamente com a depressão materna resultou em aumento de comportamentos internalizados como depressão, ansiedade, e retraimento social em crianças de 3 e 4 anos s (OBERLANDER et al. 2010).

Estudos pré-clínicos de exposição ISRS em ratos durante desenvolvimento também demonstraram impactos a longo prazo sobre comportamentos afetivos. Simpson et al. (2011) observou comprometimento do desenvolvimento social e resposta a objeto novo na adolescência. Em ratos adultos, foram encontrados aumento de sintomas de ansiedade e depressão (ANSORGE et al 2008; ANSORGE et al 2004;. LISBOA et al 2007;. OLIVIER et al 2011; SIMPSON et al 2011, KARPOVA et al. 2009; LISBOA et al 2007;. POPA et al 2008).

3. HIPÓTESE

A inibição da recaptação de serotonina no período neonatal retarda a ontogênese de reflexos e desenvolvimento somático, além de diminuir ingestão alimentar em ratos machos e fêmeas, com maior comprometimento nos machos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar as repercussões e as diferenças sexo-específicas em resposta à inibição da recaptação, sobre a ontogênese de reflexos, desenvolvimento somático e o consumo alimentar em ratos neonatos machos e fêmeas.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar as diferenças sexo-específicas das variáveis abaixo:

1. Desenvolvimento dos reflexos;
2. Perfil ponderal dos animais;
3. Desenvolvimento somático;
4. Consumo alimentar durante a lactação e pós-lactação;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 71 ratos (oriundos de 9 ninhadas), sendo 34 machos e 37 fêmeas da linhagem Wistar selecionados ao acaso, provindos de ratas primíparas e peso corporal entre 200g-280g. Os animais foram obtidos na colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (46cmx34cmx20cm), ambiente com ciclo claro-escuro de luz (18:00 às 06:00h) e escuridão (06:00 às 18:00h), temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com livre acesso a água e ração (dieta Labina – Purina S/A durante todo experimento)

Para obtenção dos neonatos, foram acasalados animais machos e fêmeas (proporção 1:2) com idade entre 90 e 120 dias. O diagnóstico da prenhez foi realizado através do teste de esfregaço vaginal e acompanhamento do ganho de peso corporal das gestantes. Uma vez, após ser constatado o nascimento de filhotes, as ninhadas foram ajustadas para 8 filhotes, pesando entre 5-8g cada. Este dia foi considerado como o 1^a dia de vida do conceito. A ninhada foi formada preferencialmente de quatro neonatos machos e 4 neonatos fêmeas os quais foram mantidos com as suas nutrizes até o 21^o dia de vida pós natal. Após o desmame os filhotes foram alocados em gaiolas individuais, produzida em policarbonato cristal transparente, autoclavável e resistente a ácidos, nas medidas de 30x20x19, nas mesmas condições padrões de biotério até o final do período experimental. Os procedimentos experimentais obedeceram aos princípios do comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo n^o 23076.043932/2013).

5.2 Tratamento

Farmacológico

Para manipular o sistema serotoninérgico, foi utilizado durante a lactação (1^o ao 21^o dia de vida) um inibidor seletivo de recaptação de serotonina (ISRS), a fluoxetina (Sigma®). Este fármaco bloqueia a proteína transportadora da 5-HT, da fenda ao botão neuronal pré-sináptico, aumentando sua disponibilidade para o processo de neurotransmissão (Hiemke e Hartter 2000; Qu, Aluisio et al. 2009). Foi utilizado na concentração de 1µl/g de peso corporal (p.c.), a qual já foi observada aumentar as

concentrações encefálicas da 5-HT (Miller, Schultz et al. 2008). A droga foi obtida na forma de cloridrato de fluoxetina e dissolvida em veículo controle, uma solução salina (NaCl) a 0.9%.

Controle

Foi utilizado 1µl/g p.c. de solução de Cloreto de Sódio (NaCl) á 0,9%.

5.3. Via de Manipulação

O tratamento foi administrado por via Subcutânea (sc) na região dorsal da pele do animal consciente, e o horário de manipulação ocorreu ao início do ciclo escuro (7:00h), período que ocorre maior pico de liberação da serotonina (Sanchez, Sanchez et al. 2008).

5.4. Grupos Experimentais

No período de lactação, de cada ninhada (n=8) foram formados quatro grupos experimentais, segundo o gênero e tratamento:

- Machos Salina (MS, n=16): foi tratado diariamente com solução salina a 0,9%, 1µl/g, peso corporal (p.c.), sc, do 1º ao 21º dia pós-natal;
- Machos Fluoxetina (MF, n=18): os animais foram tratados com fluoxetina na dose de 1µl/g , p.c., sc; do 1º ao 21º dia pós-natal.
- Fêmeas Salina (FS, n=19): foi tratado diariamente com solução salina a 0,9%, 1µl/g, peso corporal (p.c.), sc, do 1º ao 21º dia pós-natal;
- Fêmeas Fluoxetina (FF, n=18): os animais foram tratados com fluoxetina na dose de 1µl/g , p.c., sc; do 1º ao 21º dia pós-natal.

As ninhadas e os grupos experimentais foram distribuídos segundo ilustração abaixo:

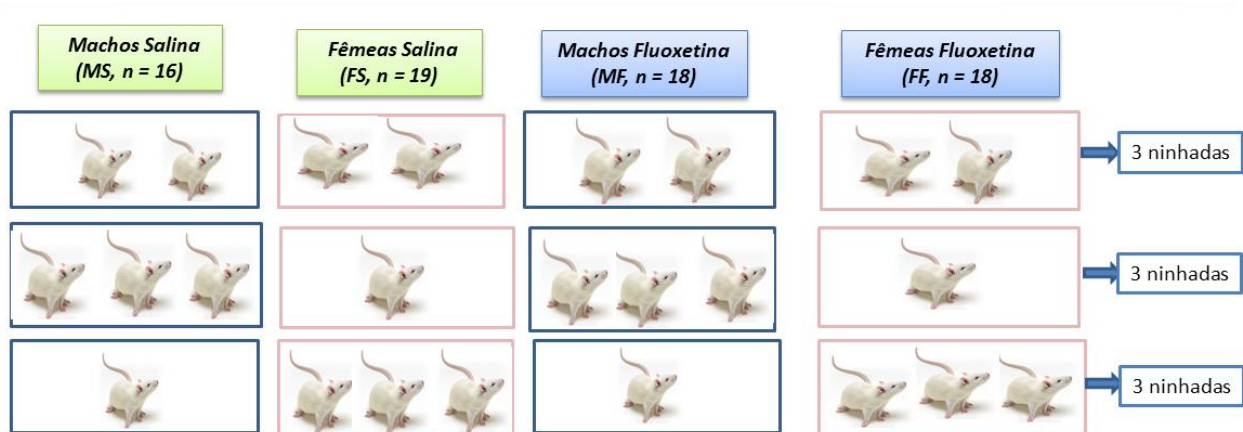


Figura 5. Formação dos grupos experimentais.

Em apenas uma ninhada, dos 8 animais, foram utilizados apenas 7 para os experimentos, pois um animal foi utilizado apenas para completar ninhada.

5.5 Procedimentos Experimentais

5.5.1 Avaliação da ontogênese dos reflexos

Foram analisados diariamente, em cada animal dos diferentes grupos, a partir do 1º ao 21º dia pós-natal, às 13:00h, o desenvolvimento dos seguintes reflexos (método modificado de Smart e Dobbing, 1971a e FOX, 1965).

Para cada os reflexo, o dia da consolidação do reflexo foi considerado o primeiro dia da seqüência de três dias consecutivos de aparecimento completo da resposta reflexa esperada. Foram utilizados instrumentos elaborados ou existentes no laboratório, sendo procedidos conforme descrição abaixo:

Preensão Palmar: Utilizando-se um bastonete de metal, com aproximadamente 5 cm de comprimento por 1 mm de diâmetro, foi realizada uma leve percussão na palma da pata dianteira esquerda de cada animal. A resposta foi considerada positiva, ao haver a flexão rápida dos dedos após duas tentativas (Figura 6A).

Recuperação de Decúbito: O rato foi colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície plana. Foi considerado resposta positiva, quando o animal girou o corpo e assumiu o decúbito ventral apoiado nas quatro patas, num período máximo de 10s (Figura 6B).

Colocação pelas Vibrissas: O rato foi suspenso pela cauda de tal forma que suas vibrissas tocaram levemente a borda de uma mesa. A resposta foi positiva, quando o animal, no tempo máximo de 10s, colocou as patas anteriores sobre a mesa tentando caminhar (Figura 6C).

Aversão ao Precipício: O animal foi colocado com as patas dianteiras sobre a borda de uma superfície plana e alta (mesa) de maneira a detectar o precipício. A resposta positiva foi considerada quando o animal, no tempo máximo de 10s, deslocou 45º do precipício, caracterizando a aversão (Figura 6A).

Resposta ao Susto: O rato foi submetido a um estampido agudo, produzido pela percussão de um bastão metálico sobre um recipiente (4,5 cm de diâmetro x 6 cm de altura) também metálico e oco, a uma distância aproximada de 10 cm do animal. A resposta foi considerada positiva, quando ocorrer uma simultânea e rápida retração com a imobilização involuntária do corpo do animal, característica do susto (Figura 7A).

Geotaxia Negativa: O animal foi colocado no centro de uma rampa de 45º de inclinação revestida com papel crepom, com a cabeça no sentido descendente. A resposta reflexa foi considerada positiva quando o animal, num período máximo de 10s, voltou-se completamente, girando o corpo em aproximadamente 140º, posicionando a cabeça em sentido ascendente (Figura 7B).

Queda Livre: O rato foi segurado pelas quatro patas com o dorso voltado para baixo, a uma altura de 30 cm (uma régua de 30 cm, perpendicular ao plano servirá como guia). O animal foi então solto e observado sua queda livre sobre um leito de algodão (30 x 12 cm). A resposta foi considerada positiva, quando o animal girou completamente o corpo, voltando o ventre para baixo, caindo na superfície apoiado sobre as quatro patas (Figura 7C).

Bar Holding: O animal foi colocado em cima de uma régua com 10cm de distância da superfície, a resposta foi positiva se em 10s o animal conseguiu segurar-se na régua sem cair (Figura 8A).

Preensão da Pata Posterior: Utilizando-se um bastonete de metal, com aproximadamente 5 cm de comprimento por 1 mm de diâmetro, foi feita uma leve percussão na palma da pata posterior esquerda de cada animal. A resposta foi considerada positiva, se houver a flexão rápida dos dedos após duas tentativas (Figura 8B).

(A)



(B)



(C)



(D)



Figura 6. Procedimento para avaliação de reflexos (parte 1): (A) Preensão palmar, (B) Recuperação de decúbito, (C) Colocação pelas vibrissas, (D) Aversão ao precipício

(A)



(B)



(C)



Figura 7. Procedimento para avaliação de reflexos (parte 2): (A) Reação ao susto, (B) Geotaxia Negativa, (C) Queda Livre.

(A)



(B)

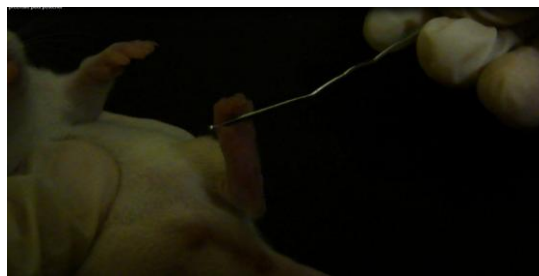


Figura 8. Procedimento para avaliação de reflexos (parte 3): (A) Bar Holding, (B) Preensão da Pata Posterior.

5.5.2 Avaliações do crescimento somático

Cada animal foi avaliado nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 pós natal às 13:00h, com auxílio de um paquímetro digital (JOMARCA[®]) quanto às seguintes medidas (SILVA et al., 2005):

Eixo Látero-lateral do Crânio (ELLC): Este foi considerado, tendo como referência a linha imaginária perpendicular entre os pavilhões auriculares. O animal foi contido com uma das mãos, tendo a cabeça deste entre os dedos indicador e polegar, medindo a distância em mm (Figura 9A).

Eixo Ântero-posterior do Crânio (EAPC): Para a medida do eixo ânteroposterior do crânio, foi considerada como referência, a linha média que vai da extremidade do focinho até o ponto de interseção com outra linha perpendicular imaginária. Essa última passa tangencialmente às extremidades posteriores dos pavilhões auriculares. O animal foi contido com uma das mãos, mantendo a cabeça deste entre os dedos indicador e polegar, medindo a distância em mm (Figura 9B).

