

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO, ATIVIDADE FÍSICA E
PLASTICIDADE FENOTÍPICA

Manuella da Luz Duarte Barros

Estudo dos efeitos da inibição neonatal da recaptação de serotonina sobre o comportamento alimentar e a imunoreatividade neuronal hipotalâmica em ratos adultos.

Vitória de Santo Antão

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO, ATIVIDADE FÍSICA E
PLASTICIDADE FENOTÍPICA

Manuella da Luz Duarte Barros

Estudo dos efeitos da inibição neonatal da recaptação de serotonina sobre o comportamento alimentar e a imunoreatividade neuronal hipotalâmica em ratos adultos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Lígia Cristina Monteiro Galindo

Vitória de Santo Antão

2016

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV
Bibliotecária Jaciane Freire Santana - CRB-4/2018

B277e Barros, Manuella da Luz Duarte.

Estudo dos efeitos da inibição neonatal da recaptação de serotonina sobre o comportamento alimentar e a imunoreatividade neuronal hipotalâmica em ratos adultos / Manuella da Luz Duarte Barros. - Vitória de Santo Antão, 2016.

63 folhas; il.: color.

Orientador: Raul Manhães de Castro

Coorientadora: Lígia Cristina Monteiro Galindo

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Comportamento Alimentar - ratos. 2. Inibidores da Captação de Serotonina. 3. Plasticidade fenotípica - ratos. I. Castro, Raul Manhães de (Orientador). II. Galindo, Lígia Cristina Monteiro (Coorientadora). III. Título.

591.53 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-109/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA – CAV

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO, ATIVIDADE FÍSICA E PLASTICIDADE FENOTÍPICA – PPGNAFPF

Dissertação de Mestrado apresentada por **MANUELLA DA LUZ DUARTE BARROS** ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título “**Estudo dos efeitos da inibição neonatal da recaptação de serotonina sobre o comportamento alimentar e a imunoreatividade neuronal hipotalâmica em ratos adultos**”, orientada pelo Prof. Dr. Raul Manhães de Castro e coorientada pela Prof^a Dr^a Lígia Cristina Monteiro Galindo, aprovada no dia 23 de fevereiro de 2016 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dra. Ana Elisa Toscano

Núcleo de Enfermagem – CAV/UFPE

Dra. Aline Isabel da Silva

Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento / UFPE

Dra. Cláudia Jacques Lagranha

Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – CAV/UFPE

Autora:

Manuella da Luz Duarte Barros

AGRADECIMENTOS

Seguem os meus agradecimentos...

A Deus e seus intermediários, os espíritos bem-feitores, que me guiam e me dão força para trabalhar dentro dos princípios da fraternidade, apesar do caos realidade.

Aos meus avós, Nair Souza da Luz, Maria de Lourdes Duarte Barros, Manoel Sebastião da Luz e José Duarte Barros, por não terem desistido de suas difíceis missões. Por isso estou aqui!

À minha querida mãe, Liselena da Luz Barros, e ao meu querido pai, Fábio José Duarte Barros, por terem assegurado com muita força e luta todas as condições que proporcionaram e proporcionarão minha evolução intelectual e moral, as únicas razões para nascermos e vivermos.

Ao meu irmão, José Henrique da Luz Duarte Barros, por tolerar meus momentos de estresse. Eu amo você, meu irmão!

A Felipe Dias de Oliveira, amigo e companheiro, pela compreensão, apoio e estímulo. Agradeço também por todas as manutenções no laboratório, bem como pelos consertos de equipamentos sem os quais teria sido impossível realizar determinados experimentos.

À minha co-orientadora, professora Lígia Cristina Monteiro Galindo, por confiar no meu trabalho e ser mais que uma orientadora, uma amiga.

Ao meu orientador, professor Raul Manhães de Castro pelos ensinamentos e preocupação com o meu futuro.

Ao professor Yvis Tourner pela gentileza e por todos os ensinamentos sobre microscopia e processamento de imagens.

Ao professor Omar Guzmán Quevedo pela humildade, pelos ensinamentos sobre imunofluorescência e pelo apoio dado nos experimentos.

Ao meu amigo, Diego Cabral Lacerda, pelo apoio, ajuda e conversas nos momentos de aflição, assim como nos momentos de alegria.

À Tássia Karin Ferreira Borba pela amizade e pelo ensinamento da técnica de estereotaxia.

Às estagiárias Sarah Sadok e Aenoá Rayane pelo apoio, compreensão e ajuda nos experimentos.

Ao professor João Henrique Costa da Silva por ter permitido a utilização de seu laboratório, equipamentos e materiais, e às suas alunas, Viviane Nogueira e Monique Assis, pela amizade e ajuda nos experimentos.

À professora Ana Elisa Toscano pela disponibilidade e pelo empréstimo das pipetas para realização dos experimentos de imunofluorescência.

Eu agradeço a todas as pessoas mencionadas até aqui, no entanto, do fundo do meu coração, o meu mais emocionante agradecimento segue aos animais de laboratório. Estes seres vivos sencientes, porém sem escolha, possibilitam a existência de nossos trabalhos. Espero ter feito o melhor para justificar os sacrifícios de suas vidas!

RESUMO

A plasticidade fenotípica compreende a capacidade do organismo de elaborar adaptações morfofuncionais em resposta aos estímulos ambientais. Essa capacidade é mais intensa durante a gestação e lactação (plasticidade do desenvolvimento), podendo estar associada a consequências ao longo da vida. Neste contexto, a serotonina (5-HT) tem papel determinante no desenvolvimento do sistema nervoso central. Além disso, a 5-HT participa do controle central homeostático do balanço energético no núcleo arqueado (Arc) do hipotálamo, estimulando a saciedade e o gasto de energia através da inibição de neurônios orexígenos e estimulação de neurônios anorexígenos via receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}, respectivamente. Dessa forma, a alteração da atividade serotoninérgica durante o desenvolvimento pode modificar a regulação e a expressão do comportamento alimentar em longo prazo. Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa apontaram que a inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina (ISNRS) pode estar associada a fenótipo hipofágico na vida adulta. Nós acreditamos que esse fenótipo se deve a maior atividade da via anorexígena no Arc. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da ISNRS sobre o peso corporal, o comportamento alimentar e a atividade neuronal no Arc em resposta aos agonistas dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B} em ratos adultos. Ratos *Wistar* foram tratados com solução salina (SAL, n=15) ou fluoxetina (FLUO, n=15) do 1º ao 21º dia pós-natal. Aos 170 dias de vida foi realizada cirurgia de estereotaxia para implantação de cânula no ventrículo lateral direito através da qual foram feitas as injeções intracerebroventricular (ICV). Aos 180 dias foi realizada a pesagem dos animais seguida de injeção ICV de ACSF, agonista do receptor 5-HT_{2C} ou agonista do receptor 5-HT_{1B}, obtendo-se seis grupos experimentais (n=5 animais/grupo): SAL+ACSF, SAL+AG.1B, SAL+AG.2C, FLUO+ACSF, FLUO+AG.1B e FLUO+AG.2C. A partir desses grupos, foi analisada a sequência comportamental de saciedade (SCS) e o número de células reativas contra proteína c-fos no Arc. Comparado ao grupo SAL, o grupo FLUO apresentou menor peso corporal. A ISNRS também promoveu maior ingestão alimentar frente ao estímulo com o agonista 5-HT_{2C}, menor taxa alimentar após injeção de ACSF e antecipação do ponto de saciedade após estímulo com o agonista 5-HT_{1B}. Além disso, o grupo FLUO apresentou maior número de células reativas contra c-fos no Arc frente ao agonista 5-HT_{2C}. Corroborando nossa hipótese, a ISNRS parece promover aumento da atividade da via anorexígena no Arc na idade adulta, apesar de não ter ocorrido redução da ingestão alimentar. Em conjunto, os achados deste estudo sugerem que o menor peso corporal em ratos adultos submetidos à ISNRS pode ser consequência do aumento da atividade da via anorexígena no Arc, o que pode contribuir para um aumento do gasto energético.

Palavras-chave: Plasticidade fenotípica, serotonina e comportamento alimentar.

ABSTRACT

Phenotypic plasticity comprises the ability of an organism to develop morphological and functional adaptations in response to environmental stimuli. This capacity is more intense during pregnancy and lactation (developmental plasticity) and may be associated with consequences throughout life. In this context, serotonin (5-HT) has a decisive role in the development of the central nervous system. Furthermore, 5-HT participates in homeostatic central control of energy balance in the arcuate nucleus (Arc) of the hypothalamus, stimulating satiety and energy expenditure through inhibition of orexigenic neurons and stimulation anorectic neurons via 5-HT_{1B} receptors and 5-HT_{2C}, respectively. Thus, the modification of serotonergic activity during development can change the regulation and expression of feeding behavior in the long term. Previous studies from our research group showed that neonatal selective serotonin reuptake inhibition (NSSRI) may be associated with hypophagic phenotype in adulthood. We believe that this phenotype is due to increased activity of anorectic via in the Arc. Thus, this study aimed to evaluate the effects of NSSRI on body weight, feeding behavior and neuronal activity in the Arc in response to 5-HT_{2C} and 5-HT_{1B} receptors agonists in adult rats. Wistar rats were treated with saline (SAL, n=15) or fluoxetine (FLUO, n=15) from 1° to 21° postnatal day. At 170 days, stereotactic surgery was performed for implantation of a cannula in the right lateral ventricle through which were made the intracerebroventricular injections (ICV). At 180 days, weighing of animals was performed followed by ICV injections of ACSF, 5-HT_{2C} or 5-HT_{1B} receptors agonists, resulting in six experimental groups (n=5 animals/group): SAL+ACSF, SAL+AG.1B, SAL+AG.2C, FLUO+ACSF, FLUO+AG.1B and FLUO+AG.2C. From these groups, behavioral satiety sequence (SCS) and number of reactive cells against c-fos protein in the Arc were analyzed. Compared to the SAL group, FLUO group had lower body weight. NSSRI also promoted greater food intake after stimulation with 5-HT_{2C} receptor agonist, lower feed rate after injection of ACSF and anticipation of the point of satiety after stimulation with 5-HT_{1B} receptor agonist. Furthermore, FLUO group had a higher number of reactive cells against c-fos in the Arc after stimulation with 5-HT_{2C} receptor agonist. Corroborating our hypothesis, NSSRI seems to promote increased anorexigenic pathway activity in the Arc in adulthood, despite not having been reduced food intake. Together, the findings suggest that lower body weight in adult rats submitted to NSSRI may be a consequence of increased anorexigenic pathway activity in the Arc, which can contribute to an increase in energy expenditure.

Keywords: Phenotypic plasticity, serotonin and feeding behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1 – Organograma dos grupos experimentais	29
Figura 2 – Cirurgia de Estereotaxia	31
Figura 3 – Método de quantificação do número de células reativas contra proteína c-fos no Arc	34

FIGURAS DO ARTIGO ORIGINAL

Figura 1 – Efeito da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina sobre o peso corporal em ratos aos 180 dias de vida	40
Figura 2 – Efeito da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina sobre o ponto de saciedade em ratos aos 180 dias após injeção ICV de ACSF, agonista do receptor 5-HT _{1B} ou agonista do receptor 5-HT _{2C}	41
Figura 3 – Efeito da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina sobre a ingestão alimentar (A), tempo de alimentação (B), taxa alimentar (C) e frequência alimentar (D) em ratos aos 180 dias após injeção ICV de ACSF, agonista do receptor 5-HT _{1B} ou agonista do receptor 5-HT _{2C}	42
Figura 4 – Efeito da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina sobre o número de células reativas contra c-fos no Arc em ratos aos 180 dias de vida após injeção ICV de ACSF, agonista do receptor 5-HT _{1B} ou agonista do receptor 5-HT _{2C}	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABREVIATURA/SIGLA	PORTUGUÊS	INGLÊS
ACSF	Fluido Cerebroespinal Artificial	Artificial Cerebrospinal Fluid
AgRP	Proteína Relacionada ao Agouti	Agouti Related Protein
AG.1B	Agonista do receptor 5-HT _{1B}	5-HT _{1B} receptor agonist
AG.2C	Agonista do receptor 5-HT _{2C}	5-HT _{2C} receptor agonist
Arc	Núcleo Arqueado	Arcuate Nucleus
BNDF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BSA	Albumina Sérica Bovina	Bovine Serum Albumin
CART	Transcrito Regulado pela Cocaína e Anfetamina	Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript
CCB	Centro de Ciências Biológicas	_____
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais	_____
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal	_____
CP-94 253	Agonista seletivo do receptor 5-HT _{1B}	5-HT _{1B} receptor selective agonist – 3-(1,2,5,6-tetrahydro-4-pyridyl)-5-propoxy-pyrol[3,2-b]pyridine
DAB	3-3diaminobenzidina	_____
DPN	Dia Pós-Natal	Postnatal Day
EUA/ USA	Estados Unidos da América	United States of American
FLUO	Fluoxetina	Fluoxetine
GABA	Ácido Gama-	Gamma-