Eixo Longitudinal (EL): O animal teve as regiões dorso-anterior, dorso-posterior do corpo comprimidas e a cauda do animal de encontro a uma superfície plana (mesa). Em seguida, com uma caneta, foram feitas marcas na mesa, coincidentes com o focinho e a base da cauda do animal. Mediu-se então a distância em mm entre os pontos obtidos (Figura 9C).

Comprimento da Cauda (CC) O animal foi contido delicadamente com uma das mãos do pesquisador. Em seguida, foi colocada a cauda estirada verticalmente na borda de uma mesa lisa e plana. Com uma caneta, foram feitas marcas na mesa, coincidentes com a extremidade e a base da cauda. Mediu-se então, a distância entre os pontos obtidos em milímetros (mm) (Figura 9D).



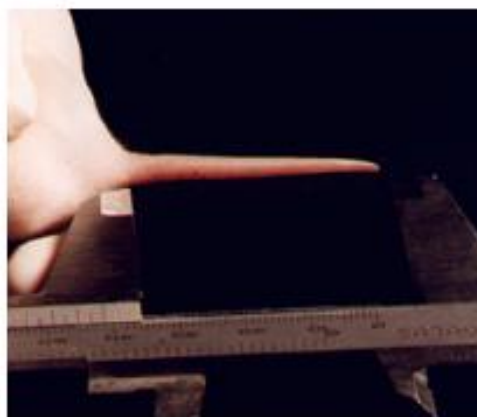
A



B



C



D

Figura 9. Procedimentos para avaliação das medidas de crescimento somático: (A) Eixo láterolateral do crânio, (B) Eixo antero-posterior do crânio, (C) Eixo longitudinal do corpo, (D) Comprimento da cauda (Fotografias: Barros, 1999).

5.5.3. Avaliação das características físicas

As características físicas foram avaliadas diariamente 13:00 - 15:00 pelo método do Smart e Dobbing (1971), durante o período de amamentação, até a maturação. A idade de maturação foi definida como o dia em que foi observado pela primeira vez. Os seguintes caracteres físicos: Abertura do pavilhão auditivo (APA), abertura do conduto auditivo (ACA), erupção dos incisivos inferiores (EII) e superiores (EIS) e abertura dos olhos (AO).

APA – Os dois pavilhões, primitivamente dobrados ao nascimento sobre o orifício auricular, desfizessem a dobra, ficando livre e palpável pelo pesquisador (Figura 10A).

ACA – Os dois orifícios auriculares, primitivamente obliterados, abriam-se, tornando-se visíveis com auxílio de lupa com foco luminoso (Figura 10B).

EII - A irrupção dos incisivos inferiores foi observada quando o rompimento da gengiva ocorreu com exposição incisal (Figura 10C).

EIS - A irrupção dos incisivos superiores foi observada quando o rompimento da gengiva ocorreu com exposição incisal (Figura 10C).

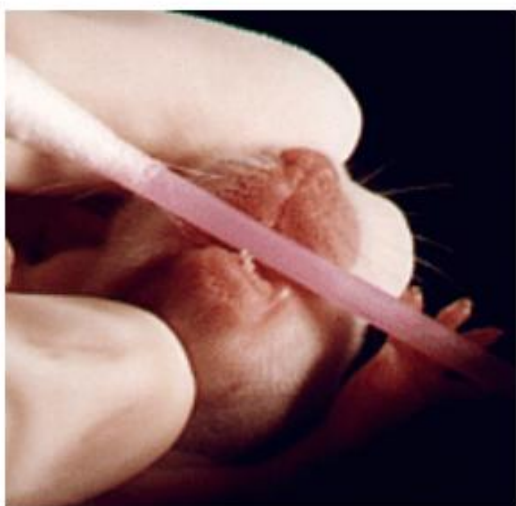
AO - Ambos os olhos abertos e com a presença de movimento palpebral (Figura 10D).



A



B



C



D

Figura. 10. Procedimentos para avaliação da maturação das características físicas: (A) Abertura do pavilhão auditivo, (B) Abertura do conduto auditivo, (C) Irrupção dos incisivos, (D) Abertura dos olhos (Fotografias: Barros, 1999).

5.5.4 Peso corporal e Consumo alimentar

As gestantes e os animais dos grupos experimentais foram acompanhados periodicamente. O peso dos filhotes foi mensurado diariamente durante o período de lactação e nas avaliações pós desmame. O peso foi registrado no início do ciclo escuro. Para medir o peso corporal dos animais foi utilizada uma balança digital (Marte, modelo S-100 com sensibilidade de 0.01g) a fim de estabelecer a evolução ponderal dos grupos experimentais.

Consumo alimentar durante a lactação

A avaliação do consumo alimentar durante o período de lactação foi realizada às 13:00h nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, segundo adaptação do protocolo descrito por Perillan *et al.* (2007), que consiste em quatro etapas: A) Privação: Cada ninhada foi separada da mãe durante duas horas e alocada em recipientes com maravalha sob aquecimento com auxílio de uma lâmpada (IR) de 25-W. B) Pesagem: Os neonatos foram pesados com auxílio de uma balança de precisão antes e depois da privação. C) Ingestão de leite: Os neonatos foram realocados junto as suas progenitoras durante uma hora e posteriormente repesados. D) Cálculo da ingestão: O ganho de peso corporal (g) foi usado como a mensuração da ingestão de leite. Para garantir maior confiabilidade na quantificação de leite ingerido foi realizada estimulação com objeto macio nos órgãos genitais dos filhotes para promover a excreção de urina e fezes (Hall 1977).

Consumo alimentar pós-desmame

A fim de estabelecer um período de adaptação, os filhotes, com idade de 28 dias, foram alojados individualmente em gaiolas de policarbonato cristal transparente, autoclavável e resistente a ácidos, nas medidas de 30x20x19 por um período de uma semana para habituação. Após a habituação, o consumo alimentar durante três dias consecutivos foi determinado a cada 24h, às 8:00h, por meio da diferença entre a quantidade de dieta fornecida no início do ciclo claro e a quantidade de dieta restante no início do ciclo escuro. Também foi avaliado o consumo de alimentar (g) em razão do peso corporal (g).

5.6. Análises estatísticas

Os dados dos experimentos foram analisados através da análise de variância ANOVA 2 fatores, com medidas repetidas (MR). Os fatores considerados foram o dia (tempo) do experimento avaliado e o fator grupo experimental (que considera o gênero e tratamento). As comparações a posteriori foram realizadas com o teste de Bonferroni. Apenas os dados referentes ao teste de reflexos estão apresentados em mediana e intervalo interquartil, e analisados através da análise de variância Kruskal-Wallis com pós teste de Duncan. O nível de probabilidade foi estabelecido em igual ou menor que 5% ($p \leq 0.05$). A construção do banco de dados e as análises estatísticas foram desenvolvidas no programa Excel (versão 2007, Microsoft, USA) e Graphpad Prisma 5® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), respectivamente.

6. RESULTADOS

Os resultados permitiram a elaboração de um artigo original enviado para a revista *Nutrition Research*, que está descrito no apêndice.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento desta pesquisa permitiu as seguintes considerações a respeito do tema estudado:

- O sistema serotoninérgico tornou-se vulnerável a influências da inibição neonatal da recaptação de serotonina em ratos machos e fêmeas.
- O tratamento crônico com fluoxetina promoveu retardo na ontogênese de alguns reflexos, peso corporal e desenvolvimento somático, e esses efeitos provavelmente estão relacionados com alterações do desenvolvimento estrutural e funcional do sistema nervosa causado pelo aumento da disponibilidade serotoninérgica no período neonatal.
- O tratamento crônico com fluoxetina não promoveu alterações no comportamento alimentar, sugerindo que a diminuição de peso possa estar relacionada ao estado hipermetabólico desses animais.
- Alterações mais marcantes no retardo da ontogênese de reflexos, peso corporal e desenvolvimento somático foram observadas no gênero masculino, sugerindo uma resposta sexo-específica relativa à manipulação do sistema serotoninérgico, com maior vulnerabilidade dos machos no período neonatal.

Ao término deste trabalho, foram levantadas as seguintes perspectivas a serem investigadas em novos estudos que avaliem as diferenças entre machos e fêmeas:

- Analisar no período neonatal, o comprometimento das regiões encefálicas, causado pelo aumento da disponibilidade serotoninérgica no período neonatal, e relacionar com o retardo de reflexos.
- Analisar a expressão gênica do SERT no hipotálamo no período neonatal e adulto;
- Avaliar o comportamento de ansiedade e depressão nos animais adultos para fornecer mais informações sobre a influência da exposição neonatal a fluoxetina e os efeitos a longo prazo.
- Investigar o possível hipermetabolismo dos animais no período neonatal e adulto, através de calorimetria indireta (VO₂ max), temperatura retal e expressão de neuropeptídeos POMC.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-HAMID, M., ALLAM, A., HUSSEIN, M. Effect of ethanol administration during gestation on the cerebral cortex and spinal cord of albino rat newborns and on the development of their sensorimotor reflexes. *Egyptian Journal of Zoology*, v. 48, p. 137–162, 2007.
- ADELL, A.; CELADA, P.; ARTIGAS, F. The role of 5-HT_{1B} receptors in the regulation of serotonin cell firing and release in the rat brain. *J Neurochem*, v. 79, p.172–182, 2001.
- ADLARD, B.P.F.; DOBBING, J. Elevated acetylcholinesterase activity in adult rat brain after undernutrition in early life. *Brain Research*, v. 30, p.198-199, 1971.
- ALLAM, A. Effect of acrylamide on the development of nervous system in albino rat. PhD Thesis. Faculty of Science, Beni-Suef University, Egypt, 2008.
- ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour*, V. 23, p. 896-920, 1975.
- ANSORGE, M.S.; MORELLI, E.; GINGRICH, J. A. Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. *J Neurosci*, v.28, p.199-207, 2008.
- ANSORGE, M.S.; ZHOU, M.; LIRA, A.; HEN, R.; GINGRICH, J. A. Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science*, v.306, p.879-81, 2004.
- AUGER, C.J.; AUGER, A. P. Permanent and plastic epigenesis in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.*, v.34, p.190–197, 2013.
- AZMITIA, E. C. "Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue." *Neuropsychopharmacology*, v. 21, p. 33-45, 1999.
- AZMITIA, E. C. Modern view on an ancient chemical: serotonin effects on proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.*, v. 56, p. 414–424, 2001.
- AZMITIA, E. C. Serotonin and brain: Evolution, neuroplasticity, and homeostasis. *Int Rev Neur*, v. 77, p.31–56, 2007.
- AZMITIA, E. C.; WHITAKER-AZMITIA, P. M. Development and adult plasticity of serotonergic neurons and their target cells. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 129, p. 1-39, 1997.
- BARROS, K.M.F.T. Efeito da desnutrição neonatal e/ou do tratamento com agonista 5-HT_{1A} sobre o desenvolvimento sensorio-motor e atividade exploratória em ratos. Tese. Recife, 1999.

BATESON, P. P. G.; & GLUCKMAN, P. D. Plasticity, Robustness, Development and Evolution. Cambridge University Press, 2011.

BENOWITZ, L. I.; ROUTTENBERG, A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.*, v. 20, p. 84–91, 1997.

BERARDI, N., T. PIZZORUSSO, et al. "Critical periods during sensory development." *Curr Opin Neurobiol*, v. 10, p. 138-45, 2000.

BERG B, O. Child neurology: a clinical manual. 2nd ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company 1994; 1-26.

BERG, C.; BACKSTRÖM, T.; WINBERG, S.; LINDBERG, R.; BRANDT, I. Developmental Exposure to Fluoxetine Modulates the Serotonin System in Hypothalamus. *PLoS ONE*, v. 8, 2013.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. Fisiologia. 3ª.ed. Rio de Janeiro: Guanabara: 1993.P 93-96.

BLAKELY, R. D.; DE FELICE, L. J.; HARTZELL, H. C. "Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters." *J Exp Biol* , v. 196, p. 263-81, 1994.

BLUNDEL, J. E.; LATHAM, C. J. Characteristic adjustments to the structure of feeding behaviour following pharmacological treatments: effects of amphetamine and fenfluramine and the antagonism produced by pimozide and metergoline. *Pharmacol Biochem Behav.*, v. 12, p.717– 22, 1979.

BUZNIKOV, G.A., LAMBERT, H.W., LAUDER, J.M., Serotonin and Serotonin-Like Substances as Regulators of Early Embryogenesis and Morphogenesis, *Cell Tis. Res.*, v. 305, p. 177–186, 2001.

CAREY, R. J. Serotonin and Basal Sensory – Motor Control. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience*, v. 21, p. 325–330, 2010.

CASSIDY, G., BOUDRIAS, D., PFLIEGER, J., CABANA, T. The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Brain, Behavior and Evolution*, v. 43, p. 244– 253, 1994.

CASSIDY, G., PFLIEGER, J., CABANA, T. The ontogenesis of sensorimotor reflexes in the Mongolian gerbil *Meriones unguicatus*. *Behavioural Brain Research*, v. 52 , p. 143–151, 1992.

CAZALET JR, MENARD I, CREMIEUX J, CLARAC F. Variability as a characteristic of immature motor systems: an electromyographic study of swimming in the newborn rat. *Behav Brain Res*, v. 40, p.215-225, 1990.

CLARAC, F.; VINAY, L.; CAZALET, J.R.; FADY, J.C.; JAMON, M. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Res Brain Res Rev*, v. 28, n. 1-2, p. 35-43, 1998.

- CLANCY, B.; DARLINGTON, R.B.; FINLAY, B.L. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*. V. 105, n. 1, p. 7-17, 2001.
- CONNELL, S.; KARIKARI, C.; HOHMANN, C.F. Sex-specific development of cortical monoamine levels in mouse. *Brain Res Dev Brain Res.*, v. 151, p. 187-91, 2004.
- CSABA, G.; KNIPPEL, B.; KARABÉLYOS, C.; INCZEFI-GONDA, A.; HANTOS, M.; TEKES, K. Impact of single neonatal serotonin treatment (hormonal imprinting) on the brain serotonin content and sexual behavior of adult rats. *Life Sci.*, v. 73, p. 2703–2711, 2003.
- DALLA, C.; PITYCHOUTIS, P. M.; KOKRAS, N. Papadopoulou-Daifoti Z: Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, v.106, p.226–233, 2010.
- DARLING R. D.; ALZGHOUL L.; ZHANG J.; KHATRI N.; PAUL I. A.; SIMPSON K. L.; et al. Perinatal citalopram exposure selectively increases locus ceruleus circuit function in male rats. *J. Neurosci.*, v.31, p.16709–16715, 2011.
- DEIRÓ, T. C. B. J.; CARVALHO, J.; NASCIMENTO, E.; MEDEIROS, J. M. B.; CAJUHI, F. et al. Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 66, p. 736-740, 2008.
- DEIRÓ, T. C. B. J.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CABRAL-FILHO, J. E.; BARRETO-MEDEIROS, J. M.; SOUZA, S. ET AL. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiology & Behavior*, v. 87, p. 338–344, 2006.
- DEL-BEN, C. M. Neurobiologia do transtorno de personalidade anti-social. *Rev. psiquiatr. clín.*, v. 32, n. 1, p. 27-36, 2005 .
- DENNIS, R. L.; FAHEY, A. G.; CHENG, H. W. Alterations to Embryonic Serotonin Change Aggression and Fearfulness. *Aggr. Behav.*, v. 39, p. 91–98, 2013.
- DOLY, S.; MADEIRA, A.; FISCHER, J.; BRISORGUEIL, M. J.; DAVAL, J. et al. The 5-HT_{2A} receptor is widely distributed in the rat spinal cord and mainly localized at the plasma membrane of postsynaptic receptors. *J. Comp. Neurol.*, v. 472, p. 496 – 511, 2004.
- DRYDEN, S.; FRANKISH, H.M.; WANG, Q.; WILLIAMS, G. Increased feeding and neuropeptide y (npy) but not npy mrna levels in the hypothalamus of the rat following central administration of the serotonin synthesis inhibitor p-chlorophenylalanine. *Brain Res.*, v. 17; n. 724, p. 232-7.
- FOX, H. T.; FRENCH, J. L.; LAPORTE, A. R.; BLACKLER, D. L. Murphy The serotonin 5-HT_{2A} receptor agonist TCB-2: a behavioral and neurophysiological analysis. *Psychopharmacology*, v. 212, p. 13-23, 2010.
- FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Anim Behav.*, v. 13, p. 234–241, 1965.

- GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci.*, v.;4, p.1002-12, 2003.
- GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S. As bases farmacológicas da terapêutica. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1987.
- GOEL, N.; BALE, T.L. Examining the intersection of sex and stress in modelling neuropsychiatric disorders. *J Neuroendocrinol.*, v.21, p.415-20, 2009.
- GRAMSBERGEN, A. Posture and locomotion in the rat: independent or interdependent development? *Neurosci Biobehav Rev*, v. 22, p. 547-53, 1998.
- GRILLNER S. Control of locomotion in bipeds, tetrapods, and fish. In: *Handbook of physiology. The nervous system II*, p. 1179–1236, 1981.
- HEAL, D. J.; SMITH, S. L.; FISAS, A.; CODONY, X.; BUSCHMANN, H. Selective 5-HT₆ receptor ligands: progress in the development of a novel pharmacological approach to the treatment of obesity and related metabolic disorders. *Pharmacol Ther*, v. 117, p. 207–31, 2008.
- HEISLER, L. K.; JOBST, E. E.; SUTTON, G. M.; ZHOU, L.; BOROK, E. et al. Serotonin Reciprocally Regulates Melanocortin Neurons to Modulate Food Intake. *Neuron.*, v. 51, p. 239–249, 2006.
- HENSLER, J. G. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev*, v.30, p. 203-14, 2006.
- HOHMANN, C. F.; WALKER, E. M.; BOYLAN, C. B.; BLUE, M. E. Neonatal serotonin depletion alters behavioral responses to spatial change and novelty. *Brain Res.*, v. 1139, p.163–177, 2007.
- HOYER, D.; CLARKE, D.E.; FOZARD, J.R.; HARTIG, P.R.; MARTIN, G.R.; MYLECHARANE, E.J.; SAXENA, P.R.; HUMPHREY, P.A. International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.*, v. 46, p. 157-203, 1994.
- HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 71, p. 533–554, 2002.
- HUIZINK, A.C.; MULDER, E.J.; BUITELAAR, J.K. Prenatal stress and risk for psychopathology: Specific effects or induction of general susceptibility? *Psychol Bull.*, v. 130, p.115-42, 2004.
- JACOBSON, M. Development specification and diversification of neuronal connection. In: Schmitt, F.O. (Ed.), *The Neurosciences: Second Study Program*. The Rockefeller Univ. Press, New York, 1970.
- KARPOVA, N. N.; LINDHOLM, J.; PRUUNSILD, P.; TIMMUSK, T.; CASTREN, E. Long-lasting behavioural and molecular alterations induced by early postnatal

fluoxetine exposure are restored by chronic fluoxetine treatment in adult mice. *Eur Neuropsychopharmacol*, v.19, p. 97-108, 2009.

KESTERSON, K. L., R. D. LANE, R. D.; RHOADES, R. W. "Effects of elevated serotonin levels on patterns of GAP-43 expression during barrel development in rat somatosensory cortex." *Brain Res Dev Brain Res*, v. 139, p. 167-74, 2002.

KINAST, K.; PEETERS, D.; KOLK, S. M.; SCHUBERT, D.; HOMBERG, J. R. Genetic and pharmacological manipulations of the serotonergic system in early life: neurodevelopmental underpinnings of autism-related behavior. *Front Cell Neurosci.*, v.7, p.72, 2013.

KOLB B; GIBB R. Brain plasticity and behaviour in the developing brain. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*, v. 20, p. 265-276, 2011.

LAM, D. D.; GARFIELD, A. S.; MARSTON, O. J.; SHAW, J.; HEISLER, L. K. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 97, p. 84–91, 2010.

LAUTENSCHLAGER, M.; HÖLTJE, M.; VON JAGOW, B.; VEH, R. W.; HARMS, C., et al. "Serotonin uptake and release mechanisms in developing cultures of rat embryonic raphe neurons: age- and region-specific differences." *Neuroscience*, v. 99, p. 519-27, 2000.

LAUZURICA, N.; GARCÍA-GARCÍA, L.; FUENTES, J. A.; DELGADO, M. Hypophagia and induction of serotonin transporter gene expression in raphe nuclei of male and female rats. *J Physiol Biochem*, v. 69, p. 69-74, 2013.

LEE, L. J.; LEE, L. J. Neonatal fluoxetine exposure alters motor performances of adolescent rats. *Dev Neurobiol.*, v.72, p.1122-32, 2012.

LEIBOWITZ, S. F.; ALEXANDER, J. T. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol Psychiatry.*, v. 44, p. 851-64, 1998.

LIPTON, S. A.; KATER, S. B. Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends in Neurosciences*, v. 12, p. 265–270, 1989.

LISBOA, S. F.; OLIVEIRA, P. E.; COSTA, L. C.; VENANCIO, E. J.; MOREIRA, E. G. Behavioral evaluation of male and female mice pups exposed to fluoxetine during pregnancy and lactation. *Pharmacology*, v.80, p. 49-56, 2007.

MASGUTOVA, G., SAVCHENKO, E., VIKTOROV, I., MASGUTOV, R., CHELYSHEV, Y. Reaction of oligoglia to spinal cord injury in rats and transplantation of human olfactory ensheathing cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 149, p. 135–139, 2010.

MCCARTHY, M.M.; AUGER, A.P.; BALE, T.L.; DE VRIES, G.J.; DUNN, G.A.; FORGER, N.G.; MURRAY, E.K.; NUGENT, B.M.; SCHWARZ, J.M.; WILSON, M.E. The epigenetics of sex differences in the brain. *J Neurosci.*, v.29, p.12815–12823, 2009.

MCEWEN, M.L.; VAN HARTESVELDT, C.; STEHOUWER, D.J. L-DOPA and quipazine elicit air-stepping in neonatal rats with spinal cord transections. *Beh Neurosci.* V. 111, p. 825–33, 1997.

MORGAN, C.P.; BALE, T.L. Early prenatal stress epigenetically programs dysmasculinization in second-generation offspring via the paternal lineage. *J Neurosci.*, v.31, p.11748–11755, 2011.

MORGANE J. P.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 26, p. 471-83, 2002.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.J.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZ CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Behav. Rev.*, v. 17, p. 91-128, 1993.

MORTON, G. J.; CUMMINGS, D. E.; BASKIN, D. G.; BARSH, G. S.; SCHWARTZ, M. W. Central Nervous System Control Of Food Intake And Body Weight. *Nature.*, v. 443, P. 289-95, 2006.

MUELLER, B.R.; BALE, T.L. Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in

NICHOLLS, J., MARTIN, A., WALLACE, B. From Neuron to Brain, 3rd ed. Sinauer Associates Inc., Massachusettes, 1992.

NICULESCU, M. D.; HAGGARTY, P. Nutrition in epigenetics. Wiley-Blackwell, 2011.

NIELSEN, K.; BRASK, D.; KNUDSEN, G. M.; AZNAR, S. "Immunodetection of the serotonin transporter protein is a more valid marker for serotonergic fibers than serotonin." *Synapse*, v. 59, p. 270-6, 2006.

NORMANN, C.; CLARK, C. Selective modulation of Ca(2+) influx pathways by 5-HT regulates synaptic long-term plasticity in the hippocampus. *Brain Res.*, v. 1037, p. 187-193, 2005.

OBERLANDER, T. F.; PAPSDORF, M.; BRAIN, U. M.; MISRI, S.; ROSS, C.; GRUNAU, R. E. Prenatal effects of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants, serotonin transporter promoter genotype (SLC6A4), and maternal mood on child behavior at 3 years of age. *Arch Pediatr Adolesc Med*, v.164, p.444-51, 2010.

OBERLANDER, T. F.; GINGRICH, J. A.; ANSORGE, M. S. Sustained neurobehavioral effects of exposure to SSRI antidepressants during development: molecular to clinical evidence. *Clin Pharmacol Ther*, v.86, p.672-7, 2009.

OLIVIER, J. D.; VALLES, A.; VAN HEESCH, F. et al. Fluoxetine administration to pregnant rats increases anxiety-related behavior in the offspring. *Psychopharmacology*, v. 217, p. 419-32, 2011.

PERILLAN, C; COSTALES, M; VIJANDE, M; ARGUELLES, J. Maternal RAS influence on the ontogeny of thirst. *Physiol Behav*, v. 92, n. 2007, p. 554-59, 2007.

POPA, D.; LENA, C.; ALEXANDRE, C.; ADRIEN, J. Lasting syndrome of depression produced by reduction in serotonin uptake during postnatal development: evidence from sleep, stress, and behavior. *J Neurosci*, v. 28, p.3546-54, 2008.

RAYMOND, J. R.; MUKHIN, Y. V.; GELASCO, A.; TURNER, J.; COLLINSWORTH, G. et al. "Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction." *Pharmacol Ther*, v. 92, p. 179-212, 2001.