	Aminobutírico	Aminobutyric Acid
GLP-1	Peptídeo Semelhante ao Glucagon	Glucagon-Like Peptide
ICV	Intracerebroventricular	Intracerebroventricular
ISNRS/NSSRI	Inibição Seletiva Neonatal da Recaptação de Serotonina	Neonatal Selective Serotonin Reuptake Inhibition
ISRS	Inibidor Seletivo da Recaptação da Serotonina	Selective Serotonin Reuptake Inhibitors
MC-R	Receptor Melanocortinérgico	Melanocortin Receptor
MC4-R	Receptor Melanocortinérgico 4	Melanocortin Receptor 4
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação	_____
NaCl	Cloreto de Sódio	Sodium Chloride
NPY	Neuropeptídeo Y	Neuropeptide Y
NTS	Núcleo do Trato Solitário	Nucleus Tractus Solitarius
PBS	Tampão Fosfato Salino	Phosphate Buffered Saline
Peptídeo YY		
POMC	Proopiomelanocortina	Proopiomelanocortin
RESBCAL	Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório	_____
RO-600175	Agonista seletivo do receptor 5-HT _{2C}	5-HT _{2C} receptor selective agonist – (S)-2-(6-chloro-5fluoroindol-1-yl)-1-methylethylamine
SAL	Salina	Saline
SERT	Transportador da Serotonina	Serotonin Transporter
SCS	Sequência Comportamental de Saciada	Behavioural Satiety Sequence
SNC	Sistema Nervoso Central	Central Nervous System
S100B	_____	S100 Calcium-binding Protein B

TGI	Trato Gastrointestinal	_____
TpH	Triptofano Hidroxilase	Tryptophan Hydroxilase
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco	Federal University of Pernambuco
α-MSH	Hormônio alfa-Melanócito Estimulante	alfa-Melanocyte Stimulating Hormone
5-HT	5-Hidroxitriptamina Serotonina	5-Hydroxytryptamine Serotonin
5-HT_{1A}	Receptor 5-HT _{1A}	5-HT _{1A} receptor
5-HT_{1B}	Receptor 5-HT _{1B}	5-HT _{1B} receptor
5-HT_{2C}	Receptor 5-HT _{2C}	5-HT _{2C} receptor

SUMÁRIO

1. DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. Plasticidade fenotípica, serotonina e desenvolvimento encefálico.	14
2.2. Efeitos precoces e tardios da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina sobre o sistema nervoso	16
2.3. Alterações comportamentais consequentes da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina	18
2.4. Regulação do comportamento alimentar pela serotonina via núcleo arqueado	19
2.5. Inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina e o comportamento alimentar	23
3. HIPÓTESE	25
4. OBJETIVOS	26
4.1. Objetivo geral	26
4.2. Objetivos específicos	26
5. MÉTODO	27
5.1. Animais	27
5.2. Grupos experimentais	27
5.3. Estereotaxia	30
5.4. Peso corporal	31
5.5. Comportamento alimentar	32
5.6. Reatividade neuronal no Arc	33
5.7. Estatística	34
6. RESULTADO	35
6.1. Artigo original	35
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	51
REFERÊNCIAS	53
ANEXO A	63

1. DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA

A plasticidade fenotípica compreende a capacidade de adaptação do organismo às modificações ambientais. Particularmente, nas fases de gestação e lactação há maior sensibilidade aos estímulos externos (plasticidade do desenvolvimento) os quais induzem respostas adaptativas e repercussões ao longo da vida. Com base nessa teoria, nossa equipe tem se dedicado ao estudo de alterações no sistema serotoninérgico e suas consequências em longo prazo. A serotonina (5-HT) desempenha função determinante para o desenvolvimento do sistema nervoso. Esta monoamina funciona como uma molécula sinalizadora e regula os processos de neurogênese, diferenciação e maturação neuronal, modulando a formação dos sistemas de neurotransmissão.

Além disso, a 5-HT participa do controle central homeostático do balanço energético. Através dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}, respectivamente, a serotonina inibe neurônios que produzem neuropeptídeos orexígenos (NPY-neuropeptídeo Y e AgRP-peptídeo relacionado ao agouti) e estimula neurônios que expressam neuropeptídeos anorexígenos (POMC-pró-opiomelanocortina e CART-transcrito relacionado à cocaína e anfetamina) localizados no núcleo arqueado (Arc) do hipotálamo, resultando em saciedade e aumento do gasto energético. Assim, a modificação da atividade serotoninérgica durante o desenvolvimento pode alterar o sistema de controle e a expressão do comportamento alimentar em longo prazo.

Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina são fármacos que se ligam à proteína transportadora da serotonina e aumentam a disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica. Esses medicamentos são prescritos na clínica para o tratamento de gestantes e lactantes com depressão, e passam para o feto e neonato através da placenta e leite materno, impactando seu desenvolvimento. Vários estudos demonstraram que a Inibição Seletiva Neonatal da Recaptação de Serotonina (ISNRS) promove prejuízo no crescimento, retardo no desenvolvimento neuromotor, alterações morfológicas e moleculares no sistema serotoninérgico e alterações em diversos aspectos comportamentais. Além disso, a exposição a fármacos antidepressivos durante o desenvolvimento foi relacionada a doenças psíquicas como a depressão, autismo e esquizofrenia. Esses achados demonstram que o aumento da atividade serotoninérgica durante o desenvolvimento promove respostas adaptativas e alterações das funções reguladas pela 5-HT. No entanto, poucos estudos têm investigado os efeitos da inibição neonatal da recaptação de serotonina sobre o comportamento alimentar na vida adulta.

Estudos de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a ISNRS, através de fármacos como a sertralina, fluoxetina e citalopram, modifica o fenótipo alimentar do animal adulto, caracterizado por hipofagia e menor peso corporal. Nós acreditamos que isso ocorre devido ao aumento da atividade da via anorexígena no Arc, principal núcleo hipotalâmico envolvido no controle do comportamento alimentar. Dessa forma, este estudo visou investigar o comportamento alimentar e a reatividade neuronal no Arc contra proteína c-fos em resposta à injeção intracerebroventricular dos agonistas dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B}, a fim de caracterizar melhor as repercussões tardias da ISNRS sobre os elementos envolvidos no controle central do comportamento alimentar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Plasticidade fenotípica, serotonina e desenvolvimento encefálico.

Na biologia, o fenótipo resulta da interação entre genótipo e ambiente. O conceito da plasticidade fenotípica compreende a habilidade do organismo de responder às modificações ambientais através de adaptações biológicas irreversíveis (WEST-EBERHARD, 1986; WEST-EBERHARD, 2005^a). Mais especificamente, no contexto da biologia evolucionista, a plasticidade do desenvolvimento compreende a habilidade de elaborar novos fenótipos em resposta a novas condições ambientais durante o desenvolvimento. (WEST-EBERHARD, 2005^a; GLUCKMAN et al., 2009). Esta habilidade de adaptação fenotípica associada a fatores genéticos origina as especiações (WEST-EBERHARD, 2005^a; WEST-EBERHARD, 2005^b).

As fases de gestação e lactação são consideradas períodos críticos de vulnerabilidade para o desenvolvimento do sistema nervoso (RICE; BARONE, 2000). Isso significa que durante período crítico de desenvolvimento o organismo é mais responsivo aos estímulos ambientais, os quais têm maior potencial de induzir alterações morfofuncionais e comportamentais (RICE; BARONE, 2000). No entanto, tais adaptações fenotípicas podem se expressar ou não durante a vida do organismo, a depender dos fatores ambientais incidentes sobre ele após o período perinatal (GLUCKMAN et al., 2009).

No contexto do desenvolvimento encefálico, a serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) exerce função determinante (DAUBERT; CONDRON, 2010). A 5-HT inicia sua ação sobre o desenvolvimento precocemente. Antes do aparecimento das células serotoninérgicas embrionárias, a formação encefálica é modulada pela 5-HT exógena produzida pela placenta (BONNIN et al., 2011). Somente por volta do 15º dia de embriogênese, a serotonina endógena produzida pelo sistema serotoninérgico começa a substituir a serotonina placentária (BONNIN et al., 2011; BONNIN; LEVITT, 2011). Há também a influência dos níveis maternos da enzima triptofano hidroxilase sobre a atividade dessa enzima no encéfalo do embrião (LAUDER et al., 1981).

Em camundongos, as células serotoninérgicas embrionárias são identificáveis a partir do 12º dia gestacional (HENDRICKS et al., 2003). Lauder e colaboradores demonstraram, através de estudos em ratos, que dois grupos de núcleos na medula primitiva originam o sistema serotoninérgico. O grupo caudal (B1-5) emite projeções

axonais descendentes para a medula espinhal e correspondem aos núcleos *pallidus*, *magnus*, *pontis* e *obscurus* da rafe no tronco encefálico. O grupo rostral (B6-8) origina as projeções ascendentes para o encéfalo e correspondem aos núcleos dorsal e mediano da rafe no tronco encefálico (LAUDER; KREBS, 1978; LAUDER et al., 1982; LAUDER, 1990). Até o nascimento, os axônios serotoninérgicos alcançam as regiões-alvo, mas a sinaptogênese, assim como o pico dos níveis de 5-HT, ocorre durante a lactação (WHITAKER-AZMITIA, 2010).

Nas fases embrionária e fetal, a 5-HT acumula diversas funções. Essa monoamina regula a neurogênese, indiretamente, estimulando a diferenciação e inibindo a divisão celular (WHITAKER-AZMITIA, 2010). Além disso, essa molécula sinalizadora tem efeito autorregulatório, controlando o crescimento do próprio sistema serotoninérgico, e neuroprotetor, controlando a apoptose (GOLDBERG, 1998; AHLEMEYER et al., 2000; VITALIS et al., 2007). Esses efeitos são mediados pelo fator trófico S100B liberado pelas células astrogliais, as quais apresentam o receptor 5-HT_{1A} (DAVAL et al., 1987^{a,b}; AHLEMEYER et al., 2000; RAMOS et al., 2004).

No período de lactação em ratos (três primeiras semanas de vida), ocorrem os processos de maturação dos sistemas de neurotransmissão influenciados pela serotonina. Na primeira semana pós-natal ocorre o alongamento axonal (WHITAKER-AZMITIA, 2010). Nas 2^a e 3^a semanas seguintes ocorrem a sinaptogênese e a elaboração dendrítica (WHITAKER-AZMITIA, 2010). Em humanos, essas etapas correspondem ao último trimestre de gestação e dois primeiros anos de vida (WHITAKER-AZMITIA, 2010). A 5-HT modula esses processos de maturação também pela ativação dos receptores 5-HT_{1A} presentes nas células astrogliais que por sua vez liberam de fatores de crescimento como o S100B (AZMITIA et al., 1990; WHITAKER-AZMITIA et al., 1990; WHITAKER-AZMITIA; AZMITIA, 1994).

A diversidade de funções desempenhadas pela 5-HT demanda de seus níveis ideais para o desenvolvimento encefálico normal. Isso também sugere que fatores ambientais que promovam a alteração da atividade serotoninérgica nessa fase da vida podem promover adaptações fenotípicas e modificação de funções reguladas pela 5-HT.

2.2. Efeitos precoces e tardios da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina sobre o sistema nervoso

Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) são fármacos que se ligam e, portanto, bloqueiam os sítios de ligação da proteína transportadora da serotonina (SERT) (SGHENDO; MIFSUD, 2012). A SERT desempenha a função de capturar a 5-HT da fenda sináptica de volta para o neurônio pré-sináptico (SGHENDO; MIFSUD, 2012). Dessa forma, esses fármacos impedem a recaptação de 5-HT, aumentando seu tempo de ação na fenda sináptica (SGHENDO; MIFSUD, 2012). Além disso, o aumento prolongado da atividade serotoninérgica promove “*downregulation*” do autorreceptor 5-HT_{1A} com consequente aumento da síntese e liberação de 5-HT, efeito secundário sinérgico à ação primária dos ISRS (SGHENDO; MIFSUD, 2012).

Esses fármacos são utilizados como antidepressivos e prescritos na clínica para o tratamento da depressão pós-parto (HENDRICK, 2003). No entanto, os ISRS e seus metabólitos também chegam ao neonato através do leite materno (KRISTENSEN et al., 1999; GENTILE et al., 2007; TANOSHIMA et al., 2014; ORSOLINI; BELLANTUONO, 2015). Nesse contexto, diversos são os estudos, inclusive do nosso grupo de pesquisa, que investigam o impacto do aumento neonatal da atividade serotoninérgica sobre o desenvolvimento e suas repercussões ao longo da vida.

A inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina (ISNRS) gera mudanças nos circuitos neuronais do encéfalo que persistem em longo prazo (BORUE et al., 2007). Mais especificamente, ocorrem mudanças nos circuitos serotoninérgicos (MACIAG et al., 2006). A exposição neonatal à fluoxetina (um ISRS) promoveu hipotrofia do sistema serotoninérgico com redução do número, área, perímetro e diâmetro de neurônios 5-HT situados no núcleo dorsal da rafe, bem como redução o número de terminações serotoninérgicas no giro denteado do hipocampo em ratos aos 60 dias de vida (SILVA et al., 2010). A exposição neonatal a fluoxetina também gera alterações morfológicas além do sistema serotoninérgico, como por exemplo, em neurônios corticais (LEE, 2009; LIAO; LEE, 2011).

A exposição neonatal à fluoxetina também promoveu alteração na estrutura neuronal do sistema límbico. Foi observada arborização dendrítica mais exuberante em neurônios piramidais do córtex pré-frontal medial e menos densa em neurônios piramidais do córtex pré-frontal medial, bem como da amígdala basolateral em ratos adultos (KO et al., 2014). Rebello e colaboradores (2014) também observaram hipotrofia de neurônios

piramidais na sub-região infralímbica do córtex pré-frontal em camundongos adultos (REBELLO et al., 2014). Em camundongos, a exposição neonatal a fluoxetina promoveu redução da densidade dendrítica aos 22 dias de vida e, aumento aos 90 dias em neurônios do hipocampo (ZHENG et al., 2011).

Os níveis encefálicos de 5-HT e da enzima TPH em ratos adultos não foram alterados pela INRS (KO et al., 2014). Outros estudos observaram redução de 5-HT e SERT na vida adulta após exposição neonatal a antidepressivos (FEENSTRA et al., 1996; HANSEN; MIKKELSEN, 1998). Já, a exposição perinatal à ISRS promoveu redução da enzima TPH no núcleo dorsal da rafe, da expressão gênica do SERT no córtex e da atividade serotoninérgica, na vida adulta (CABRERA-VERA; BATTAGLIA, 1998; BORUE et al., 2007).