RENTESI, G.; ANTONIOU, K.; MARSELOS, M.; SYRROU, M.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z.; KONSTANDI, M. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behavioural Brain Research*, v. 244, p. 29–37, 2013.

RICE, D.; BARONE, S. J. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Human and Animal Models. *Environmental Health Perspective*, v. 108, p. 511–533, 2000.

SANDMAN, C. A.; GLYNN, L. M.; DAVIS, E. P. Is there a viability-vulnerability tradeoff? Sex differences in fetal programming. *J Psychosom Res.*, v. 75, p. 327-35, 2013.

SCHMITT, A.; BENNINGHOFF, J.; MOESSNER, R.; RIZZI, M.; PAIZANIS, E. et al. "Adult neurogenesis in serotonin transporter deficient mice." *J Neural Transm*, v. 114, p. 1107-19, 2007.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D. JR.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature*, v. 404, p. 661-71, 2000.

SILVA, C. M.; GONÇALVES, L.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; NOGUEIRA, M. I. Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. *Neuroscience Letters*, v. 483, p. 179–183, 2010.

SILVA, H. J.; MARINHO, S. M. O. C.; TOSCANO, A. E.; ALBUQUERQUE, C. G.; MORAES, S. R. A.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. Protocol of mensuration to avaliation of indicators of somatic development of Wistar rats. *Int J Morphol*, v.23, p. 227-30, 2005.

SIMPSON, K. A.; MARTIN, N. M.; BLOOM, S. R. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metab.*, v. 53, p. 120-28, 2009.

SIMPSON, K.L.; WEAVER, K. J.; DE VILLERS-SIDANI, E.; LU, J. Y.; CAI, Z.; PANG, Y.; RODRIGUEZ-PORCEL, F.; PAUL, I. A.; MERZENICH, M.; LIN, R. C. Perinatal antidepressant exposure alters cortical network function in rodents. *Proc Natl Acad Sci*, v.108, p.18465-70, 2011.

SINGH, M.; SINGH, K. P. In Utero Exposure of Venlafaxine: Impact on Maternal, Fetal, Neonatal Weight and Postnatal Growth in Rat Offspring. *National Academy Science Letters*, v. 36, p. 35-40, 2013.

SLIWOWSKA, J.H.; SONG, H.J.; BODNAR, T. et al. Prenatal alcohol exposure results in long-term serotonin neuron deficits in female rats: modulatory role of ovarian steroids. *Alcohol Clin Exp Re.*, v.38, p.152-60, 2014.

SLOTKIN, T.A.; MACKILLOP, E.A.; RUDDER, C.L.; et al. Permanent, sex-selective effects of prenatal or adolescent nicotine exposure, separately or sequentially, in rat brain regions: indices of cholinergic and serotonergic synaptic function, cell signaling, and neural cell number and size at 6 months of age. *Neuropsychopharmacology*, v.32, p.1082-97, 2007.

SMART, J. L, DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II: Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Res*, v. 28, p. 85–95, 1971.

SOUZA, S. L.; NOGUEIRA, M. I.; DEIRÓ, T. C. B. J.; MANHAES-DE- CASTRO, F. M.; SILVA, C. M. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. *Physiology & Behavior*, v. 82, p. 375–379, 2004.

SPINKS, D.; SPINKS, G. Serotonin reuptake inhibition: an update on current research strategies. *Curr. Med. Chem*, v.9, p. 799 – 810, 2002.

SWERDLOW, N., MARK, A. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, v. 24, p. 285–301, 1998.

UÇEYLER, N.; SCHÜTT, M.; PALM, F.; VOGEL, C.; MEIER, M.; SCHMITT, A.; LESCH, K. P.; MÖSSNER, R.; SOMMER, C. Lack of the serotonin transporter in mice reduces locomotor activity and leads to gender-dependent late onset obesity. *Int. J. Obes.*, v. 34, p.701–711, 2010.

UPTON, A. L., P. M. CORDERY, P. M.; THOMPSON, I. D. "Emergence of topography in the developing hamster retinocollicular projection: axial differences and the role of cell death." *Eur J Neurosci*, v. 25, p. 2319-28, 2007.

VAN DEN HOVE, D. L.; LEIBOLD, N.K.; STRACKX, E., et al. Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress in rats; interdependent effects on emotional

behavior and the serotonergic system. *Eur Neuropsychopharmacol.*, v.24, p.595-607, 2014.

VINAY, L.; BROCARD, F.; CLARAC, F. Differential maturation of motoneurons innervating ankle flexor and extensor muscles in the neonatal rat. *Eur J Neurosci*, v. 12, p. 4562-6, 2000.

WALDINGER, M. D. Lifelong premature ejaculation: definition serotonergic neurotransmission and drug treatment. *World J. Urol.*, v. 23, p. 102-108, 2005.

WALTHER, D. J.; BADER, M. "Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells." *Brain Res Mol Brain Res.*, v. 68, p. 55-63, 1999.

WARD, S. J.; LEFEVER, T. W.; JACKSON, C.; TALLARIDA, R. J.; WALKER, E. A. Effects of a Cannabinoid1 receptor antagonist and Serotonin2C receptor agonist alone and in combination on motivation for palatable food: a dose-addition analysis study in mice. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 325, p. 567-76, 2008.

WEISS, G. F.; ROGACKI, N.; FUEG, A.; BUCHEN, D.; LEIBOWITZ, S. F. Impact of hypothalamic d-norfenfluramine and peripheral d-fenfluramine injection on macronutrient intake in the rat. *Brain Res Bull*, v. 25, p. 849-59, 1990.

WEISSMANN, D., BELIN, M. F., AGUERA, M., MEUNIER, C., MAITRE, M. et al. Immuno- histochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *Neuroscience*, v. 23, p. 291-304, 1987.

WELLS, J. C. 2000. Natural selection and sex differences in morbidity and mortality in early life. *J Theor. Biol.* 202, 65-76.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic Plasticity And The Origins Of Diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v. 20, p. 249-78, 1989.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. "Serotonin and brain development: role in human developmental diseases." *Brain Res Bull*, v. 56, p. 479-85, 2001.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. "The discovery of serotonin and its role in neuroscience." *Neuropsychopharmacology*, v. 21, p. 2-8, 1999.

WHITE, L. E.; D. FITZPATRICK. "Vision and cortical map development." *Neuron* 56(2): 327-38.

ZEHR, E., STEIN, R. What functions do reflexes serve during human locomotion. *Progress in Neurobiology*, v. 58, p. 185-205, 1999.

ZHANG, J.; DENNIS, K. A.; DARLING, R. D.; ALZGHOUL, L.; PAUL, I. A.; SIMPSON, K. L.; LIN, R. C. Neonatal citalopram exposure decreases serotonergic fiber density in the olfactory bulb of male but not female adult rats. *Front Cell Neurosci.*, v. 7, p.67, 2013.

APÊNDICE (Artigo original)

Title: Sex-specific effects of plasticity by inhibiting serotonin reuptake on the ontogeny of reflexes, somatic development and feeding behavior.

Autores: Raquel de Medeiros Maia Campos ¹, Ana Elisa Toscano ², José Eulálio Cabral Filho³, Bárbara Juacy Rodrigues Costa de Santana⁴, Laryssa Karla Maranhão de Almeida⁴, Ana Paula Souza Silva⁴, Tereza Cristina Bomfim de Jesus Deiró⁵, Sandra Lopes de Souza⁶, Raul Manhães de Castro⁷.

Degree:

¹ Student of the Master Program in Nutrition. Federal University of Pernambuco.

^{2,5} Doctor in Nutrition. Federal University of Pernambuco.

³ Doctor in Pharmacology. Federal University of Sao Paulo.

⁴ Scientific Initiation students. Federal University of Pernambuco.

⁶ Doctor in Morphofunctional Sciences. University of São Paulo.

⁷ Doctor in Science. Université de Paris VI (Pierre et Marie Curie)

Institutional affiliation:

^{1,7} Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

² Departament of Nursing - Academic Center of Vitória, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE - Brazil

³ - Departament of teaching and research - Integrative Medicine Institute- Professor Fernando Figueira. Recife, Pernambuco, Brazil.

⁵ - Federal University of Bahia, School of Nutrition, Department of Nutrition Sciences.

⁶Departament of Anatomy, Life Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Mailing address:

Author: Raul Manhães de Castro. Email: raulmanhaesdecastro@gmail.com

Address: Avenida da Engenharia, s / n – Cidade Universitária, PE. CEP: 50740-600.

Phone: 55(81) 2126-8530

ABSTRACT

Serotonin (5HT) acts as a neuromodulator widely distributed in the central nervous system and plays a critical role in the regulation of brain development. Changes in 5-HT signaling by serotonin reuptake inhibitors exposure during the perinatal period can affect neural development and may result in behavioral changes in adulthood. Further investigations are necessary including both sexes to study these effects. Thus, the aim of this study was to investigate the impact of neonatal treatment with fluoxetine on the ontogeny of reflexes, somatic development and food intake in male and female rats. The animals were formed by four groups according to gender (male or female) and treatment (fluoxetine or saline). Animals in the fluoxetine group received fluoxetine at 1µl/g on 1^o to 21 postnatal day and the animals that were part of the saline group received saline 0.9% 1µl/g. In the neonatal period (1-21 days) were recorded: reflex ontogeny, somatic development, physical characteristics and food intake during lactation. In the postnatal period (22-31 days) were recorded: body weight and post-weaning food intake. Despite the chronic administration of fluoxetine in the neonatal period did not cause changes in food intake, it causes delay in the reflex ontogeny, lower weight gain and somatic development and most striking in males. In summary, these findings suggest a sex-specific response on the manipulation of the serotonergic system. These changes confirm that serotonin plays an important role in regulating the plasticity of the nervous system during development period, differently from males and females.

Keywords: Serotonin; plasticity; fluoxetine; reflexes; somatic development; feeding behavior; sex differences.

1. Introduction

Serotonin (5HT) is a widely distributed neuromodulator that plays an important role in regulating brain development [1]. Disturbances of the serotonergic system during pre- and post-natal development have the potential to greatly impact neural development and may result in persistent behavioral abnormalities, such as increased anxiety and depressive behaviors [2-5]. Behavioral changes, including sleep patterns, increased helplessness, increased locomotor activity, enhanced response to stress and decreased sexual behavior, have been seen in rodents with disruption to the serotonin pathway [2, 6-8]. Excess 5-HT during embryonic and early development has been shown to cause autism-like behaviors in rodents [9,10]. These changes occur through alteration of key processes of the neurodevelopment that are modulated by 5-HT [11,12]. The vulnerability of nervous system depends of the action of an agent or its active metabolite and the exposure period which is associated with critical events related to cellular proliferation, migration, differentiation, synaptogenesis, myelination and apoptosis [13].

Postnatal environment is critical to proper development of neurophysiological function. The formation and fine tuning of neural circuits during early life require adequate sensory guidance, and conditions providing excessive or insufficient levels of stimulation can disorder system development and compromise their subsequent performance throughout life [14]. Early postnatal stress can lead to lifelong changes in numerous behavioral domains as well as stress reactivity, and these alterations are thought to involve epigenetic regulation [15]. In this context, the modulation of the serotonergic system by increasing the availability of serotonin into the synaptic cleft have been studied. Pharmacological blocking of SERT (serotonin-transporter) during

the prenatal period [16,17] or the early postnatal period [2,4,17] has been shown to induce long-term anxiety-like and depressive-like phenotypes.

Manipulation of nervous system during early stages of neurodevelopment has been shown to produce sex-specific neurobehavioral modifications that persist well into adulthood [18-20]. In this regard, human epidemiologic studies on intrauterine growth retardation highlight poor neurodevelopment and (neuro-)endocrine dysfunction to manifest less severely in females than in males [21,22]. There is converging evidence that male animals are behaviorally more susceptible to prenatal and early life stress than females [23-25], whereas females are more susceptible to stress after puberty [26].

One of the ways to evaluate the effects of serotonergic modulation is by evaluating the ontogeny of reflexes. Reflexes are stereotyped responses in the central nervous system through internal or external stimuli [27] as indicating the development of the nervous system, as featuring the simultaneous occurrence of various CNS development of events that follow a predetermined sequence according to the age of the animal [28,29]. Eating behavior can also be changed due influence of serotonin, which diffusely innervate the reflex centers of the brain stem and integrated hypothalamic centers involved in the control of food intake [30].

Despite the important finding that exposure to stress in the neonatal period can lead to long-term consequences, studies are scarce concerning the effects of early use of an SSRI, considering the differences in these variables between male and female rats. Thus, this study aims to investigate the effects of treatment with selective serotonin reuptake inhibitor, on the ontogeny of reflexes, somatic development and food intake in newborn rats males and females. Our hypothesis is that chronic exposure to fluoxetine in the neonatal period cause delay in the ontogeny of reflexes, somatic development and decrease in feeding behavior, with greater vulnerability in males.

2. Material and methods

2.1 Animals

Wistar rats (*Rattus norvegicus*) aged 0–150 days from the Department of Nutrition, University Federal de Pernambuco, Brazil, were used. Virgin female rats weighing 200–280 g were obtained and maintained in a laboratory with an inverted light/dark cycle of 12 h (lights on at 18:00) for a 15-day adaptation period, with water and standard diet (Purina do Brasil S/A) ad libitum. After the adaptation period, the rats were housed at two females per male for mating. The day of birth of each litter was considered day 0.

Seventy one rats, from nine litters, thirty four males and thirty seven females, were randomly selected. On day 1, litters were reduced to 8 pups per mother, weighing between 5-8g each, ensuring four males and four females per litter when possible, and they were kept with their dams until the 21st day of postnatal life. After weaning the pups were placed in individual polycarbonate crystal cages (30x20x19), under the same vivarium standards conditions by the end of the trial period.

Each litter was designed by four experimental groups in accordance with gender (male or female) and treatment (saline or fluoxetine): Saline Males (SM, n = 16); Fluoxetine Males (FM, n = 18); Saline Females (FS, n = 19) and Fluoxetine Females (FF, n = 18). A selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), fluoxetine (Sigma), was used to handle the serotonergic system. Animals in the fluoxetine group used fluoxetine at 1µl/g, subcutaneous, from 1st to 21st postnatal day. The drug was obtained as fluoxetine hydrochloride and dissolved in vehicle control, a saline solution (NaCl) 0.9%. The animals in saline group were treated daily with saline 0.9%, 1µl/g body weight, subcutaneous, from 1st to 21st postnatal day.

The experimental protocol was approved by the Ethical Committee of the Biological Sciences Center (protocol no. 23076.043932/2013), Federal University of Pernambuco, Brazil.

2.2 Reflex Testing

Daily examinations evaluating a spectrum of reflexologic tests (Table 1) [28] as indicators of neurologic development were conducted from the first to the 21st postnatal days. Reflex tests were conducted between 11.00 and 13.00 h. The time of the appearance of each reflex was defined as the first day of its occurrence during a period of three consecutive days.

Table 1. Description of Reflex Test

<i>Reflex</i>	<i>Stimulus</i>	<i>Response</i>
Palmar grasp	A blunt instrument is stroked in the forepaw and fingers are flexed to grasp the instrument.	Fingers flexed to grasp the instrument.
Righting	Rat is placed on its supine position.	Turns over to rest in the normal position (prone) with all four feet on the ground in 10s.
Free-fall righting (acceleration righting)	Rat held by the paws, back downwards, is dropped from 30 cm on a cotton wool pad.	Turns body in mid-air, to land on all fours. All legs must be free of body on landing.
Negative-geotaxis	Rat placed with head downwards, on a 45° slope.	Turns to face up the slope, at least 130°, in 10 s.
Cliff-avoidance	Rat put on edge of bench, with nose and forefeet just over edge.	Withdrawal of head and both forefeet from edge, moving away from "cliff" in 10s
Auditory-startle response	Sudden sound stimulus by percussion with a metallic stick in a metal surface.	Body retraction, with a transitory immobility. The stimulus was given twice in each test, with an interval of 1 min.
Vibrissa-placing	Rat held by the tail, head facing an edge of bench, vibrissa just touching vertical surface.	Lifts head and extends forepaws in direction of the bench, making oriented "walking" movements to go far from the edge, in 10 s.
Bar Holding	Rat is held gently by the trunk and allowed to cling to a horizontal thin bar with its forepaws, remaining suspended.	The length of time it holds on is recorded up to a maximum of 10s.
Hindlimb grasp	The paw is stroked with a blunt toothpick.	Fingers flexed to grasp the instrument.

2.3 Physical feature maturation and somatic growth of the offspring

The features were evaluated daily between 1.00 pm and 3.00 pm by the method of Smart and Dobbing (1971) during the suckling period, until maturation. The maturation age of a particular feature was defined as the day it was first observed. The day of the internal auditory conduit opening of both ears and eyes (i.e., when any visible break in the covering membrane of both eyes), and the eruption of the upper and lower incisors were recorded. Tail length (distance from tail tip to tail base), length of the laterolateral axis (distance between the ear holes) and length of the anteroposterior axis of the head (distance between snout and head-neck articulation) were measured with a digital caliper (Starrett®, Series 799, São Paulo, Brazil) with 0.01-mm precision.

2.4 Measurement of body weight and food intake

The body weight of each pup was recorded daily from day 1 until 31 with a digital scale (Mars, S-100, 0.01g sensitivity model).

2.4.1 Lactation food intake

Assessment of lactation food intake was performed at 13:00h on days 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21, according to an adapted protocol described by Perillan et al. (2007), which consists of four steps: A) deprivation: Each pup were separated from their dam during two hours and shavings allocated in containers under heating with the aid of a light (IR) 25-W. B) Weight: Pups were weighed with a precision scale before and after the withdrawal. C) Milk intake: Neonates were relocated from their dams for an hour and then reweighed. D) Calculation of ingestion: Body weight gain (g) was used as the

measurement of milk intake. To ensure greater reliability in the quantification of milk intake, a stimulation with soft object in the genitals of the puppies was performed to promote the excretion of urine and feces (Hall 1977).

2.4.2 Post-weaning food intake

In order to establish an adaptation period, pups on day 21 were housed individually. After 7 days of habituation, food intake for three consecutive days was determined by the difference between the amount of food provided at the onset of the dark cycle (06.00 h) and the amount of food remaining 24h later.

2.5 Data Analysis

Results are expressed as means $\pm$ S.E.M, and were analyzed by ANOVA 2 factors with repeated measures (RM). The factors considered were the day (time) of the evaluated experiment and the experimental group factor (which considers gender and treatment). The subsequent comparisons were performed by the Bonferroni test. Only the data of test reflexes are presented as median and interquartile range and analyzed by Kruskal-Wallis analysis of variance with post Duncan test. The probability level was set at equal to or less than 5% ($p\leq 0.05$). The construction of the database and analyzes statistics were developed in Excel (version 2007, Microsoft, USA) and Graphpad Prism 5® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1 Reflex Test

Time of appearance of each reflex evaluated occurred on different days during the lactation period: the righting reflex was the first to appear, followed by vibrissae placing and cliff aversion, which have not changed between the groups analyzed. The other reflexes which appeared later, around the 12th day, were those who had significant variation between the saline group and fluoxetine group. It was observed that the Fluoxetine Males (FM) when compared to Saline Males (SM) group, had delay on the onset of negative geotaxia reflexes (13.5, 10.5 vs 13-14, 9-11, $p < 0.001$) free fall righting (13, 13-14 vs 10.5, 10-12; $p < 0.001$), bar holding (15, 14-16 vs 12, 11.5-12; $p < 0.001$) and hindlimb grasp (14.5, 14-16 vs. 12, 11-12; $p < 0.01$) while Fluoxetine females (FF) when compared to females saline (FS) had also delay on the appearance of these same reflexes, except the hindlimb grasp reflex, with negative geotaxia (13, 12-14 vs 10, 9 to 10.5; $p < 0.001$) free fall righting (13, 12-14 vs. 11, 10-12; $p < 0.01$) bar holding (15, 14-16 vs 12 11.5 to 13; $p < 0.01$). There was no influence of gender between groups that used the same treatment ($p > 0.05$, SM vs SF or FF vs FM).

Table 2. Time of reflex appearance during the neonatal period.

Reflex	Fluoxetine Males (FM, n=18)			Saline Males (SM, n= 16)			Fluoxetine Females (FF, n=18)			Saline Females (SF, n=19)		
	Median	Percentile 25%	Percentile 75%	Median	Percentile 25%	Percentile 75%	Median	Percentile 25%	Percentile 75%	Median	Percentile 25%	Percentile 75%
Palmar grasp	4	3	5	4	2,5	4	4	3	5	4	3	4
Righting	4	4	5	3	3	5	4	3	4	4	3,5	5
Free-fall righting (acceleration righting)	5	4	5	5	4	6	5	4	6	5	4,5	5,5
Negative-geotaxis	7	6	9	6	4,5	7	6	5	8	6	6	7
Cliff-avoidance	13,5 ^a	13	14	10,5 ^a	9	11	13 ^c	12	14	10 ^c	9	10,5
Auditory-startle response	12	12	12	11,5 ^a	11	12	11	11	12	11	11	11,5
Vibrissa-placing	13 ^a	13	14	10,5 ^a	10	12	13 ^d	12	14	11 ^d	10	12
Bar Holding	15 ^a	14	16	12 ^a	11,5	12	15 ^e	14	16	12 ^e	11,5	13
Hindlimb grasp	14,5 ^b	14	16	12 ^b	11	12	13,5	11	14	11,5	11	13,5

^a P <0.001, ^bP <0.01, ^cP <0.001, ^dP <0.01, ^eP<0,05. Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's Test was used. (.) It was considered the day of the reflex disappearance. Data are presented as median and interquartil range.

3.2 Somatic development and physical characteristics assessment

In all parameters measured, the Fluoxetine Males (FM) when compared to group Saline Males (SM) group, showed a decrease of size ($p < 0.05$) (Figures 1A, 1B, 1C and 1D), and the skull lateral-lateral axis and skull anteriorposterior axis, from the 12th to 21st day (Figures 1A and 1B), while the Fluoxetine females (FF) as compared to Saline Females (SF) group, decreased skull lateral-lateral axis only at the last day ($p < 0.05$) and had no significant difference in the skull anterior-posterior axis ($p > 0.05$) (Figures 1A and 1B).

Regarding tail length and longitudinal length measures, Fluoxetine Males (FM), when compared to Salina males (SM) decreased these parameters from the 12th to the

21st day (Figures 1C and 1D), while Fluoxetine females (FF) as compared with females Salina (SF), decreased these measures only in 18 and 21 days ($p < 0.05$) (Figures 1C and 1D). No difference were found for the measures evaluated between the groups that used the same treatment ($p > 0.05$, SM vs SF or FM vs FF).