A maior disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica também induz alterações na expressão dos receptores serotoninérgicos. Camundongos *knockout* para SERT, situação que poderia ser comparada com a inibição farmacológica perinatal do SERT, apresentam mudanças compensatórias na expressão de receptores 5-HT (LI, 2006; BORUE et al., 2007). Portanto, muitos dos fenótipos comportamentais observados nestes animais devem existir devido à ativação excessiva do receptor 5-HT_{1A} (BORUE et al., 2007).

A exposição neonatal à fluoxetina promoveu aumento da expressão gênica e proteica da S100B em determinadas regiões encefálicas como o hipocampo em curto prazo, o que pode alterar o crescimento das fibras serotoninérgicas (BOCK et al., 2013). A exposição neonatal à fluoxetina também aumentou a expressão gênica do BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) na vida adulta, sem diferença epigenética nas regiões promotoras (KARPOVA et al., 2009). Nesse estudo, o tratamento crônico com fluoxetina na vida adulta restaurou as alterações moleculares e comportamentais, sugerindo o BDNF como um mecanismo através do qual a INRS promove efeitos em longo prazo sobre o comportamento (KARPOVA et al., 2009).

Ratos submetidos à ISNRS apresentaram retardo da maturação física e da ontogênese de reflexos, além de menor crescimento somático e crânio-encefálico (DEIRÓ et al., 2004; 2006; 2008; MAGALHÃES et al., 2006). Ratos neonatos expostos à fluoxetina na primeira semana de vida apresentaram déficit na coordenação motora (ZIMMERBERG; GERMEYAN, 2015). O déficit na atividade locomotora observada em ratos adolescentes expostos à fluoxetina nos quatro primeiros dias de vida foi

associado à redução da densidade dendrítica em neurônios do estriado e do córtex motor primário (LEE, 2012). A INRS na primeira semana de vida também promoveu déficit da capacidade sensório-motora em ratos adultos (KO et al., 2014).

2.3. Alterações comportamentais consequentes da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina

A alteração dos níveis de serotonina durante a lactação modifica não apenas a morfologia encefálica, mas também o perfil comportamental ao longo da vida (AZMITIA et al., 2011). Estudos realizados em ratos demonstraram que a exposição neonatal à fluoxetina tem efeito ansiolítico em animais aos 60 dias de vida (DA SILVA et al., 2014). Já em outro estudo, a exposição a esse fármaco apenas na primeira semana de vida não promoveu alteração da ansiedade em ratos jovens e adultos (ZIMMERBERG; GERMEYAN, 2015). Da mesma forma, exposição à fluoxetina do 4º ao 21º dia pós-natal ou durante toda a lactação não alterou indicadores de ansiedade em camundongos ou ratos adultos, respectivamente (ANSORGE et al., 2008; RIBAS et al., 2008; KARPOVA et al., 2009). Por outro lado, camundongos tratados com fluoxetina na lactação demonstraram aumento de comportamentos típicos de ansiedade aos 90 dias (REBELLO et al., 2014). Esses dados contraditórios podem ser atribuídos a diferenças metodológicas como período de aplicação do fármaco durante a lactação, idade de avaliação do comportamento e tipo de animal experimental utilizado.

Em ratos adultos, a exposição neonatal a fluoxetina promoveu redução da agressividade e do comportamento depressivo, bem como aumento da interação social (MANHÃES-DE-CASTRO et al., 2001; MENDES-DA-SILVA et al., 2002; KO et al., 2014). Por outro lado, Rebello e colaboradores (2014) demonstraram aumento de comportamentos típicos de depressão e medo em camundongos adultos tratados com esse fármaco na lactação (REBELLO et al., 2014). Além disso, a exposição à fluoxetina apenas na primeira semana de vida reduziu o comportamento social em ratos jovens e adultos apontando para o risco de desordens do espectro autista (RODRIGUEZ-PORCEL et al., 2011; ZIMMERBERG; GERMEYAN, 2015). Juntos esses achados demonstram que a INRS promove alterações tardias sobre os comportamentos emocional, social e afetivo.

Em ratos e camundongos adultos, a exposição neonatal a fluoxetina promoveu prejuízo na atividade locomotora (ANSORGE et al., 2004; RIBAS et al., 2008; ZHENG et al., 2011; KO et al., 2014). Também foi observado redução do comportamento

exploratório e aumento da latência de fuga em camundongos adultos (ANSORGE et al., 2004; ANSORGE et al., 2008; KARPOVA et al., 2009). Curiosamente, muitas das alterações comportamentais consequentes da inibição neonatal da recaptação de serotonina não são encontradas ou são contrárias em animais expostos ao tratamento crônico na vida adulta (ANSORGE et al., 2004; ANSORGE et al., 2008). Essa observação sugere que os efeitos demonstrados são específicos da exposição a ISRS durante o desenvolvimento (“*developmentally-depedent effects*”) (ANSORGE et al., 2004; BORUE et al., 2007; ANSORGE et al., 2008; WHITAKER-AZMITIA, 2010).

A ISNRS realizada em modelos animais corresponde à exposição a antidepressivos no último trimestre gestacional e dois primeiros anos de vida em humanos (WHITAKER-AZMITIA, 2010). Nesta revisão, não foram encontrados estudos que investigassem os efeitos em longo prazo da exposição à ISRS durante o desenvolvimento sobre aspectos comportamentais em humanos. Em curto prazo, estudos em humanos demonstram que exposição *in utero* a ISRS promove síndrome de abstinência nos primeiros dias de vida com irritabilidade, tremores, agitação e rigidez (NORDENG et al., 2001; ZESKIND; STEPHENS, 2004; SANZ et al., 2005).

Durante os períodos críticos de desenvolvimento, portanto, várias influências ambientais, como fármacos, podem interferir no processo de maturação neuronal e modificar as funções reguladas pela 5-HT.

2.4. Regulação do comportamento alimentar pela serotonina via núcleo arqueado

O hipotálamo é um importante centro da regulação homeostática do comportamento alimentar, sendo o núcleo arqueado (Arc) a principal área hipotalâmica envolvida neste controle (VALASSI et al., 2008; LEITE; BRANDÃO-NETO, 2009). O Arc localiza-se em posição adjacente ao terceiro ventrículo e à eminência mediana, e está sujeito à influência de sinais circulantes na corrente sanguínea (CONE, 2005). Funcionalmente, o ARC é constituído por dois grupos de neurônios, os que expressam os neuropeptídeos orexígenos NPY (neuropeptídeo Y) e AgRP (peptídeo relacionado ao agouti) e estimulam a fome, e os que produzem os neuropeptídeos anorexígenos POMC (pró-opiomelanocortina) e CART (transcrito relacionado à cocaína e anfetamina) e induzem a saciedade (MORTON et al., 2006; VALASSI et al., 2008; LEITE; BRANDÃO-NETO, 2009).

A regulação homeostática da ingestão alimentar através do Arc é feita por fatores periféricos que consistem em hormônios e peptídeos produzidos pelo tecido adiposo, pâncreas e trato gastrintestinal (VALASSI et al., 2008; LEITE; BRANDÃO-NETO, 2009). Os fatores centrais, por sua vez, são representados por neurotransmissores e neuropeptídeos (VALASSI et al., 2008; LEITE; BRANDÃO-NETO, 2009). Dessa forma, fome e saciedade são resultantes da atividade das vias hipotalâmicas orexígenas e anorexígenas, em função do balanço energético do organismo e dos sinais que convergem ao Arc.

Os fatores periféricos chegam ao sistema nervoso central (SNC) através da corrente sanguínea ou de vias aferentes onde são integrados para a regulação da ingestão alimentar (VALASSI et al., 2008; LEITE; BRANDÃO-NETO, 2009). A leptina (e outras adipocinas) produzida pelo tecido adiposo e a insulina, produzida pelas células beta-pancreáticas, são liberadas constantemente em função da adiposidade e da glicemia, constituindo sinais de longo prazo na regulação da ingestão alimentar (CONE, 2005). Juntos, estes dois hormônios agem diretamente em receptores localizados no hipotálamo e no núcleo do trato solitário (NTS) inibindo os neurônios orexígenos (NPY/AgRP) e estimulando os anorexígenos (POMC), com efeito saciogênico (CONE, 2005; MORTON et al., 2006; VALASSI et al., 2008; LEITE; BRANDÃO-NETO, 2009).

Por outro lado, os fatores de saciedade gerados no trato gastrointestinal (TGI) durante a ingestão de alimentos consistem em sinalização de curto prazo, regulando o consumo alimentar em cada refeição (VALASSI et al., 2008; LEITE; BRANDÃO-NETO, 2009). A grelina é produzida pelo estômago em estado de balanço energético negativo (hipoglicemia) e induz a fome estimulando os neurônios orexígenos e inibindo os anorexígenos (VALASSI et al., 2008; LEITE; BRANDÃO-NETO, 2009). Já os outros peptídeos gastrointestinais, como a colecistocinina, o peptídeo YY e o GLP-1, levam à saciedade estimulando os neurônios anorexígenos e inibindo os orexígenos (LEITE; BRANDÃO-NETO, 2009; MORTON et al., 2006; VALASSI et al., 2008). Estes sinais gastrointestinais, além de outros provenientes da cavidade oral e do fígado ativam vias aferentes vagais e simpáticas que chegam ao NTS. Este, por sua vez, estabelece conexões bidirecionais com o Arc (CONE, 2005; VALASSI et al., 2008; LEITE; BRANDÃO-NETO, 2009). Dessa forma, direta e/ou indiretamente, o núcleo

arqueado consiste em importante centro de integração para a regulação do comportamento alimentar.

Dentre os fatores centrais que regulam o comportamento alimentar, destaca-se o papel do sistema serotoninérgico sobre os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} e suas interações com o sistema melanocortinérgico. Os neurônios serotoninérgicos emitem projeções para diversas regiões encefálicas envolvidas no controle do balanço energético, a saber, os núcleos arqueado, paraventricular, ventromedial e dorsomedial do hipotálamo, a área lateral hipotalâmica, o núcleo do trato solitário e o núcleo parabraquial (XU et al., 2008; MARSTON et al., 2011). No entanto, o Arc parece ser o sítio chave de ação da 5-HT sobre o apetite (MARSTON et al., 2011).

Estudos utilizando a eliminação sistemática de receptores serotoninérgicos indicaram que os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} são os mais criticamente envolvidos na modulação da homeostase energética pela 5-HT (TECOTT et al., 1995; LUCAS et al., 1998; HEISLER et al., 2006). Heisler e colaboradores, através de vários estudos anatômicos, eletrofisiológicos e comportamentais, demonstraram como ocorre o efeito hipofágico da serotonina através dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}.

O receptor 5-HT_{1B} é expresso nos neurônios NPY/AgRP do ARC. Através deste receptor, a serotonina hiperpolariza e reduz a atividade das células orexígenas, inibindo a liberação de AgRP (HEISLER et al., 2006). Ao mesmo tempo, através dos mesmos receptores presentes nas projeções GABAérgicas inibitórias dos neurônios NPY/AgRP para as células POMC, a 5-HT hiperpolariza essas projeções e facilita a liberação do hormônio alfa-melanócito estimulante (α -MSH) (COWLEY et al., 2001; ROSEBERRY et al., 2004; HEISLER et al., 2006).

Por sua vez, o receptor 5-HT_{2C} é co-expresso nas células que produzem a POMC, precursora do α -MSH (HEISLER et al., 2002; LAM et al., 2008). Através deste receptor, a serotonina estimula as células anorexígenas e a síntese da POMC (HEISLER et al., 2002; HEISLER et al., 2006). Assim, via ativação dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}, a 5-HT reduz liberação de neuropeptídeos orexígenos e aumenta a expressão de neuropeptídeos anorexígenos, levando à saciedade.

Camundongos com deficiência global do receptor 5-HT_{2C} ("*5-HT_{2C} null mice*") desenvolvem um fenótipo de hiperfagia, obesidade (com aumento da massa gorda, redução da massa magra e aumento da leptina sérica) e resposta atenuada a agentes 5-

HT anorexígenos. Contudo, estes efeitos são normalizados em camundongos 5-HT_{2C}/POMC, demonstrando que a expressão dos receptores 2C apenas nas células POMC é suficiente para mediar o efeito saciogênico da serotonina (XU et al., 2008). O receptor 5-HT_{2C} tem uma relação direta com o tamanho da refeição. Xu e colaboradores (2008) também demonstraram que camundongos com deficiência global do receptor 5-HT_{2C} apresentam o tamanho da refeição maior em relação aos animais controle, enquanto a frequência alimentar é semelhante entre os grupos (XU et al., 2008). Este efeito também foi normalizado em camundongos 5-HT_{2C}/POMC, ou seja, a hiperfagia foi revertida com a antecipação do ponto de saciedade.

O sistema melanocortinérgico central é o sítio chave de ação da 5-HT na estimulação da hipofagia (HEISLER et al., 2006). Em camundongos, foi observado que a obesidade pode resultar da deleção do gene POMC ou de receptores melanocortinérgicos (MC) (CONE, 2005). Da mesma forma, em humanos, evidências genéticas demonstraram que a disfunção do sistema das melanocortinas induz hiperfagia e obesidade precoce (O'RAHILLY; FAROOQI, 2008; MARSTON et al., 2011). Este sistema é constituído pelos neurônios de primeira ordem POMC e NPY/AgRP do núcleo arqueado, pelos neurônios de segunda ordem que expressam receptores MC localizados nas regiões-alvo e por uma pequena quantidade de neurônios POMC do NTS. Entretanto, a maior expressão de POMC no SNC ocorre no Arc (CONE et al., 2005; VALASSI et al., 2008).

Os neurônios POMC e AgRP projetam seus axônios para várias regiões encefálicas (hipotálamo, tálamo, amígdala, tronco encefálico) que expressam receptores MC. Estes receptores relacionam-se ao controle da homeostase energética, no entanto, o núcleo paraventricular do hipotálamo está particularmente relacionado ao comportamento alimentar (CONE, 2005; VALASSI et al., 2008; MARSTON et al., 2011). Especificamente, o receptor MC4 é o mecanismo através do qual a 5-HT afeta o comportamento alimentar reduzindo a ingestão alimentar, tendo como agonista o α -MSH, derivado da POMC, e como antagonista o AgRP (CONE, 2005; HEISLER et al., 2006; LAM et al., 2008; MARSTON et al., 2011). Assim, ação simultânea da 5-HT sobre os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} promove a expressão de POMC no núcleo arqueado e a ativação da via das melanocortinas, tendo como consequência a saciedade.

Já está bem estabelecida na literatura a necessidade da serotonina encefálica para a manutenção do balanço energético e sua relação inversa com o consumo alimentar

(MARSTON et al., 2011). Vários estudos já associaram a alteração da função serotoninérgica com desordens alimentares (BREWRETON; JIMERSON, 1996; MONTELEONE et al., 2000). Por exemplo, pacientes com bulimia nervosa apresentam diminuição da sensibilidade/responsividade do sistema serotoninérgico e redução da concentração plasmática de triptofano (PIJL et al., 1995; JIMERSON et al., 1997; ASKENASY et al., 1998; WOLFE et al., 2000). A partir disso, a manipulação farmacológica do sistema serotoninérgico tem sido apontada para perda de peso na obesidade e tratamento de distúrbios alimentares (HILL; BLUNDELL, 1990).

Muitos ensaios clínicos demonstraram a eficácia do tratamento da obesidade, bulimia e anorexia nervosa com fármacos serotoninérgicos (fluoxetina, escitalopram, sibutramina, d-fenfluramina), sublinhando a importância da regulação serotoninérgica no controle da ingestão alimentar (PIJL et al., 1991^{a,b}; FAHY et al., 1993; LAWTON et al., 1995; ARNOLD et al., 2002; LEOMBRUNI et al., 2006; GRUDELL et al., 2008; LEOMBRUNI et al., 2008; GUERDJIKOVA et al., 2008). Assim, levando em consideração o papel sofisticado da serotonina na regulação do comportamento alimentar e na sinalização do neurodesenvolvimento, deve-se considerar, segundo a teoria da plasticidade fenotípica, que a alteração dos níveis desta monoamina durante o período neonatal pode modificar a expressão do comportamento alimentar na vida adulta.

2.5. Inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina e o comportamento alimentar

Poucos estudos avaliam os efeitos da ISNRS sobre o comportamento alimentar ao longo da vida. Foi observado que a ISNRS promove aumento da latência para comer em testes de hiponeofagia em camundongos adultos (ANSORGE et al., 2004; ANSORGE et al., 2008). Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem se concentrado em investigar os efeitos do aumento neonatal dos níveis de serotonina utilizando-se ISRS sobre o comportamento alimentar em ratos na vida adulta.

Dados não publicados de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a ISNRS altera o comportamento alimentar (sequência comportamental de saciedade) com antecipação da saciedade e redução da ingestão alimentar relativa, bem como do tempo de alimentação em ratos aos 180 dias de vida. Esses animais também apresentaram aumento da quantidade de serotonina no hipotálamo e do número de neurônios ativos no Arc após estímulo alimentar. Dessa forma, a ISNRS parece modificar o fenótipo alimentar caracterizado por hipofagia.

Além disso, a ISNRS promoveu maior expressão do receptor 5-HT_{2C} no hipotálamo associada a menor acúmulo de tecido adiposo abdominal após exposição prolongada à dieta hiperlipídica/hipercalórica (GALINDO et al., 2015). Nós acreditamos que isso ocorre devido ao aumento da atividade da via anorexígena no Arc. A partir deste ponto surge, então, a necessidade de realizar estudos no sentido de investigar, especificamente, o comportamento alimentar e a magnitude de neurônios reativos no Arc em resposta à alimentação e a injeção intracerebroventricular dos agonistas dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B}.

3. HIPÓTESE

A inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina promove hipofagia associada à maior reatividade neuronal após estímulo com o agonista do receptor 5-HT_{2C} e menor reatividade neuronal em resposta ao agonista do receptor 5-HT_{1B} no núcleo arqueado do hipotálamo em ratos adultos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Estudar os efeitos da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina sobre o comportamento alimentar e a reatividade neuronal no núcleo arqueado (Arc) do hipotálamo em resposta a agonistas serotoninérgicos em ratos adultos.

4.2. Objetivos específicos

- a) Mensurar o peso corporal aos 180 dias de vida.
- b) Avaliar a sequência comportamental de saciedade após estímulo com os agonistas dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B} aos 180 dias de vida.
- c) Quantificar o número de neurônios reativos contra proteína c-fos no Arc, através de imunofluorescência, após estímulo com os agonistas dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B} aos 180 dias de vida.

5. MÉTODO

5.1. Animais e biotério

Para realização deste projeto de pesquisa, foi obtida aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (CEUA – CCB/UFPE) (Ofício 305/2010) (ANEXO A). Este estudo seguiu a “DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS - DBCA” e as “DIRETRIZES PARA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA” de 2013, elaborada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

Foram utilizados ainda, os guias “GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS” e “RECOGNITION AND ALLEVIATION OF PAIN IN LABORATORY ANIMALS”, elaborados pelo “Institute for Laboratory Animal Research” do “National Research Council of the National Academies” (EUA). Artigos nas áreas da Ciência em Animais de Laboratório também foram considerados.

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os experimentos foram realizados no biotério de experimentação animal do Anexo do Departamento de Anatomia da UFPE, sob as seguintes condições: temperatura de $23^{\circ}\text{C}\pm 1$, sistema de exatidão, ciclo claro-escuro de 12/12 horas invertido (fase escura: das 06 às 18h / fase clara: das 18 às 06h) e livre acesso à água e ração padrão de biotério (Purina®).

Os animais foram alocados em gaiolas brancas opacas com maravalha contendo até três ratos cada. Para a realização dos testes comportamentais, os animais foram alocados individualmente em gaiolas transparentes de polipropileno (45x30x20 cm) 10 dias antes dos experimentos, dessa forma, puderam ver, ouvir e sentir o cheiro dos ratos nas caixas adjacentes, evitando o isolamento social (RODGERS et al., 2010).

5.2. Grupos experimentais

Ratas virgens (n=5), com 120 dias de vida e peso ideal para a idade (220 gramas) foram transportadas para o biotério de experimentação e alocadas na proporção de duas fêmeas por gaiola. Após período de adaptação de 15 dias, ratas em período estral foram colocadas para acasalamento na proporção de duas fêmeas para um macho. A prenhez foi confirmada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal e pelo aumento

progressivo do peso corporal das ratas, as quais foram alocadas individualmente até o nascimento dos filhotes.

No primeiro dia pós-natal (1° DPN), que compreende o primeiro ciclo escuro seguinte ao nascimento dos filhotes, foram realizadas a sexagem e a composição das ninhadas (n=5). Cada uma das ninhadas foi formada pela nutriz e oito neonatos machos com peso corporal entre 6 e 8 gramas. Para completar as ninhadas com menos de oito machos, foram utilizadas fêmeas. O acasalamento e a composição das ninhadas foram feitos com base na revisão de Bento-Santos e colaboradores (2012) publicada pela Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (RESBCAL).

Do 1° ao 21° DPN, foi realizada a inibição neonatal da recaptção de serotonina. Para isso foi utilizado o fármaco fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina, obtido na forma de cloridrato de fluoxetina (Bristol-USA®) e dissolvido em solução salina (NaCl 0.9%) para uma concentração de 10 mg/ml (SILVA et al., 2010). Os neonatos foram tratados com dose de 1 µl/g, por via subcutânea, diariamente, uma hora após o início do ciclo escuro (às 07 horas) (SILVA et al., 2010). Nesse horário ocorre o pico de liberação de 5-HT no hipotálamo, potencializando a ação do fármaco (MATEOS et al., 2009).

De cada ninhada (n=8 neonatos), quatro filhotes receberam solução salina e quatro filhotes foram tratados com fluoxetina, gerando dois grupos experimentais: Salina (SAL) e Fluoxetina (FLUO) (n=20 animais/grupo experimental). No 22° DPN foi realizado o desmame. As fêmeas (n=9) foram encaminhadas para experimentos de outros estudos e um macho adoeceu, não sendo utilizado para as avaliações deste estudo. Trinta machos seguiram para os experimentos seguintes (n=15 ratos/grupo experimental). Aos 170 dias de vida, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânula no ventrículo lateral direito. Aos 180 dias de vida, os animais dos grupos SAL e FLUO foram pesados e subdivididos, aleatoriamente, em seis grupos experimentais de acordo com o tipo de injeção intracerebroventricular (ICV) (Figura 1):

1- Grupo SAL+ACSF: animais do grupo SAL que receberam solução fisiológica de “*Artificial Cerebrospinal Fluid*” (ACSF), volume de 3µl, via ICV, n=5 animais/grupo (FLETCHER et al., 2009; CLISSOLD et al., 2013);

2- Grupo SAL+AG.1B: animais do grupo SAL que receberam agonista do receptor 5-HT_{1B} – CP 93129 (Tocris Biosciences®) – concentração de 1µg/0,5µl de ACSF, volume de 3µl, via ICV, n=5 animais/grupo (CLISSOLD et al., 2013);

3- Grupo SAL+AG.2C: animais do grupo SAL que receberam agonista do receptor 5-HT_{2C} – Ro 60-0175 ((S)-2-(6-chloro-5- fluorindol-1-yl)-1-methylethylamine fumarate) (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel®) – concentração de 0,05µg/µl de ACSF, volume de 3µl, via ICV, n=5 animais/grupo (FLETCHER et al., 2009);

4- Grupo FLUO+ ACSF: animais do grupo FLUO que receberam solução fisiológica de “*Artificial Cerebrospinal Fluid*” (ACSF), volume de 3µl, via ICV, n=5 animais/grupo (FLETCHER et al., 2009; CLISSOLD et al., 2013);

5- Grupo FLUO+AG.1B: animais do grupo FLUO que receberam agonista do receptor 5-HT_{1B} – CP 93129 (Tocris Biosciences®) – concentração de 1µg/0,5µl de ACSF, volume de 3µl, via ICV, n=5 animais/grupo (CLISSOLD et al., 2013);

6- Grupo FLUO+AG.2C: animais do grupos FLUO que receberam agonista do receptor 5-HT_{2C} – Ro 60-0175 ((S)-2-(6-chloro-5- fluorindol-1-yl)-1-methylethylamine fumarate) (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel®) – concentração de 0,05µg/µl de ACSF, volume de 3µl, via ICV, n=5 animais/grupo (FLETCHER et al., 2009);

A partir desses seis grupos experimentais (Figura 1), foram avaliados o comportamento alimentar e a imunoreatividade neuronal no Arc.

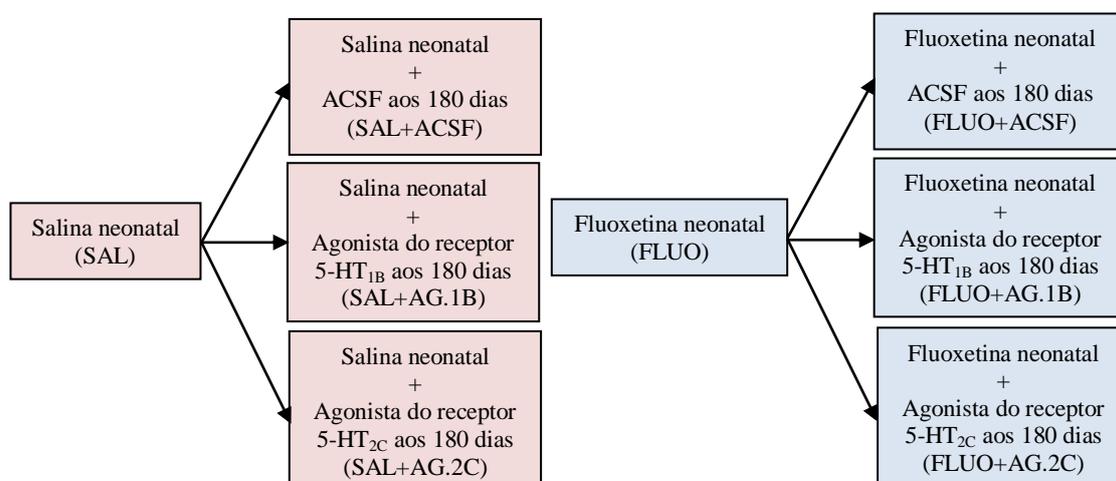


Figura 1: Organograma dos grupos experimentais.

5.3. Estereotaxia

No dia anterior à estereotaxia, foi adicionado analgésico na água dos animais (paracetamol em gotas, 1 gota/ml). Essa analgesia foi mantida até o 5º dia de pós-operatório. Aos 170 dias de vida, foi realizado o procedimento cirúrgico após anestesia via intramuscular com Ketamina (60mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina (7,5mg/Kg). Em seguida à perda do reflexo ciliar, os ratos foram colocados sobre placa de aquecimento (Insight®) a 37°C, fixados ao equipamento estereotáxico (Insight®) e submetidos à cirurgia de canulação de acordo com método previamente descrito (PAXINOS et al., 1980; CARVALHEIRA et al., 2001).