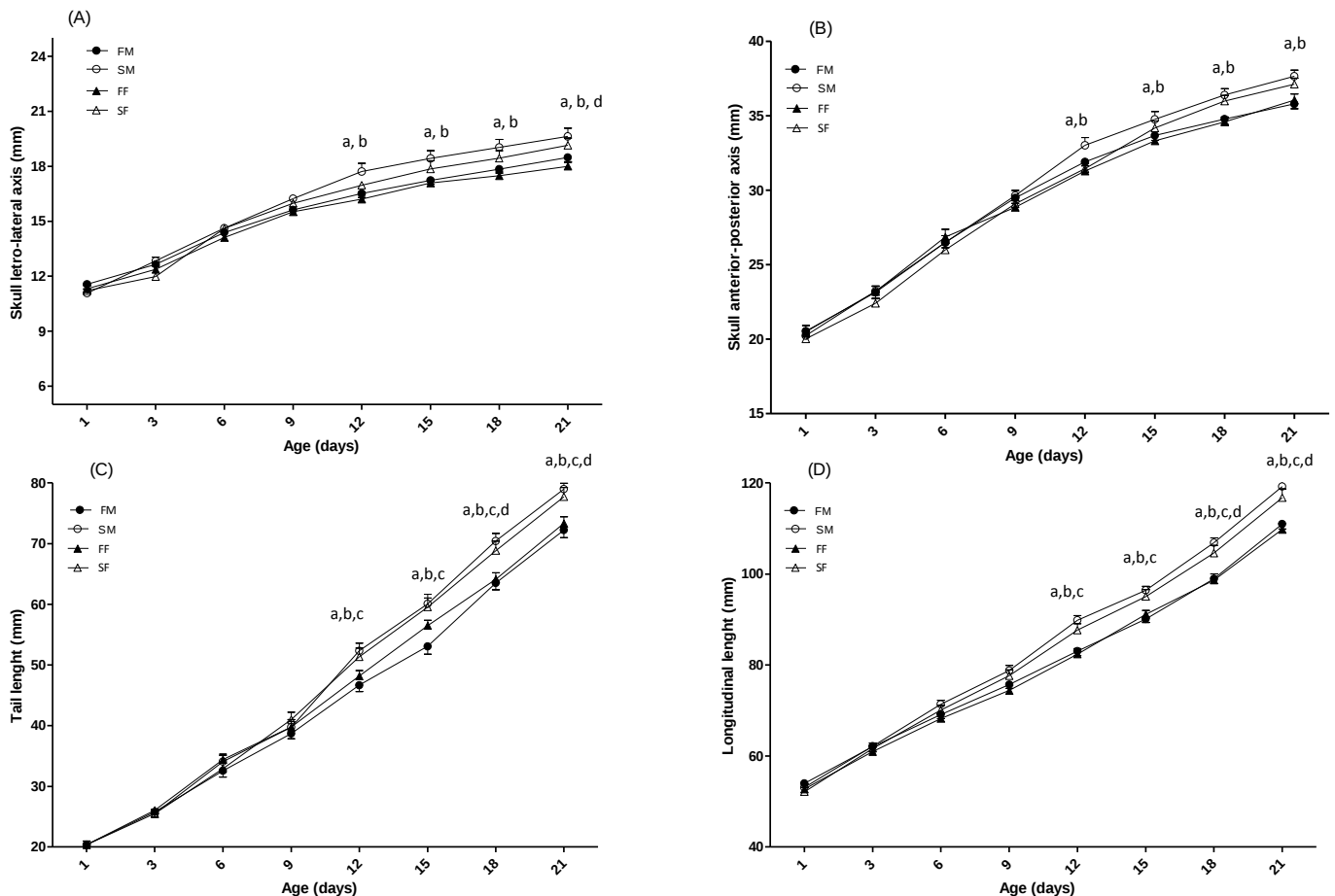


Figure 1. Somatic development measures during lactation. Puppies according to gender and treatment used: Fluoxetine Males - FM (n=18), Saline Males-SM (n=16), Fluoxetine Females-FF (n=18), Saline Females-SF (n=19). Data were presented as mean and standard error. ^a $P < 0.05$ MS vs MF; ^b $P < 0.05$ MS vs FF; ^c $P < 0.05$ FS vs MF; ^d $P < 0.05$ FS vs FF. (A) Skull latero-lateral axis, (B) Skull anterior-posterior axis, (C) Tail length, (D) Longitudinal length. Anova two-way repeated measures following by Bonferoni test was used.

Analyzing the physical features maturation, any difference was found ($p > 0.05$, Kruskal Wallis test) between groups (Table 3).

Table 3. Day of physical features maturation during the neonatal period.

Physical features maturation	Fluoxetine Males (FM, n=18)			Saline Males (SM, n= 16)			Fluoxetine Females (FF, n=18)			Saline Females (SF, n=19)		
	Median	Percentile 25%	Percentile 75%	Median	Percentile 25%	Percentile 75%	Median	Percentile 25%	Percentile 75%	Median	Percentile 25%	Percentile 75%
Ear pavilion oppening	2,5	2	3	2,5	2	3	2,5	2	3	2,5	2	3
Lower incisors eruption	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Upper incisors eruption	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Auditory conduit opening	12	12	12	11,5	11	12	11	11	12	11	11	11,5
Eyes oppening	13,5	13	14	13	13	13	13	13	13	13,5	13	14

* P <0.05. Kruskal-Wallis test was used. Data are presented as median and interquartil range.

3.3 Body weight and food intake

Overall, the fluoxetine groups decreased ($p < 0.05$) body weight during lactation and post-weaning periods. Fluoxetine Males (FM) when compared Saline Males (SM) showed reduction in daily neonatal body weight from 10th to the 21st day, while Fluoxetine females (FF) as compared to Saline females (SF) had reduced daily neonatal body weight from 13th to 21st day (Figure 2A). In the post-weaning period, it was observed that Fluoxetine Males (FM), had reduced daily body weights of 22 to the 31st day when compared to Salina Males (SM) while Fluoxetine females (FF) as compared Salina Females (FS) had reduced daily body weights from 28 to 31st day (Figure 2B). About animals that received the same treatment, the Saline Females (SF) compared to Salina Males (SM), had reduction in the daily body weight of the 26th-31st day ($p < 0.05$) but there was no significant difference between male and female rats that used fluoxetine treatment ($p > 0.05$) (Figure 2B).

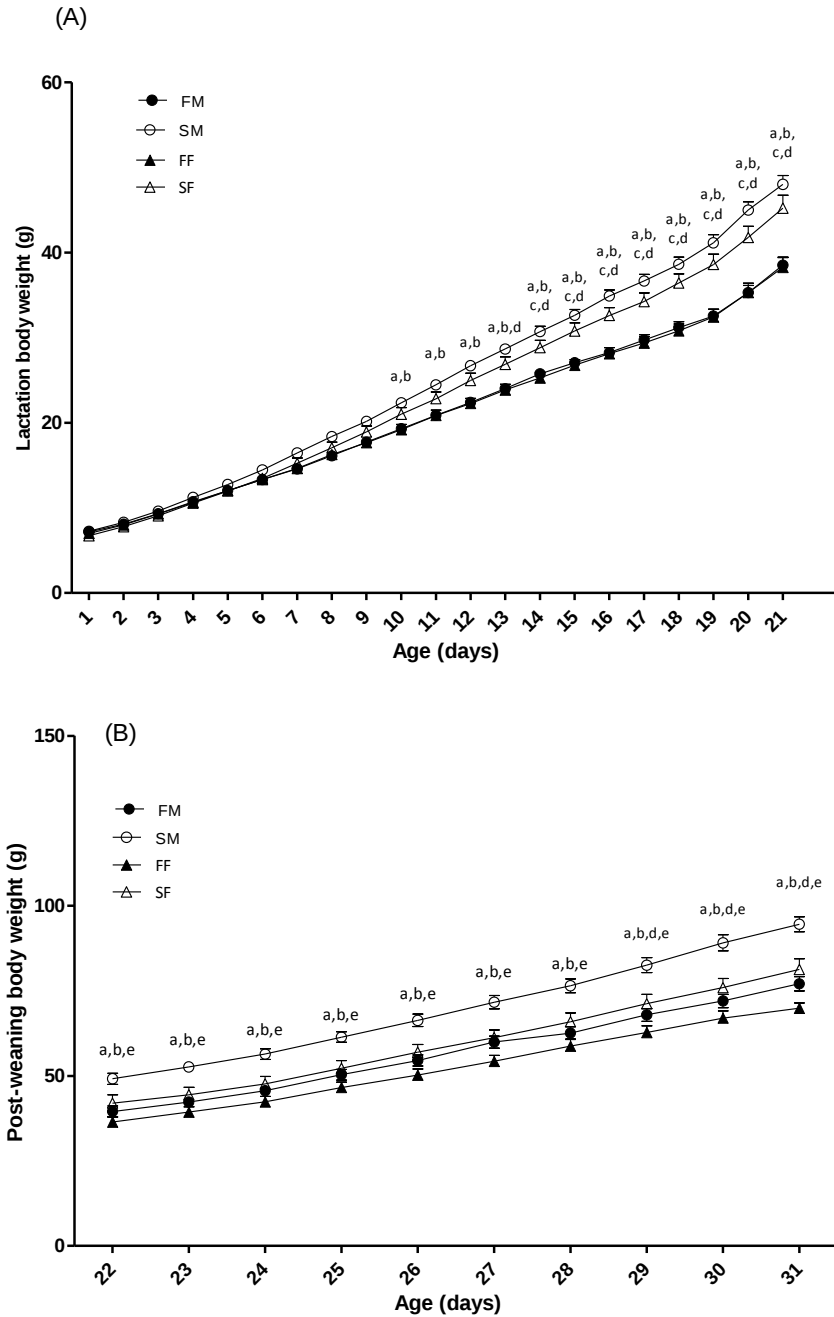


Figure 2. Lactation body weight (g) and Post-weaning body weight (g). Puppies according to gender and treatment used: Fluoxetine Males - FM (n=18), Saline Males-SM (n=16), Fluoxetine Females-FF (n=18), Saline Females-SF (n=19). Data were presented as mean and standard error. ^aP<0,05 MS vs MF; ^bP<0,05 MS vs FF; ^cP<0,05 FS vs MF, ^dP<0,05 FS vs FF e ^eP<0,05 SM vs SF. (A) Lactation body weight, (B) Post-weaning body weight. Anova two-way repeated measures following by Bonferoni test was used.

However, no difference ($p > 0.05$) was found in absolute lactation food intake (Figure 3) and post-weaning food intake (Figure 4) neither relative food intake [consumption (g) / weight (g)] x100 between groups (Figure 4A and 4B). There was also no significant difference between the groups that used the same treatment (SM vs SF or FF vs FM, $p > 0.05$).

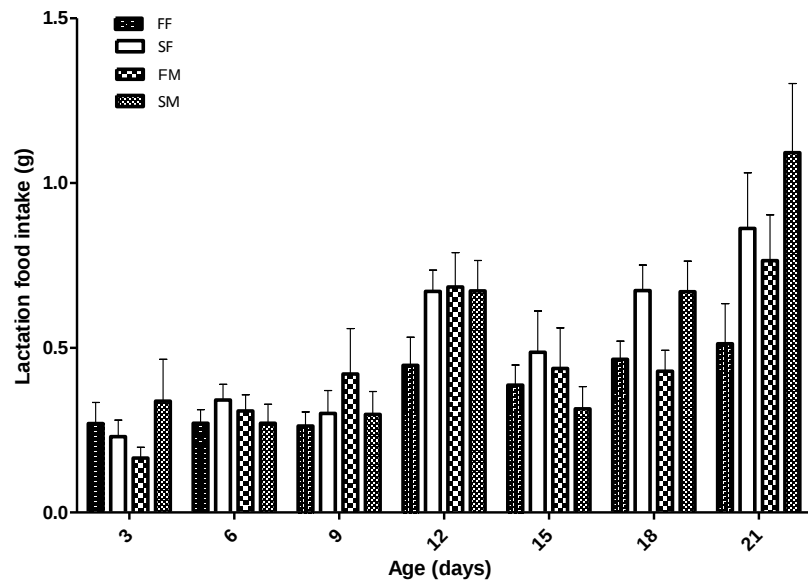


Figure 3. Lactation food intake (g). Puppies according to gender and treatment used: Fluoxetine Males - FM (n=18), Saline Males-SM (n=16), Fluoxetine Females-FF (n=18), Saline Females-SF (n=19). Data were presented as mean and standard error. (A) Lactation food intake (g). $P > 0.05$. Anova two-way repeated measures following by Bonferoni test was used.

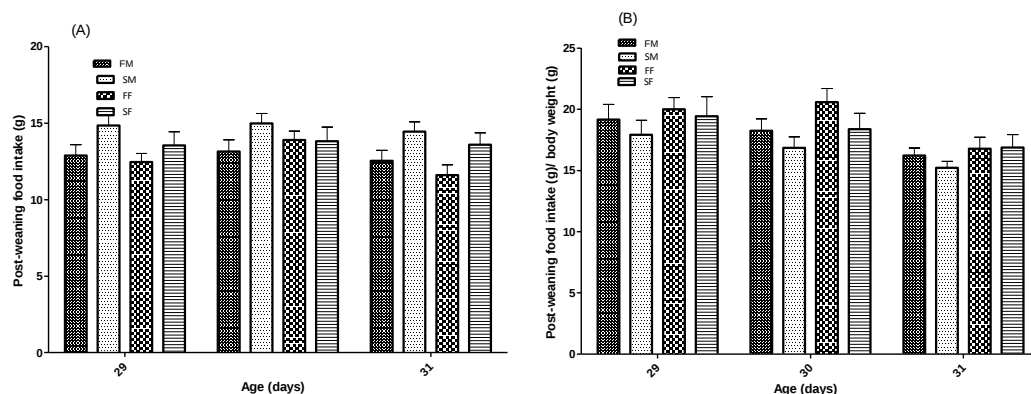


Figure 4. Post-weaning food intake (g) and Post-weaning food intake (g)/ body weight (g). Puppies according to gender and treatment used: Fluoxetine Males - FM (n=18), Saline Males-SM (n=16), Fluoxetine Females-FF (n=18), Saline Females-SF (n=19). Data were presented as mean and standard error. (A) Post-weaning food intake (g), (B) Post-weaning food intake (g)/ body weight (g). $P > 0.05$. Anova two-way repeated measures following by Bonferoni test was

4. Discussion

The fluoxetine chronic exposure during lactation delays the ontogeny reflexes, somatic development and body weight gain in rats. The serotonergic system is vulnerable to neurochemical influences such as selective serotonin reuptake inhibitor neonatal. Most striking changes in delay of ontogeny reflexes and somatic development were observed in males, but without any changes in feeding behavior.