A perfuração do crânio para implantação da cânula obedeceu as seguintes coordenadas, a partir do bregma, segundo as diretrizes do atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (2005): -1 mm no eixo ântero-posterior, -2 mm no eixo látero-lateral e -5 mm no eixo crânio-caudal (Figura 2). Ao término do procedimento cirúrgico, foi aplicada dose única de Pentabiótico via subcutânea (10µl/100g). Os animais foram mantidos aquecidos com manta até completa recuperação anestésica.

Após sete dias de recuperação cirúrgica, a confirmação da canulação no ventrículo lateral direito foi realizada através do teste de ingestão de água como descrito a seguir (AJA et al., 2006). Para o teste, os animais foram privados de água por uma hora. Em seguida, foi realizada injeção ICV de 5 µl de angiotensina II diluída em ACSF (2 ng/µl). Após 30 minutos de livre acesso à água, a quantidade de água ingerida pelos animais foi calculada pela diferença entre os volumes de água oferecido e rejeitado. Considera-se que a cânula está posicionada no ventrículo lateral quando o animal consome um volume maior ou igual a 5 ml (AJA et al., 2006).

Este método baseia-se no conhecimento de que os centros da sede localizados no hipotálamo são ativados na presença de angiotensina II. Entretanto, é necessário que a angiotensina seja administrada no ventrículo lateral, de onde rapidamente se difunde para o terceiro ventrículo ativando os centros da sede em curto espaço de tempo (AJA et al., 2006). Dessa forma, observam-se os efeitos sobre consumo hídrico (AJA et al., 2006).

Para a realização das injeções ICV, foi utilizada seringa de Hamilton (100 µl) conectada a um tubo de prolipropileno fixado a uma agulha gengival (G30 – extra curta) com resina acrílica (Vipiflash®). A ponta da agulha era lixada durante a estereotaxia,

5.5. Comportamento alimentar

Aos 180 dias de vida, os ratos canulados foram submetidos à avaliação do comportamento alimentar através da análise da Sequência Comportamental de Saciedade (SCS), método descrito por Halford e colaboradores (1998) (HALFORD et al., 1998). Para realização da SCS, os animais foram submetidos a jejum de três horas. O jejum foi iniciado às 12 horas (seis horas após o início da fase escura do ciclo de luz), horário que corresponde ao início do segundo pico circadiano de alimentação dos ratos (SANCHEZ et al., 2008). Trinta minutos antes da SCS, os animais foram pesados e submetidos às injeções ICV de ACSF, agonista 5-HT_{1B} ou agonista 5-HT_{2C} de acordo com os grupos previamente determinados.

O estudo da SCS teve início com a oferta de 30 gramas de ração padrão de biotério. A partir desse momento, o animal foi filmado durante 60 minutos por câmera com sistema de infravermelho e o vídeo foi armazenado em computador. Após 60 minutos de exposição ao alimento, foram realizadas as medidas de consumo. A ingestão alimentar foi obtida pela diferença entre a quantidade de ração oferecida e a quantidade de ração restante no final da SCS. A partir dessa medida, foram calculadas a Ingestão Alimentar Relativa [razão entre a ingestão alimentar (g) e o peso corporal (g)] e a Taxa Alimentar [razão entre a ingestão alimentar relativa (g) e o tempo de alimentação (segundos)].

Posteriormente, apenas um avaliador treinado, sem prévio conhecimento dos grupos experimentais, analisou os filmes e quantificou os Tempos de Alimentação, Limpeza e Descanso. Para a determinação desses tempos, o tempo total da SCS (60 minutos) foi fracionado em 12 períodos de 5 minutos (300 segundos). Ao observar o vídeo, o avaliador cronometrou o tempo gasto em cada um dos comportamentos (Alimentação, Limpeza e Descanso) em cada período. Ao final da análise, os tempos de cada comportamento foram somados (em segundos). O Ponto de Saciedade foi determinado pela intersecção das linhas que representam as médias dos tempos dos comportamentos de alimentação e de descanso, ou seja, é o ponto onde há o declínio da alimentação e o início descanso. Já a Frequência Alimentar representa o número de vezes que o animal buscou o alimento.

5.6. Reatividade neuronal no Arc

Vários estudos têm detectado padrões únicos de expressão de c-fos em resposta a estímulos específicos, inclusive, estímulos alimentares (LOPES-DE-SOUZA et al., 2008; CHEN et al., 2011). Aos 180 dias de vida, a reatividade neuronal no Arc foi avaliada através de imunofluorescência contra proteína c-fos. Após a SCS (duração de uma hora), o alimento continuou disponível por mais trinta minutos, somando noventa minutos de exposição alimentar, tempo necessário para expressão da referida proteína (SAGAR et al., 1988).

Em seguida, os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com 200 ml de solução fisiológica (NaCl, 0,9%) e 400 ml de solução fixadora (4% de paraformaldeído em 4% de PBS, pH 7,4, a 4°C) (NOGUEIRA et al., 1997). Após perfusão, os encéfalos foram retirados do crânio, pós-fixados na mesma solução fixadora por quatro horas e armazenados em solução de sacarose (30%).

Posteriormente, os encéfalos foram crio-seccionados em criostato (Leica®) obtendo-se cinco séries de cortes coronais com 30 µm de espessura, os quais foram armazenados em placas de cultura contendo solução crioprotetora (“*Antifreezing*”) até o procedimento de imunofluorescência. Os cortes da segunda série correspondentes à região do Arc foram selecionados e montados sobre lâminas previamente gelatinizadas. Essas foram colocadas em cubas onde ocorreram as reações imunológicas.

Os cortes foram lavados com PBS (10 mM, pH 7,4), tratados com glicina (0,01 M) e albumina bovina (BSA) (2%) e incubados com anticorpo primário (1:2000), BSA (1%) e triton X-100 (0,2%), “*Overnight*” à 4°C. No dia seguinte, os cortes foram lavados com PBS e incubados com o anticorpo secundário (1 gota/ml) por noventa minutos à temperatura ambiente. Foram utilizados o anticorpo primário coelho anti-c-fos (Santa Cruz Biotechnology®) e o anticorpo secundário ALEXA 594 cabra anti-coelho (Life Technologies®). Ao término das reações, as lâminas foram montadas utilizando-se solução de montagem (89% de glicerol, 10% de PBS e 1% de DABCO) e lamínulas.

A visualização das lâminas e a captura das imagens foram feitas em microscópio de fluorescência (Zeiss®) acoplado a câmera. Posteriormente, as imagens adquiridas foram processadas no programa ImageJ® para quantificação dos neurônios reativos contra c-fos no Arc. Foram considerados os seguintes bregmas segundo as diretrizes do atlas estereotático de Paxinos e Watson (2005): -1.92 mm, -2.52 mm e -3.12 mm. O número

de neurônios reativos por animal foi determinado pela média aritmética das quantidades de neurônios reativos em cada bregma (Figura 3).

5.7. Estatística

Os dados foram apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média. Para a análise do peso corporal entre os grupos SAL e FLUO, foi realizado o teste *t student* ($p < 0,05$). Já para a análise da ingestão alimentar, tempo de alimentação, taxa alimentar, frequência alimentar e quantidade de neurônios imunoreativos entre os grupos SAL+ACSF, SAL+AG.1B, SAL+AG.2C, FLUO+ACSF, FLUO+AG.1B e FLUO+AG.2C, foi realizada análise de variância (ANOVA *two way*) e *Bonferroni's Post Test* ($p < 0,05$). O programa GraphPad Prism 5 foi utilizado para análise estatística e obtenção dos gráficos representativos.

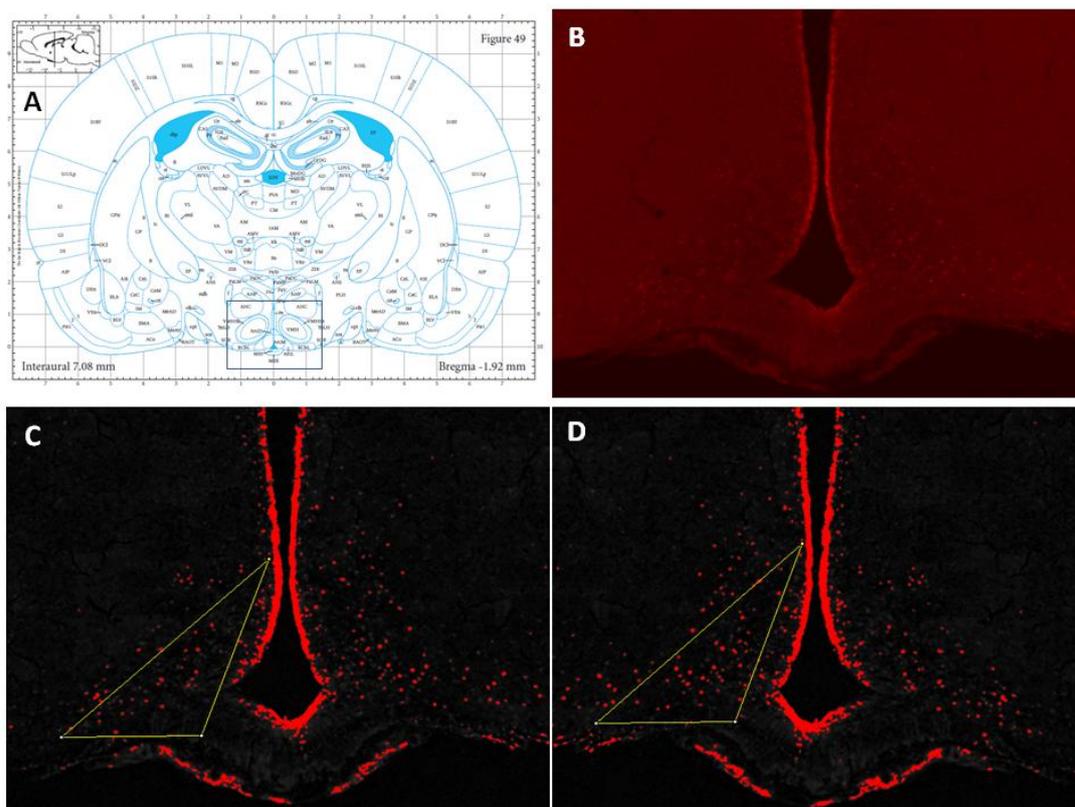


Figura 3: Método de quantificação do número de células reativas contra proteína c-fos no Arc. A: figura que correspondente ao bregma -1.92 mm em atlas estereotáxico; B: exemplo de imagem de corte histológico correspondente ao bregma -1.92 mm após imunofluorescência contra c-fos; C: quantificação neuronal do corte representado em B (lado direito); D: quantificação neuronal do corte representado em B (lado esquerdo). C e D obtidos durante a quantificação neuronal através do programa ImageJ®.

6. RESULTADO

6.1. Artigo original

Inibição Neonatal da Recaptação de Serotonina Aumenta a Imunorreatividade Neuronal no Núcleo Arqueado do Hipotálamo em Resposta a Agonista do Receptor 5-HT_{2C} em Ratos Adultos.

Manuella da Luz Duarte Barros¹, Sara Hadj Sadok², Aenoan Rayane de Souza Soares³, Yves Tourner⁴, Omar Guzmán Quevedo⁵, Lígia Cristina Monteiro Galindo⁶ e Raul Manhães de Castro⁷.

¹Programa de Pós-Graduação em Nutrição Atividade Física e Plasticidade Fenotípica do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão (CAV – UFPE); ²Departamento de Medicina (UFPE); ³Departamento de Fisioterapia (UFPE); ⁴CNRS/Inserm U1060, Centre Hospitalier Lyon-Sud, France; ⁵Neurocentre Magendie, Inserm U862, Bordeaux, France; ⁶Departamento de Anatomia (UFPE); ⁷Departamento de Nutrição (UFPE).

RESUMO: A plasticidade fenotípica compreende a capacidade do organismo de adaptar-se às condições ambientais. Durante os períodos críticos de desenvolvimento há maior responsividade aos estímulos externos, que podem levar a modificações morfofuncionais em longo prazo. Neste contexto, a serotonina (5-HT) tem papel determinante sobre o desenvolvimento do sistema nervoso. Além disso, a 5-HT participa do controle da ingestão alimentar estimulando a saciedade através da inibição de neurônios orexígenos e estimulação de neurônios anorexígenos via receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}, respectivamente, no núcleo arqueado (Arc) do hipotálamo. Dessa forma, a alteração da atividade serotoninérgica durante o desenvolvimento pode modificar a regulação e a expressão do comportamento alimentar na vida adulta. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina (ISNRS) sobre o peso corporal e, o comportamento alimentar e a imunoreatividade neuronal no Arc em resposta aos agonistas dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}, em ratos adultos. Ratos *Wistar* foram tratados com salina (SAL, n=15) ou fluoxetina (FLUO, n=15) do 1º ao 21º dia pós-natal. Aos 170 dias de vida foi realizada estereotaxia. Aos 180 dias foi realizada a pesagem dos animais seguida de injeção intracerebroventricular de ACSF, agonista do receptor 5-HT_{1B} ou agonista do receptor 5-HT_{2C}, obtendo-se seis grupos experimentais (n=5 animais /grupo): SAL+ACSF, SAL+AG.1B, SAL+AG.2C, FLUO+ACSF, FLUO+AG.1B e FLUO+AG.2C. A partir desses grupos, foi avaliada a sequência comportamental de saciedade (SCS) e o número de neurônios reativos no Arc através de imunofluorescência contra c-fos. O grupo FLUO apresentou menor peso corporal. A partir de nossos resultados, parece que a ISNRS promove maior ingestão alimentar frente ao agonista 5-HT_{2C}, menor taxa alimentar após injeção de ACSF e antecipação do ponto de saciedade após estímulo com o agonista 5-HT_{1B}. O grupo FLUO também apresentou maior número de neurônios reativos no Arc frente ao agonista 5-HT_{2C}. Apesar de não ter ocorrido uma aparente redução da ingestão alimentar, a ISNRS parece promover aumento da atividade da via anorexígena no Arc, corroborando nossa hipótese. Dessa forma, os achados deste estudo apontam para justificar o menor peso corporal em ratos adultos submetidos à ISNRS através do aumento da atividade da via anorexígena no Arc, fator que pode levar ao aumento gasto energético.

PALAVRAS-CHAVE: Plasticidade fenotípica, serotonina e comportamento alimentar.

INTRODUÇÃO

A plasticidade fenotípica compreende a capacidade de adaptação às condições ambientais (West-Eberhard, 2005^a; West-Eberhard, 2005^b). Especificamente, nas fases de gestação e lactação há maior sensibilidade do organismo aos estímulos externos que induzem modificações biológicas com repercussões ao longo da vida (Rice e Barone, 2000; Gluckman et al, 2009). Nesse contexto, a serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) desempenha funções determinantes para o desenvolvimento do sistema nervoso central. A 5-HT modula a neurogênese, tem efeito autorregulatório e regula os processos de maturação dos circuitos neurais (alongamento axonal, sinaptogênese, etc) (Whitaker-Azmitia e Azmitia, 1994; Goldberg, 1998; Ahlemeyer et al, 2000; Ramos et al, 2004; Vitalis et al, 2007). Isso sugere que a alteração da atividade serotoninérgica durante os períodos críticos de desenvolvimento podem gerar respostas adaptativas associadas a mudanças em longo prazo nas funções controladas pela 5-HT.

Os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) são prescritos para o tratamento da depressão gestacional e pós-parto (Hendrick, 2003). No entanto, esses fármacos e seus metabólitos chegam ao feto e neonato através da placenta e do leite materno podendo interferir em seu desenvolvimento (Kristensen et al, 1999; Gentile et al, 2007; Tanoshima et al, 2014; Orsolini e Bellantuono, 2015). Estudos em modelos animais demonstram que a inibição seletiva neonatal da recaptação da serotonina (ISNRS) promove modificações morfofuncionais e comportamentais. Foi observada hipotrofia de neurônios no sistema serotoninérgico, em regiões do sistema límbico e no córtex motor primário, além de alterações tardias sobre os comportamentos emocional, social e afetivo, bem como da atividade locomotora (Manhães-de-Castro et al, 2001; Mendes-da-Silva et al, 2002; Ansorge et al, 2004; Maciag et al, 2006; Ribas et al, 2008; Silva et al, 2010; Rodriguez-Porcel et al, 2011; Lee, 2012; Ko et al, 2014; Rebello et al, 2014; Zimmerberg e Germeyan, 2015).

Além de acumular várias funções durante o desenvolvimento, a 5-HT participa da regulação homeostática do balanço energético via núcleo arqueado (Arc) do hipotálamo (Heisler et al, 2003; 2006). Através dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}, respectivamente, a serotonina inibe neurônios que produzem neuropeptídeos orexígenos (NPY-neuropeptídeo Y e AgRP-peptídeo relacionado ao agouti) e estimula neurônios que expressam neuropeptídeos anorexígenos (POMC-pró-opiomelanocortina e CART-transcrito relacionado à cocaína e anfetamina) localizados no Arc, resultando em

saciedade e aumento do gasto energético (Heisler et al, 2002; Cone, 2005; Heisler et al, 2006; Lam et al, 2008; Xu et al, 2008; Marston et al, 2011). Assim, a INRS pode alterar o controle serotoninérgico do comportamento alimentar na vida adulta.

Poucos estudos avaliam os efeitos da ISNRS sobre o comportamento alimentar ao longo da vida. Dados de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a ISNRS antecipa a saciedade e reduz o consumo alimentar relativo, bem como o tempo de alimentação, caracterizando um fenótipo de hipofagia. A ISNRS também promoveu menor aumento da adiposidade abdominal e maior expressão dos receptores 5-HT_{2C} no Arc após consumo prolongado de dieta hiperlipídica/hipercalórica em ratos adultos, sugerindo melhor adaptação ao aumento da oferta energética (Galindo et al, 2015). Dessa forma, nós hipotetizamos que a ISNRS promove aumento da atividade da via anorexígena no Arc. Sendo assim, este estudo investigou o número de neurônios reativos no Arc em resposta à injeção intracerebroventricular dos agonistas dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}.

MÉTODOS

Animais

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas (CEUA-UFPE) (Ofício 305/2010). Os experimentos seguiram a “DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS - DBCA” e as “DIRETRIZES PARA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA” de 2013, elaborada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – Brasil.

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram mantidos sob condições padrão no biotério de experimentação animal do Anexo do Departamento de Anatomia da UFPE, com ciclo claro-escuro de 12/12 horas invertido (fase escura: das 06 às 18 horas / fase clara: das 18 às 06 horas) e livre acesso à água e comida.

Grupos experimentais

Ratas (n=5) virgens, com 120 dias de vida e peso ideal para a idade (220 gramas) foram colocadas para acasalamento. No primeiro dia pós-natal (1° DPN), que compreende o primeiro ciclo escuro seguinte ao nascimento dos filhotes, foram realizadas a sexagem e a composição das ninhadas. O acasalamento e a composição das ninhadas foram feitos com base na revisão de Bento-Santos e colaboradores (2012).

Do 1° ao 21° DPN, os neonatos foram tratados com solução salina – SAL (NaCl 0.9%) ou fluoxetina – FLUO (10mg/ml), na dose de 1 µl/g, via subcutânea, diariamente, uma hora após o início do ciclo escuro (Silva et al, 2010). Aos 170 dias de vida, foi realizada a estereotaxia para implantação de cânula no ventrículo lateral direito (Paxinos et al, 1980; Carvalheira et al, 2001). Para confirmação da eficácia do procedimento cirúrgico foi realizado o teste de ingestão de água (Aja et al, 2006).

Aos 180 dias de vida, os animais receberam injeção intracerebroventricular (ICV) de 3µl de “*Artificial Cerebrospinal Fluid*” (ACSF), agonista do receptor 5-HT_{1B} (CP 93 129, concentração de 1µg/0,5µl de ACSF) (Tocris Biosciences®) ou agonista do receptor 5-HT_{2C} (Ro-600175, concentração de 0,05µg/µl de ACSF) (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel®) (Fletcher et al, 2009; Clissold et al, 2013). A partir dessas injeções ICV, foram formados os grupos SAL+ACSF, SAL+AG.1B e SAL+AG.2C (animais que receberam solução salina na fase neonatal e injeção ICV de ACSF, agonista do receptor 5-HT_{1B} ou agonista do receptor 5-HT_{2C}, respectivamente); e, FLUO+ACSF, FLUO+AG.1B e FLUO+AG.2C (animais tratados com fluoxetina na fase neonatal e injeção ICV de ACSF, agonista do receptor 5-HT_{1B} ou agonista do receptor 5-HT_{2C}, respectivamente).

Peso corporal

Aos 180 dias de vida, imediatamente antes da injeção ICV de ACSF ou dos agonistas serotoninérgicos, os animais dos grupos SAL e FLUO foram pesados utilizando-se balança.

Comportamento alimentar

Aos 180 dias de vida, o comportamento alimentar foi avaliado através da análise da Sequência Comportamental de Siedade (SCS), método descrito por Halford e colaboradores (1998) (Halford et al, 1998). Para realização do teste, os animais foram submetidos a jejum de três horas. Trinta minutos antes da SCS, foi realizada pesagem

dos animais e injeção ICV de ACSF, agonista do receptor 5-HT_{1B} ou agonista do receptor 5-HT_{2C}.

No início do teste, foram oferecidos 30 gramas de ração padrão de biotério aos animais. A partir desse momento, o animal foi filmado durante uma hora para posterior quantificação dos Tempos de Alimentação, Limpeza e Descanso (tempo total em segundos de cada comportamento) e da Frequência Alimentar (número de vezes que o animal busca o alimento). O Ponto de Saciedade foi determinado pela intersecção das linhas que representam os comportamentos de alimentação e descanso.

Ao término da SCS, foi feita a pesagem do alimento rejeitado pelo animal para obtenção da ingestão alimentar (diferença entre a quantidade de ração oferecida no início e a quantidade de ração restante no final da SCS). A partir dessa medida, foram calculados a Ingestão Alimentar Relativa (razão entre a ingestão alimentar e o peso corporal) e a Taxa Alimentar (razão entre a ingestão alimentar relativa e o tempo de alimentação).

Reatividade neuronal no Arc

Aos 180 dias de vida, a reatividade neuronal no Arc foi avaliada através de imunofluorescência contra proteína c-fos. Após a SCS (duração de uma hora), o alimento continuou disponível por mais trinta minutos, somando noventa minutos de exposição alimentar, tempo necessário para expressão da referida proteína (Sagar et al, 1988). Em seguida, os animais passaram por perfusão transcardíaca. Posteriormente, os encéfalos foram criosseccionados em criostato (Leica®) obtendo-se cortes de 30 µm de espessura.

Foram utilizados o anticorpo primário coelho anti-c-fos (Santa Cruz Biotechnology®) e o anticorpo secundário ALEXA 594 cabra anti-coelho (Life Technologies®). As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência (Zeiss®) acoplado a câmera. A quantificação do número de neurônios imunoreativos contra c-FOS no Arc foi realizada através do programa ImageJ. O atlas anatômico de Paxinos e Watson (2005) foi utilizado para identificação dos bregmas correspondentes ao Arc.

Estatística

Os dados foram apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média (EPM). Para a análise do peso corporal entre os grupos SAL e FLUO, foi realizado o teste *t student* ($p < 0,05$). Para a análise da ingestão alimentar, tempo de alimentação, taxa alimentar, frequência alimentar e quantidade de neurônios imunoreativos entre os grupos SAL+ACSF, SAL+AG.1B, SAL+AG.2C, FLUO+ACSF, FLUO+AG.1B e FLUO+AG.2C, foi realizada análise de variância (ANOVA *two way*) e *Bonferroni's Post Test* ($p < 0,05$). O programa GraphPad Prism 5® foi utilizado para análise estatística e obtenção dos gráficos representativos.

RESULTADOS

Peso corporal

A inibição neonatal da recaptção de serotonina promoveu menor peso corporal em ratos aos 180 dias de vida ($341,00 \pm 6,34$ versus $418,59 \pm 6,48$; $p = 0,0001$) (Figura 1).

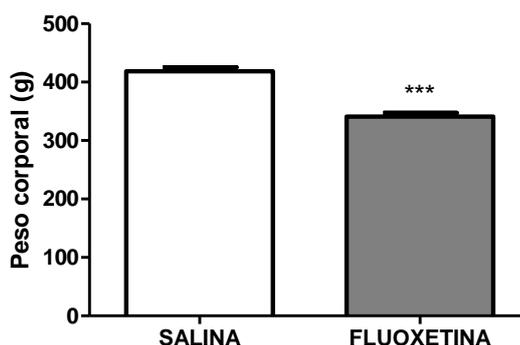


Figura 1: Efeito da inibição seletiva neonatal da recaptção de serotonina sobre o peso corporal em ratos aos 180 dias de vida. Teste *t student* ($p < 0,05$).

Comportamento alimentar

O ponto de saciedade, representado pela intersecção das médias dos tempos onde foram expressos os comportamentos de Alimentação e Repouso na SCS, apresentou-se semelhante entre os animais dos grupos SAL e FLUO após injeção ICV com ACSF (Figuras 2A e 2B). A injeção ICV do agonista do receptor 5-HT_{1B} promoveu retardo no ponto de saciedade nos animais dos grupos SAL e FLUO, porém, este retardo foi ligeiramente menor no grupo FLUO+AG.1B (Figuras 2C e 2D). Já a injeção ICV com o agonista do receptor 5-HT_{2C} promoveu retardo semelhante no ponto de saciedade em ambos os grupos experimentais (Figuras 2E e 2F).