The serotonergic system plays a modulatory role in the development of reflexes due to their anatomy on sensorimotor localization, as in primary sensory neocortex there is a serotonergic neurons hyperinnervation as well as at the level of α -motor neurons [31]. Thus, due to increased neonatal serotonin levels, the animals showed differences in reflex development pattern around the 12th day, when the rats treated with fluoxetine, had delayed on negative geotaxis, freefall righting, bar holding and hindlimb grasp, but this last one was observed only in males. Glazova et al., (2014) when applied fluvoxamine, a serotonin reuptake inhibitor from postnatal day 1 to day 14, noted delayed reflexes in male and female rats that received this treatment [6]. In other studies, only with males, delayed reflexes were observed with neonatal administration of sertraline [32] and citalopram [33].

Expression of each reflex can be related to the condition and development rate of a given CNS area and it is mediated by specific neurons in rats [34]. Studies have shown that changes in availability of serotonin into synaptic cleft caused by a pharmacological manipulation during development of the brain, may lead to irreversible morphological and functional changes in the central nervous system, such as reducing the number and size of the 5-HT dorsal raphe nuclei neurons and the amount of 5-HT terminals in the hippocampus caused by neonatal administration of fluoxetine [35], impaired axon

myelination due to increased levels of serotonin in the brain during the neonatal period [36], and causes morphological changes in striatal neurons and motor cortex leading to delayed development of motor function [37]. Therefore the effects of SSRIs on the appearance of reflexes are related to structural and functional changes in the developing nervous system.

In addition to reflexes delayed, other signs of alteration in the development of the nervous system could be seen from the somatic development measures that were delayed, especially in males treated with fluoxetine. The brain, as a noble organ, appears to be preserved in relation to the body [38] especially regarding females in this study. The authors suggests that neonatal changes in the decrease in lateral-lateral axis, the volume and circumference of the brain, due to administration of citalopram in neonatal mice, indicate the 5-HT participation in the cellular growth events [38]. These changes demonstrate that 5-HT manipulation in CNS development results in immediately changes and ontogenetic delays [38].

In relation to the tail and longitudinal length measures, treatment with fluoxetine also presented delay in males, from the 12th day, while females were less affected, with a reduction of these measures only in 18th day, indicating a higher female resistance to the increased serotonin effects in neonatal period. This effect may be related to differences in serotonergic modulation between genders. Hohmann (2007) suggests that serotonin may not have the same relevance in the cortical development plasticity between male and female, becoming sex susceptible to different 5-HT imbalances in various brain regions [19]. In a study, Coleman (2004), unlike males, BALB / CbyJ females did not have a very sharp peak post-natal of neocortical serotonin levels, suggesting that 5-HT innervation may influence more subtly the females cortex development [39].

Analyzing the physical features maturation, as well as in the study by Souza et al., (2004), even causing other effects such as weight and growth retardation, no difference was found between the treatment with clomipramine and control groups [42]. Rather, Glazova et al. (2014) observed that rats who received fluvoxamine in the neonatal period had the opening of the eyes sooner than those who did not [6].

In our study, it was observed that the changes between the groups were emerging at the same time, in the end of the second postnatal week. In addition, body weight was also not different, since a decrease in body weight was observed in the groups treated with fluoxetine, however, while males decreased from day 10, females had compromised weight only in 13th day. Very similar results were observed with males, in the study by Mendes-da-Silva et al. (2002), who assessed the effects of chronic fluoxetine exposure to 1 - 21 days in male rats, and observed a decrease in body weight from 9th day to the 21st day compared to the control group [43]. In agreement with other studies using the same experimental model, neonatal chronic fluoxetine reduced body weight throughout lactation period [35,44,45].

It was also possible to observe the influence of gender on animals that used the saline treatment from the 26th day, where females had lower weight, however there was no difference between the fluoxetine groups. That is, fluoxetine treatment was able to suppress the influence of male gender to increase weight, in the extent that male and female treated with fluoxetine showed no difference in weight gain.

While males treated with fluoxetine, had less body weight at all time this study, it was observed that females showed a reduction only from 28 to 31st day, demonstrating a higher resistance to the effects of fluoxetine. Such resistance was demonstrated when Doosti et al., (2013) observed that the administration of lipopolysaccharide (LPS) in newborn mice (3 to 5 days), followed by later fluoxetine

administration (35 to 65 days after natal), reduced the body weight of males and females, compared with the control group [46]. In case of the males, this reduction occurred during 15-65 postnatal days, while for females this period was 15 to 45 days, indicating that the weight loss was greater in males than in females, and a better resistance of females to the effects of fluoxetine and LPS exposure. In a study by Lauzurica (2010), the acute administration of fluoxetine in adult rats caused a significant reduction in body weight and retroperitoneal fat only in males [47].

The serotonergic system also known to play an important role in the regulation of appetite and food intake, promoting satiety [7]. Drugs that increase extracellular 5-HT content display anorectic activity [48], so it is possible to combine the effect of a SSRI on decreasing weight gain is linked to the anorectic effects of 5-HT. Studies evaluating the acute and / or chronic effect of fluoxetine in adult rats observed weight loss and hypophagy effect [47,49] However, in our study, in which fluoxetine is administered chronically, we didn't observe any significant change on food intake during neonatal and postnatal periods between experimental groups. Similar results were found in food intake tests in post weaning phase, confirming studies like Ansorge et al. (2004) and Silva et al., (2014) which found that food intake after chronic exposure to fluoxetine, remained unchanged [4,44]. However, in the same study, da Silva et al. (2014) showed that acute administration of fluoxetine in adult rats promoted reduction of food intake in the group treated with saline solution in the neonatal period, while, had no effect in animals exposed to chronic neonatal fluoxetine [44].

Studies have reported that effects of chronic drugs exposure that block SERT, is capable to reduction the sensitivity of the pre-synaptic and post-synaptics serotonin receptors in specific regions of the nervous system [50,51]. Among these studies, Newman et al (2000) found that 5-HT_{1B} pre synaptic receptors in the hypothalamus

that are involved with food intake reduction, there were less sensitive for increasing 5-HT levels [50]. It was also shown that neonatal administration of SSRIs leads to the development of a hypermetabolism state in rats [40]. In a study using the antidepressant D-fenfluramine (stimulator reuptake inhibitor and 5-HT release), it was observed an increase in expression of proopiomelanocortin (POMC) [52]. The POMC neuropeptide is synthesized in hypothalamic nuclei and emitting projections for preganglionic neurons located in the mediolateral spinal cord, and these neurons communicate with skeletal muscle by sympathetic postganglionic fibers [53,54]. When this hypothalamic pathway is stimulated, it can generate changes in the skeletal muscle energy metabolism that resulting in increased energy expenditure and body weight reduction [55].

Thus, it is possible that chronic treatment with fluoxetine promote changes in the receptors sensitivity that are involved with eating behavior. In addition, we suggest that the accelerated metabolism and a possible reduction in the sensitivity of serotonin hypothalamic receptors in the animals that received fluoxetine are factors that may be related to the delay in weight gain in this study. These effects may possibly prevail more strongly in males, as they showed weight reduction in a period before females.

Whereas epigenetic have sex differences in the expression and activity of genes in various brain regions, environmental insults can trigger different effects between genders [56]. Studies in rodents have shown sex-specific differences after handling the serotonergic system in early life with greater vulnerability in males and with long-term effects. For example, Zhang et al., 2013 observed a reduction in 5-HT fibers expression in the olfactory bulb only in adult males that were exposed to citalopram in neonatal period [57]. While the effects of citalopram on perinatal exposure affected the locus coeruleus circuit function in males rats, with no effect in females [58]. Another study in which a single administration of 5HT in newborn rats was applied, reduced

5HT levels in the striatum of adult male rats, and increase in sexual activity was showed, while no differences were detected among adult female [18]. In males and females with 5HT depleted, there was less serotonergic innervation in the anterior cortex of males, not only this, they demonstrate less behavior time for exploration in response to a rearrangement and a new object, but this effect was not found in females [19]. And in the study of Uçailer et al., (2009), the lack of the serotonin transporter in male and female rats reduced the locomotor activity and increased predisposition to obesity in males [20].

In conclusion, this study shows that despite the chronic administration of fluoxetine in the neonatal period in male and female rats, not cause changes in eating behavior, it causes delay in the reflex ontogeny, slowdown in weight gain and somatic development and greater vulnerability in male. Such changes suggest sex-specific responses to serotonergic system manipulation, and confirm that serotonin plays an important role in regulating the nervous system plasticity during development period, differently in males and females. However the precise mechanism of such differences during development is not known, and the consequences of these effects in adulthood need to be further explored, especially in relation to the acquisition of neurological and psychiatric diseases that are related to gender.

Conflict of interest

None declared

REFERENCES

- [1] Gaspar P, Cases O, Maroteaux, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4: 1002–1012.
- [2] Popa D, Lena C, Alexandre C, Adrien J. Lasting syndrome of depression produced by reduction in serotonin uptake during postnatal development: evidence from sleep, stress, and behavior. *J Neurosci.* 2008; 28: 3546–54.
- [3] Lisboa, SF, Oliveira, PE, Costa, LC, Venancio EJ, Moreira EG. Behavioral evaluation of male and female mice pups exposed to fluoxetine during pregnancy and lactation. *Pharmacology.* 2007; 80: 49–56.
- [4] Ansorge MS, Zhou M, Lira, A, Hen R, Gingrich, JÁ. Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science.* 2004; 306: 879–81.
- [5] Hansen HH, Sanchez C, Meier E. Neonatal administration of the selective serotonin reuptake inhibitor Lu 10-134-C increases forced swimming-induced immobility in adult rats: a putative animal model of depression. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283:1333–41.
- [6] Glazova NY, Merchieva SA, Volodina MA, Sebentsova EA, Manchenko DM, Kudrun VS, Levitskaya, NG. Effects of Neonatal Fluvoxamine Administration on the Physical Development and Activity of the Serotonergic System in White Rats. *Acta Naturae*, 2014; 6: 98–105.
- [7] Voigt JP, Fink H. Serotonin controlling feeding and satiety.. *Behav Brain Res.* 2015; 277: 14-31.
- [8] Maciag D, Simpson KL, Coppinger D, Lu Y, Wang Y, Lin RCS, Paul IA. Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry. *Neuropsychopharmacology.* 2006; 31: 47–57.
- [9] Martin MM, Liu Y, Wang Z. Developmental exposure to a serotonin agonist produces subsequent behavioral and neurochemical changes in the adult male prairie vole. *Physiol Behav.* 2012; 105: 529–35.
- [10] Whitaker-Azmitia PM. Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism. *Int J Dev Neurosci.* 2005; 23: 75–83.
- [11] Homberg JR, Schubert D, Gaspar P. New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31:60–5.
- [12] Oberlander TF, Gingrich JA, Ansorge MS. Sustained neurobehavioral effects of exposure to SSRI antidepressants during development: molecular to clinical evidence. *Clin Pharmacol Ther.* 2009; 86:672–7.
- [13] Rice D, Barone SJ. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Human and Animal Models. *Environmental Health Perspective.* 2000; 108: 511–533.

- [14] Genest SE, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R. Neonatal maternal separation induces sex-specific augmentation of the hypercapnic ventilatory response in awake rat. *J Appl Physiol*. 2007; 102: 1416-21.
- [15] Kinnally El, Capitanio Jp, Leibel R, Deng L, Leduc C, Haghighi F, Mann Jj. Epigenetic regulation of serotonin transporter expression and behavior in infant rhesus macaques. *Genes brain behav*. 2010; 9: 575-82.
- [16] Smit-Rigter LA, Noorlander CW, von Oerthel L, Chameau P, Smidt MP, van Hooft JA. Prenatal fluoxetine exposure induces life-long serotonin 5-HT(3) receptor-dependent cortical abnormalities and anxiety-like behaviour. *Neuropharmacology*. 2012; 62: 865-870.
- [17] Noorlander CW, Ververs FF, Nikkels PG, van Echteld CJ, Visser GH., Smidt MP. Modulation of serotonin transporter function during fetal development causes dilated heart cardiomyopathy and lifelong behavioral abnormalities. *PLoS ONE*. 2008; 3: e2782.
- [18] Csaba G, Knippel B, Karabélyos C, Inczeffi-Gonda A, Hantos M, Tekes K. Impact of single neonatal serotonin treatment (hormonal imprinting) on the brain serotonin content and sexual behavior of adult rats. *Life Sci*. 2003; 73: 2703–2711.
- [19] Hohmann CF, Walker EM, Boylan CB, Blue ME. Neonatal serotonin depletion alters behavioral responses to spatial change and novelty. *Brain Res*. 2007; 1139: 163–177.
- [20] Uçeyler N, Schütt M, Palm F, Vogel C, Meier M, Schmitt A, Lesch KP, Mössner R, Sommer C. Lack of the serotonin transporter in mice reduces locomotor activity and leads to gender-dependent late onset obesity. *Int. J. Obes*. 2010; 34: 701–711.
- [21] Jarvis S, Glinianaia SV, Arnaud C, Fauconnier J, Johnson A, McManus V, Topp M, Uvebrant P, Cans C, Krägeloh-Mann I; SCPE collaboration of European Cerebral Palsy Registers. Case gender and severity in cerebral palsy varies with intrauterine growth. *Arch. Dis. Child*. 2005; 90: 474–479.
- [22] Stevenson DK, Verter J, Fanaroff AA, Oh W, Ehrenkranz RA, Shankaran S, Donovan EF, Wright LL, Lemons JA, Tyson JE, Korones SB, Bauer CR, Stoll BJ, Papile LA.. Sex differences in outcomes of very low birthweight infants: the newborn male disadvantage. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed*. 2000; 83: 182–185.
- [23] Goel N, Bale TL. Examining the intersection of sex and stress in modelling neuropsychiatric disorders. *J Neuroendocrinol*. 2009; 21:415–420
- [24] Sandman CA, Glynn LM, Davis EP. Is there a viability-vulnerability tradeoff? Sex differences in fetal programming. *J Psychosom Res*. 2013; 75: 327-35.
- [25] Wells JC. Natural selection and sex differences in morbidity and mortality in early life. *J Theor. Biol*. 2000; 202: 65-76.