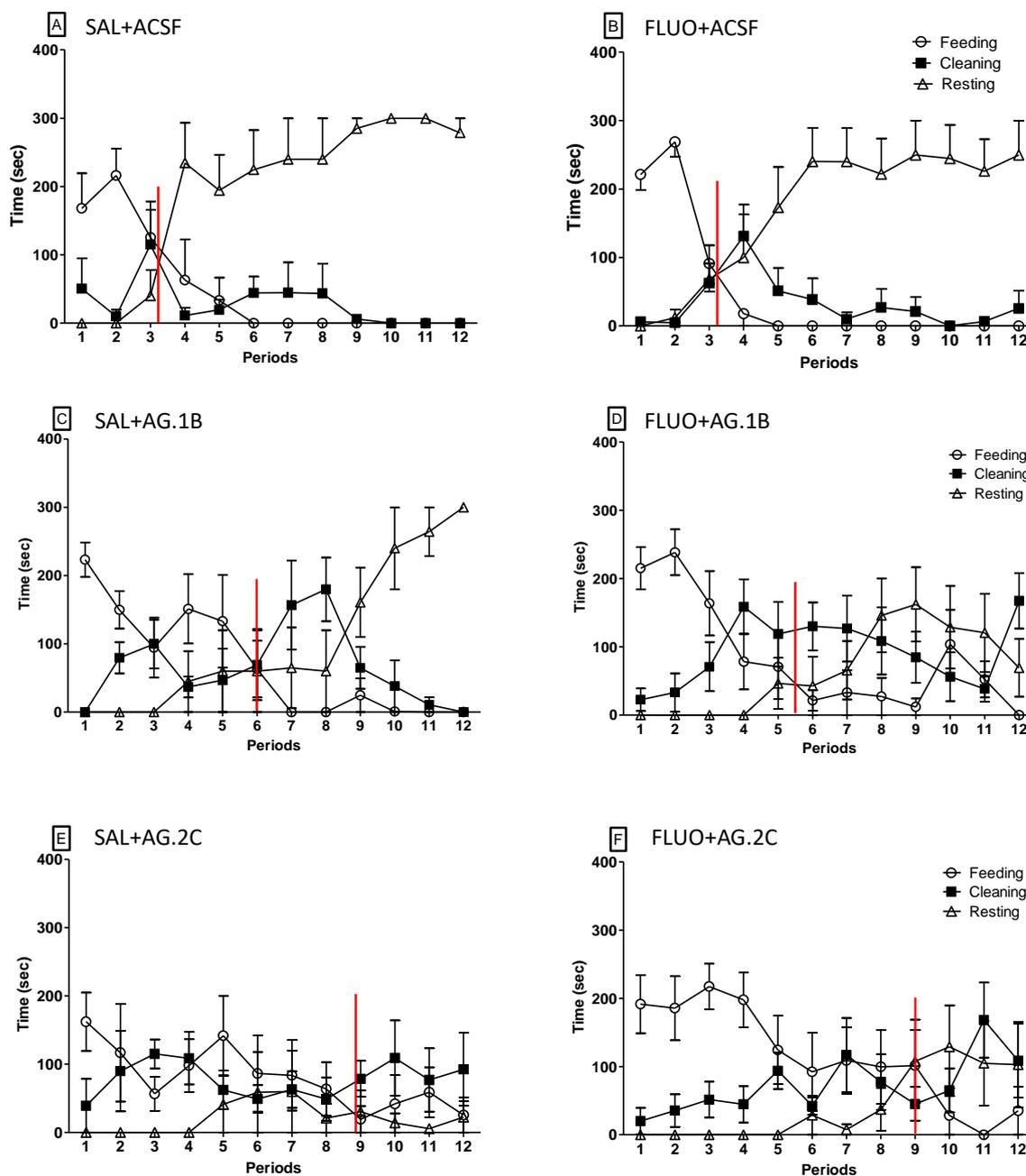


Figura 2: Efeito da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina sobre o ponto de saciedade em ratos aos 180 dias de vida após injeção ICV de ACSF, agonista do receptor 5-HT_{1B} ou agonista do receptor 5-HT_{2C}. O Ponto de Saciedade foi determinado pela intersecção das linhas que representam as médias dos tempos dos comportamentos de alimentação e de descanso. Os dados estão apresentados em média \pm EPM.

Nos animais dos grupos SAL e FLUO, a injeção ICV com agonista do receptor 5-HT_{1B} ou 5-HT_{2C} promoveu aumento da ingestão alimentar em relação à injeção ICV de ACSF (Figura 3.A). Além disso, após estímulo com agonista do receptor 5-HT_{2C}, o

grupo tratado com fluoxetina na fase neonatal (FLUO+AG.2C) apresentou maior ingestão alimentar que o grupo que recebeu solução salina (SAL+AG.2C) ($2,24 \pm 0,23$ versus $1,68 \pm 0,24$; $p < 0,05$) (Figura 3.A).

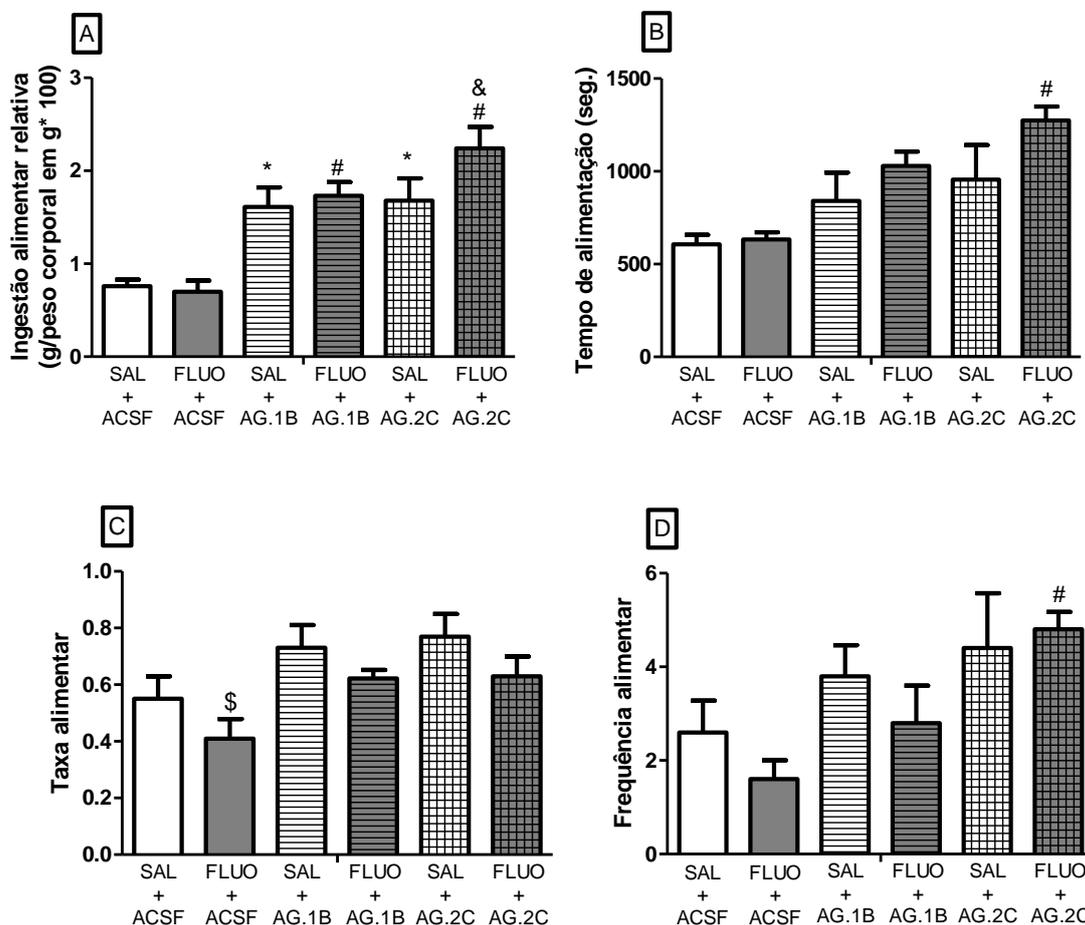


Figura 3: Efeito da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina sobre a ingestão alimentar (A), tempo de alimentação (B), taxa alimentar (C) e frequência alimentar (D) em ratos aos 180 dias de vida após injeção ICV de ACSF, agonista do receptor 5-HT_{1B} ou agonista do receptor 5-HT_{2C}. ANOVA *Two-Way*, *Bonferroni's Post Test* ($p < 0,05$). * = SAL+AG.1B e SAL+AG.2C versus SAL+ACSF; # = FLUO+AG.1B e FLUO+AG.2C versus FLUO+ACSF; & = FLUO+AG.2C versus SAL+AG.2C; \$ = FLUO+ACSF versus SAL+ACSF.

Não foi observado efeito da inibição neonatal da recaptação de serotonina sobre o tempo de alimentação ou frequência alimentar (Figuras 3.B e 3.D). No entanto, a injeção ICV com agonista 5-HT_{2C} promoveu aumento do tempo de alimentação e da frequência alimentar no grupo FLUO+AG.2C em relação ao grupo FLUO+ACSF (Figuras 3.B e 3.D). Ademais, após injeção ICV de ACSF, o grupo tratado com

fluoxetina na fase neonatal (FLUO+ACSF) apresentou menor taxa alimentar em relação ao grupo que recebeu solução salina (SAL+ACSF) ($0,41 \pm 0,07$ versus $0,55 \pm 0,06$; $p < 0,05$) (Figura 3.C).

Reatividade neuronal no Arc

Nos animais do grupo SAL, a injeção ICV com agonista do receptor 5-HT_{1B} ou 5-HT_{2C} reduziu a quantidade de neurônios ativos no ARC em relação à injeção ICV de ACSF (Figura 4). Além disso, após estímulo com agonista do receptor 5-HT_{2C}, o grupo tratado com fluoxetina na fase neonatal (FLUO+AG.2C) apresentou maior imunorreatividade neuronal no Arc comparando-se com o grupo que recebeu solução salina (SAL+AG.2C) ($51,67 \pm 4,11$ versus $37,42 \pm 0,43$; $p = 0,01$) (Figura 4).

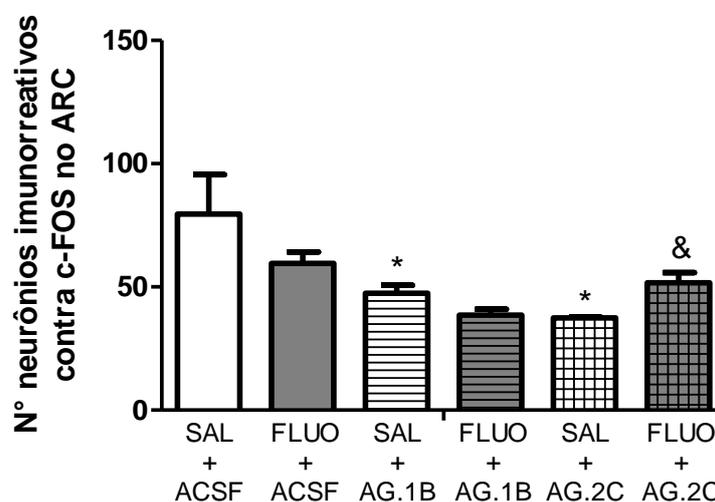


Figura 4: Efeito da inibição seletiva neonatal da recaptação de serotonina sobre o número de células reativas contra c-fos no Arc em ratos aos 180 dias de vida após injeção ICV de ACSF, agonista do receptor 5-HT_{1B} ou agonista do receptor 5-HT_{2C}. ANOVA *Two-Way*, *Bonferroni's Post Test* ($p < 0,05$). * = SAL+AG.1B e SAL+AG.2C versus SAL+ACSF; & = FLUO+AG.2C versus SAL+AG.2C.

DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a inibição da recaptação da serotonina no período neonatal sinalizou para efeitos tardios sobre o peso corporal, o comportamento alimentar e a imunorreatividade contra c-Fos no Arc em resposta ao estímulo central com agonistas dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}. Neste sentido, a ISNRS esteve associada ao menor peso corporal e à menor taxa alimentar em resposta à injeção ICV de ACSF, na vida adulta. Além disso, os animais submetidos à ISNRS demonstraram menor atraso no ponto de saciedade na SCS frente ao estímulo com agonista 5-HT_{1B}. Adicionalmente, os animais submetidos à ISNRS apresentaram aumento na ingestão

alimentar estando essa alteração associada à maior imunorreatividade neuronal contra c-Fos no Arc do hipotálamo após estímulo ICV com agonista do receptor 5-HT_{2C}. Sendo assim, esses achados sugerem que os animais submetidos à ISNRS são mais sensíveis ao estímulo com o agonista do receptor 5-HT_{2C} na vida adulta.

O peso corporal é a resultante do balanço entre o consumo alimentar e o gasto energético (Morton et al, 2006). Por conseguinte, um menor peso corporal pode ser consequente de uma redução da ingestão alimentar e/ou aumento do gasto energético (Morton et al, 2006). No atual estudo, animais submetidos à ISNRS apresentaram menores peso corporal e taxa alimentar, porém, sem alteração na ingestão alimentar quando estimulados com injeção ICV neutra de ACSF aos 180 dias de vida. Na literatura, vários estudos apontam que a ISNRS reduz o peso corporal em curto e longo prazo. Por exemplo, a exposição neonatal a fármacos antidepressivos, dentre eles a fluoxetina, promove menor ganho de peso corporal durante a lactação associado a menor crescimento somático (Manhães-de-Castro et al, 2001; Mendes-da-Silva et al, 2002; Deiró et al, 2004; 2006; 2008; Toscano et al, 2008; Silva et al, 2010). Além disso, foi observado menor peso corporal em ratos jovens e adultos, demonstrando que a redução do peso corporal provocada pela INRS permanece ao longo da vida (Manhães-de-Castro et al, 2001; da Silva et al, 2014; 2015^a; 2015^b; Galindo et al, 2015).

Essa redução ponderal foi relacionada à menor ingestão alimentar devido aos efeitos anoréxicos da fluoxetina (Deiró et al, 2004; 2006; 2008). Entretanto, a ISNRS tem sido associada a um possível estado hipermetabólico na vida adulta caracterizado por maior consumo de oxigênio (VO₂) e menor peso corporal (Kummet et al, 2012). Da Silva e colaboradores (2015) demonstraram em ratos que este “*lean phenotype*” (menores peso corporal e massa gorda) frente ao aumento da atividade serotoninérgica durante o desenvolvimento neonatal pode ser consequente de adaptações na bioenergética mitocondrial e na “*uncoupling protein*” (UCP) em tecidos chave para o balanço energético (da Silva et al, 2015^a; 2015^b). Animais jovens expostos à fluoxetina na fase neonatal apresentaram aumento do VO₂ e menor produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), embora não tenha alterado o estresse oxidativo, no hipotálamo bem como no músculo esquelético (da Silva et al, 2015^a). Também foi observado aumento da respiração mitocondrial, menor produção de ERO e aumento da expressão da UCP1 no tecido adiposo marrom associado a maior capacidade de manter a temperatura corporal

em ambiente frio (da Silva et al, 2015^b). Juntos, esses achados sugerem um fenótipo adaptado para maior gasto energético.