- [26] Dalla C, Pitychoutis PM, Kokras N, Papadopoulou-Daifoti Z: Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010; 106: 226–233.
- [27] Zehr E, Stein R. What functions do reflexes serve during human locomotion. *Prog Neurobiol.* 1999; 58:185–205.
- [28] Fox WM. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Anim Behav.* 1965; 13: 234–241.
- [29] Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain. II: Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Res.* 1971; 28: 85–95.
- [30] Lam DD, Garfield AS, Marston OJ, Shaw J, Heisler LK. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol Biochem and Behav.* 2010; 97: 84–91.
- [31] Doly S, Madeira A, Fischer J, Brisorgueil MJ, Daval J, Bernard R, Vergé D, Conrath M. The 5-HT_{2A} receptor is widely distributed in the rat spinal cord and mainly localized at the plasma membrane of postsynaptic receptors. *J. Comp. Neurol.*, 2004; 472: 496 – 511.
- [32] Deiró TC, Manhães-de-Castro R, Cabral-Filho JE, Barreto-Medeiros JM, Souza SL, Marinho SM, Castro FM, Toscano AE, Jesus-Deiró RA, Barros KM. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiol Behav.* 2006; 87: 338-44.
- [33] Deiró TC, Carvalho J, Nascimento E, Medeiros JM, Cajuhi F, Ferraz-Pereira KN, Manhães-de-Castro R. Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2008; 66: 736–740.
- [34] Almli CR, Fisher R. Infant rats: sensorimotor ontogeny and effects of substantia nigra destruction. *Brain Research Bulletin.* 1977; 2: 425–459.
- [35] Silva CM, Goncalves L, Manhaes-de-Castro R, Nogueira MI. Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. *Neurosci Lett.* 2010; 483: 179 - 183.
- [36] Kinast K, Peeters D, Kolk SM, Schubert D, Homberg JR. Genetic and pharmacological manipulations of the serotonergic system in early life: neurodevelopmental underpinnings of autism-related behavior. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7: 72.
- [37] Lee LJ, Lee LJ. Neonatal fluoxetine exposure alters motor performances of adolescent rats. *Dev Neurobiol.* 2012; 72: 1122-32.
- [38] Magalhães CP, de Lima LO, da Silva MC, Marinho SM, do Nascimento E, da Silva CM, de Souza SL, Manhães-de-Castro R. Efeitos do tratamento neonatal com

inibidor seletivo de recaptura da 5-HT sobre o desenvolvimento anatômico crânio-encefálico. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006; 64: 990-993.

[39] Connell S, Karikari C, Hohmann CF. Sex-specific development of cortical monoamine levels in mouse. *Brain Res Dev Brain Res.* 2004; 151: 187-91.

[40] Kummet GJ, Haskell SE, Hermann GM, Ni C, Volk KA, Younes AK, Miller AK, Roghair RDJ. Nutr. Metab. Neonatal SSRI Exposure Programs a Hypermetabolic State in Adult Mice. 2012, 431574.

[41] Karpova NN, Lindholm J, Pruunsild P, Timmusk T, Castrén E. Long-lasting behavioural and molecular alterations induced by early postnatal fluoxetine exposure are restored by chronic fluoxetine treatment in adult mice. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2009; 19: 97–108.

[42] de Souza SL, Nogueira MI, Deiró TC, de Castro FM, da Silva CM, da Silva MC, de Lira L O, Azmitia EC, de Castro RM. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. *Physiol Behav.* 2004; 82: 375-9.

[43] Mendes-da-Silva C, de Souza SL, Barreto-Medeiros JM, de Freitas-Silva SR, Antunes DE, Cunha AD, Ribas VR, de França MF, Nogueira MI, Manhães-de-Castro R. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2002; 60: 928-31.

[44] da Silva AI, Monteiro Galindo LC, Nascimento L, Moura Freitas C, Manhaes-de-Castro R, Lagranha CJ, Lopes de Souza, S. Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life. *Can J Physiol Pharmacol.* 2014; 92: 330-7.

[45] Ramadan E, Blanchard H, Cheon Y, Fox, MA, Chang L, Chen M, Ma K, Rapoport SI, Basselin M. Transient postnatal fluoxetine leads to decreased brain arachidonic acid metabolism and cytochrome P450 4A in adult mice respectively. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2014; 90: 191-7.

[46] Doosti MH, Bakhtiari A, Zare P, Amani M, Majidi-Zolbanin N, Babri S, Salari A.A. Impacts of early intervention with fluoxetine following early neonatal immune activation on depression-like behaviors and body weight in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013; 43: 55-65.

[47] Lauzurica, N, García-García L, Fuentes JA, Delgado M. Hypophagia and induction of serotonin transporter gene expression in raphe nuclei of male and female rats. *J Physiol Biochem.* 2013; 69: 69-74.

[48] Blundell JE, Latham CJ. Characteristic adjustments to the structure of feeding behaviour following pharmacological treatments: effects of amphetamine and fenfluramine and the antagonism produced by pimozide and metergoline. *Pharmacol Biochem Behav.* 1979; 12: 717– 22.

- [49] First M, Gil-Ad I, Taler M, Tarasenko I, Novak N, Weizman A. The effects of fluoxetine treatment in a chronic mild stress rat model on depression-related behavior, brain neurotrophins and erk expression J Mol Neurosci. 2011; 45: 246-55.
- [50] Newman ME, Gur E, Dremencov E, Garcia F, Lerer B, Van de Kar LD. Chronic clomipramine alters presynaptic 5-HT(1B) and postsynaptic 5-HT(1A) receptor sensitivity in rat hypothalamus and hippocampus. Neuropharmacology. 2000; 39: 2309-17.
- [51] Vidal R, Valdizán EM, Mostany R, Pazos A, Castro E. Long-term treatment with fluoxetine induces desensitization of 5-HT₄ receptor-dependent signalling and functionality in rat brain. J Neurochem. 2009; 110:1120 - 1127.
- [52] Heisler LK, Cowley MA, Tecott LH. et al. Activation of Central Melanocortin Pathways by Fenfluramine. Science. 2002; 297: 609-611
- [53] Cechetto DF, Saper CB. Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat. J. Comp. Neurol., 1988; 272: 579–604.
- [54] Broberger C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. J Int Med, 2005; 258: 301-27.
- [55] Cha HS, Hu Z, Chohnan S, Lane MD. Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. Biological Sciences – Biochemistry. 2005; 102: 14557-14562.
- [56] Menger Y, Bettscheider M, Murgatroyd C, Spengler D. Sex differences in brain epigenetics. Epigenomics. 2010; 2: 807-21.
- [57] Zhang J, Dennis KA, Darling RD, Alzghoul L, Paul IA, Simpson KL, Lin RC. Neonatal citalopram exposure decreases serotonergic fiber density in the olfactory bulb of male but not female adult rats. Front Cell Neurosci. 2013; 7:67.
- [58] Darling RD, Alzghoul L, Zhang J, Khatri N, Paul IA, Simpson KL, et al. Perinatal citalopram exposure selectively increases locus ceruleus circuit function in male rats. J. Neurosci. 2011; 31: 16709–16715.

ANEXO I (Submissão de artigo para a revista *Nutrition Research*)

Elsevier Editorial System(tm) for Nutrition Research
Manuscript Draft

Manuscript Number: NR-15-85

Title: Sex-specific effects of plasticity by inhibiting serotonin reuptake on the ontogeny of reflexes, somatic development and feeding behavior.

Article Type: Research Article

Keywords: Serotonin; plasticity; fluoxetine; reflexes; somatic development; feeding behavior; sex differences.

Corresponding Author: Ms. RAQUEL CAMPOS,

Corresponding Author's Institution:

First Author: RAQUEL CAMPOS

Order of Authors: RAQUEL CAMPOS; ANA ELISA TOSCANO; JOSÉ EULÁLIO C FILHO; BÁRBARA J SANTANA; LARYSSA KARLA M ALMEIDA; ANA PAULA S SILVA; TEREZA CRISTINA B DEIRÓ; SANDRA L SOUZA; RAUL MANHÃES-DE-CASTRO

Abstract: Serotonin (5HT) acts as a neuromodulator widely distributed in the central nervous system and plays a critical role in the regulation of brain development. Changes in 5-HT signaling by serotonin reuptake inhibitors exposure during the perinatal period can affect neural development and may result in behavioral changes in adulthood. Further investigations are necessary including both sexes to study these effects. Thus, the aim of this study was to investigate the impact of neonatal treatment with fluoxetine on the ontogeny of reflexes, somatic development and food intake in male and female rats. The animals were formed by four groups according to gender (male or female) and treatment (fluoxetine or saline). Animals in the fluoxetine group received fluoxetine at 10 mg / kg on 1^o to 21 postnatal day and the animals that were part of the saline group received saline 0.9%, 10 ml / kg. In the neonatal period (1-21 days) were recorded: reflex ontogeny, somatic development, physical characteristics and food intake (milk intake) and in the postnatal period (22-31 days): body weight and food intake (feed intake). Despite the chronic administration of fluoxetine in the neonatal period did not cause changes in food intake, it causes delay in the reflex ontogeny, lower weight gain and somatic development and most striking in males. In summary, these findings suggest a sex-specific response on the manipulation of the serotonergic system. These changes confirm that serotonin plays an important role in regulating the plasticity of the nervous system during development period, differently from males and females.

A manuscript number has been assigned: NR-15-85



Nutrition Research (bwtakin1@purdue.edu) Adicionar aos contatos 12/02/2015

Para: raquelzinha_campos@hotmail.com, raquel.campos@tjpe.jus.br

De: ees.nr.0.2f3b98.a0728bf6@eesmail.elsevier.com em nome de Nutrition Research (bwtakin1@purdue.edu)

Enviada: quinta-feira, 12 de fevereiro de 2015 07:33:55

Para: raquelzinha_campos@hotmail.com; raquel.campos@tjpe.jus.br

Ms. Ref. No.: NR-15-85

Title: Sex-specific effects of plasticity by inhibiting serotonin reuptake on the ontogeny of reflexes, somatic development and feeding behavior.
Nutrition Research

Dear RAQUEL,

Your submission entitled "Sex-specific effects of plasticity by inhibiting serotonin reuptake on the ontogeny of reflexes, somatic development and feeding behavior." has been assigned the following manuscript number: NR-15-85.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/nr/>.

Your username is: raquelzinha_campos@hotmail.com

If you need to retrieve password details please go to: http://ees.elsevier.com/nr/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Cynthia Tom, B.S., M.S.
Managing Editor
Nutrition Research

ANEXO II (Documento de aprovação do CEUA/UFPE)

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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



Recife, 17 de dezembro de 2013.

Ofício nº 664/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Raul Manhães de Castro**

Universidade Federal de Pernambuco

Departamento de Nutrição

Processo nº 23076.043932/2013-91

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Podem o consumo alimentar e a ontologia sensório-motora ser alterados de modo sexo-dependente por inibição neonatal da recaptação serotoninérgica? Um estudo experimental da plasticidade fenotípica"**.

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 CEUA-UFPE.

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

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

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição/UFPE; Animal: ratos heterogênicos; Linhagem: Wistar; Idade: 30-120 dias; Sexo: machos e fêmeas; Nº Total de Animais: 80.


Prof. Tania Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2306924