De fato, atualmente é bem aceito que a regulação do peso corporal está estreitamente relacionada ao controle neural do gasto energético (Münzberg et al, 2015). O Arc é altamente responsivo a mudanças no estado energético e nutricional (jejum, por exemplo) (Münzberg et al, 2015). Este núcleo hipotalâmico medeia mudanças no tecido adiposo marrom (BAT), via Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (Münzberg et al, 2015). Os neurônios POMC expressos no Arc são anorexígenos e aumentam a termogênese do BAT (Münzberg et al, 2015). Tais fenômenos (anorexia e termogênese) decorrem da secreção do Hormônio Estimulado pelo Melanócito (MSH), um subproduto da via das melanocortinas, capaz de ativar os receptores MC4 no hipotálamo e, subsequentemente, aumentar o gasto energético e a expressão de UCP1 no BAT, via SNA. (Haynes et al, 1999; Chen et al, 2000; Ste et al, 2000).

Uma vez que a serotonina se liga aos receptores 5-HT_{2C}, presentes nos neurônios que expressam POMC no núcleo arqueado do hipotálamo, ela é capaz de ativar a via das melanocortinas promovendo redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (Heisler, 2006). Desta forma, o aumento do gasto energético em longo prazo como uma resposta adaptativa ao aumento da disponibilidade de serotonina durante o período crítico de desenvolvimento, poderia explicar a persistência na redução do peso corporal em nosso modelo experimental, embora os mecanismos associados a tal expressão fenotípica não tenham sido objetivo do estudo em questão.

A Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) é o nome dado à transição ordenada das atividades de alimentação, limpeza e descanso mensurados durante o período pós-ingestivo (Halford et al, 1998). Como a SCS reflete processos fisiológicos naturais relacionados à saciedade, ela pode ser influenciada por fármacos que interfiram em mecanismos relacionados à ingestão alimentar (Halford et al, 1998). Drogas que aumentem atividade sináptica da 5-HT, como a fluoxetina ou agonista do receptor 5-HT_{1B} e/ou 5-HT_{2C} podem antecipar o ponto de saciedade (Halford et al, 1998). Neste estudo, a exposição neonatal à fluoxetina reduziu da taxa alimentar sem alteração na ingestão alimentar relativa após injeção ICV neutra de ACSF. Adicionalmente, houve maior ingestão alimentar relativa após estímulo com o agonista do receptor 5-HT_{2C} e menor atraso do ponto de saciedade frente ao estímulo com agonista 5-HT_{1B}.

Dados prévios não publicados de nosso grupo de pesquisa indicaram que a exposição neonatal à fluoxetina promove antecipação da saciedade e maior atividade neuronal no Arc após estímulo alimentar em ratos aos 180 dias, caracterizando um fenótipo hipofágico (Galindo, 2013, tese). Galindo e colaboradores (2015) também observaram menor consumo alimentar em ratos aos 180 dias (Galindo et al, 2015). Entretanto, outro estudo que também utilizou inibição neonatal da recaptação da serotonina com fluoxetina, não encontrou modificação do comportamento alimentar (ingestão ou saciedade) em ratos jovens (da Silva et al, 2014). Já camundongos tratados com sertralina na fase neonatal apresentaram maior ingestão calórica na vida adulta (Kummet et al, 2012). Estes diferentes resultados podem ser decorrentes a diferentes metodologias utilizadas para a realização dos estudos acima citados. Além disso, não foram encontrados na literatura estudos sobre a resposta do comportamento alimentar frente ao estímulo agudo central com agonistas serotoninérgicos em animais previamente tratados com fluoxetina na lactação.

O efeito anoréxico da fluoxetina, fora do período de desenvolvimento, sobre a ingestão e o gasto de energia é bem estabelecido na literatura, sendo esse fármaco utilizado na clínica para perda de peso (Hill e Blundell, 1990). No entanto, os achados na literatura e neste estudo quanto às adaptações fenotípicas e expressão do comportamento alimentar em animais adultos expostos a esses fármacos na vida neonatal são divergentes. Isso reforça a ideia de “*developmentally-depedent effects*” (Ansorge et al, 2004; Borue et al, 2007; Ansorge et al, 2008; Whitaker-Azmitia, 2010).

Por trás das modificações comportamentais, vários estudos apontam alterações morfofuncionais permanentes em locais que modulam o comportamento alimentar como o sistema serotoninérgico e o hipotálamo. A ISNRS promoveu hipotrofia do sistema serotoninérgico, aumento da expressão dos receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos no hipotálamo e “*downregulation*” desses autorreceptores, bem como do SERT, no núcleo dorsal da rafe (Hansen e Mikkelsen, 1998; Silva et al, 2010; Limón-Morales et al, 2014). Também foi observado menor expressão de 5-HT_{2C} e NPY no hipotálamo, sem alteração do receptor 5-HT_{1B} (Galindo et al, 2015). Essas alterações podem compor os mecanismos subjacentes às modificações no comportamento alimentar. Neste estudo, a ISNRS aumentou a atividade neuronal no Arc após estímulo com agonista 5-HT_{2C}. Esse achado indica que a via anorexígena no Arc pode ser mais ativa nos animais tratados com fluoxetina na lactação.

Nossos resultados não corroboraram com a hipótese inicial de que a INRS promove hipofagia em longo prazo. No entanto, a ISNRS promoveu menor peso corporal associado ao aumento da atividade neuronal no Arc em resposta ao estímulo do agonista 5-HT_{2C}. Dessa forma, os achados deste estudo apontam para justificar o menor peso corporal em ratos adultos submetidos à ISNRS através do aumento da atividade da via anorexígena no Arc e do inferido aumento do gasto energético. A maior reatividade neuronal no Arc em ratos submetidos à ISNRS, após estímulo com agonista do receptor 5-HT_{2C} na vida adulta, reforça os achados de estudo anterior (Galindo, et al, 2015) e a hipótese de que a maior disponibilidade sináptica neonatal de serotonina possivelmente sinaliza para a maior atividade da via da melanocortinas em ratos adultos. Deste modo, possivelmente, estes organismos possuem maior capacidade de adaptação a demandas energético-calóricas ambientais.

REFERÊNCIAS

- ^aWest-Eberhard, M. J. (2005). "Developmental plasticity and the origin of species differences." Proc Natl Acad Sci U S A 102 Suppl 1: 6543-6549.
- ^bWest-Eberhard, M. J. (2005). "Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity." J Exp Zool B Mol Dev Evol 304(6): 610-618.
- Rice, D. and S. Barone, Jr. (2000). "Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models." Environ Health Perspect 108 Suppl 3: 511-533.
- Gluckman, P. D., M. A. Hanson, et al. (2009). "Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease." Lancet 373(9675): 1654-1657.
- Whitaker-Azmitia, P. M. and E. C. Azmitia (1994). "Astroglial 5-HT_{1A} receptors and S-100 beta in development and plasticity." Perspect Dev Neurobiol 2(3): 233-238.
- Goldberg, J. I. (1998). "Serotonin regulation of neurite outgrowth in identified neurons from mature and embryonic *Helisoma trivolvis*." Perspect Dev Neurobiol 5(4): 373-387.
- Ahlemeyer, B., H. Beier, et al. (2000). "S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702." Brain Res 858(1): 121-128.
- Ramos, A. J., M. D. Rubio, et al. (2004). "The 5HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, protects neurons and reduces astroglial reaction after ischemic damage caused by cortical devascularization." Brain Res 1030(2): 201-220.
- Vitalis, T., O. Cases, et al. (2007). "Embryonic depletion of serotonin affects cortical development." Eur J Neurosci 26(2): 331-344.
- Hendrick, V. (2003). "Treatment of postnatal depression." BMJ 327(7422): 1003-1004.
- Kristensen, J. H., K. F. Ilett, et al. (1999). "Distribution and excretion of fluoxetine and norfluoxetine in human milk." Br J Clin Pharmacol 48(4): 521-527.
- Gentile, S., A. Rossi, et al. (2007). "SSRIs during breastfeeding: spotlight on milk-to-plasma ratio." Arch Womens Ment Health 10(2): 39-51.

- Tanoshima, R., F. G. Bournissen, et al. (2014). "Population PK modelling and simulation based on fluoxetine and norfluoxetine concentrations in milk: a milk concentration-based prediction model." Br J Clin Pharmacol 78(4): 918-928.
- Orsolini, L. and C. Bellantuono (2015). "Serotonin reuptake inhibitors and breastfeeding: a systematic review." Hum Psychopharmacol 30(1): 4-20.
- Manhaes de Castro, R., J. M. Barreto Medeiros, et al. (2001). "Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor." Braz J Med Biol Res 34(1): 121-124.
- Mendes-da-Silva, C., S. L. de Souza, et al. (2002). "Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats." Arq Neuropsiquiatr 60(4): 928-931.
- Ansorge, M. S., M. Zhou, et al. (2004). "Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice." Science 306(5697): 879-881.
- Maciag, D., K. L. Simpson, et al. (2006). "Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry." Neuropsychopharmacology 31(1): 47-57.
- Ribas, V. R., H. K. Aniceto, et al. (2008). "Neonatal administration of fluoxetine did not alter the anxiety indicators, but decreased the locomotor activity in adult rats in the elevated plus-maze." Arq Neuropsiquiatr 66(4): 844-847.
- Silva, C. M., L. Goncalves, et al. (2010). "Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats." Neurosci Lett 483(3): 179-183.
- Rodriguez-Porcel, F., D. Green, et al. (2011). "Neonatal exposure of rats to antidepressants affects behavioral reactions to novelty and social interactions in a manner analogous to autistic spectrum disorders." Anat Rec (Hoboken) 294(10): 1726-1735.
- Lee, L. J. (2012). "Neonatal fluoxetine exposure alters motor performances of adolescent rats." Dev Neurobiol 72(8): 1122-1132.
- Ko, M. C., L. J. Lee, et al. (2014). "Long-term consequences of neonatal fluoxetine exposure in adult rats." Dev Neurobiol 74(10): 1038-1051.
- Rebello, T. J., Q. Yu, et al. (2014). "Postnatal day 2 to 11 constitutes a 5-HT-sensitive period impacting adult mPFC function." J Neurosci 34(37): 12379-12393.
- Zimmerberg, B. and S. C. Germeyan (2015). "Effects of neonatal fluoxetine exposure on behavior across development in rats selectively bred for an infantile affective trait." Dev Psychobiol 57(2): 141-152.
- Heisler, L. K. et al. (2003) "Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis." Ann N Y Acad Sci, v. 994, p. 169-74.
- Heisler, L. K., E. E. Jobst, et al. (2006). "Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake." Neuron 51(2): 239-249.
- Heisler, L. K., M. A. Cowley, et al. (2002). "Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine." Science 297(5581): 609-611.
- Cone, R. D. (2005). "Anatomy and regulation of the central melanocortin system." Nat Neurosci 8(5): 571-578.
- Lam, D. D., M. J. Przydzial, et al. (2008). "Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors." Endocrinology 149(3): 1323-1328.
- Xu, Y., J. E. Jones, et al. (2008). "5-HT_{2C}Rs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis." Neuron 60(4): 582-589.
- Marston, O. J., A. S. Garfield, et al. (2011). "Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance." Eur J Pharmacol 660(1): 70-79.

- Galindo, L. C. M. et al (2015). "Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats." Int. J. Devl Neuroscience 46: 76–81.
- Paxinos, G., C. R. Watson, et al. (1980). "AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates." J Neurosci Methods 3(2): 129-149.
- Carvalho, J. B., R. M. Siloto, et al. (2001). "Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus." FEBS Lett 500(3): 119-124.
- Aja, S., S. Bi, et al. (2006). "Intracerebroventricular C75 decreases meal frequency and reduces AgRP gene expression in rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 291(1): R148-154.
- Fletcher, P. J., M. Tampakeras, et al. (2009). "Characterizing the effects of 5-HT(2C) receptor ligands on motor activity and feeding behaviour in 5-HT(2C) receptor knockout mice." Neuropharmacology 57(3): 259-267.
- Clissold, K. A., E. Choi, et al. (2013). "Serotonin 1A, 1B, and 7 receptors of the rat medial nucleus accumbens differentially regulate feeding, water intake, and locomotor activity." Pharmacol Biochem Behav 112: 96-103.
- Halford, J. C., S. C. Wanninayake, et al. (1998). "Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake." Pharmacol Biochem Behav 61(2): 159-168.
- Sagar, S. M., F. R. Sharp, et al. (1988). "Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level." Science 240(4857): 1328-1331.
- Morton, G. J., D. E. Cummings, et al. (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." Nature 443(7109): 289-295.
- Manhaes de Castro, R., J. M. Barreto Medeiros, et al. (2001). "Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor." Braz J Med Biol Res 34(1): 121-124.
- Mendes-da-Silva, C., S. L. de Souza, et al. (2002). "Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats." Arq Neuropsiquiatr 60(4): 928-931.
- Deiro, T. C., R. Manhaes-de-Castro, et al. (2004). "Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats." Braz J Med Biol Res 37(10): 1503-1509.
- Deiro, T. C., R. Manhaes-de-Castro, et al. (2006). "Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats." Physiol Behav 87(2): 338-344.
- Deiro, T. C., J. Carvalho, et al. (2008). "Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats." Arq Neuropsiquiatr 66(3B): 736-740.
- Toscano, A. E., M. A. Amorim, et al. (2008). "Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology?" Life Sci 82(21-22): 1131-1136.
- da Silva, A. I., L. C. Monteiro Galindo, et al. (2014). "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 92(4): 330-337.
- ^ada Silva, A. I., G. R. Braz, et al. (2015). "Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues." Appl Physiol Nutr Metab 40(6): 565-574.
- ^bda Silva, A. I., G. R. Braz, et al. (2015). "Fluoxetine induces lean phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1 expression." J Bioenerg Biomembr 47(4): 309-318.

- Kummet, G. J., S. E. Haskell, et al. (2012). "Neonatal SSRI Exposure Programs a Hypermetabolic State in Adult Mice." J Nutr Metab 2012: 431574.
- Munzberg, H., E. Qualls-Creekmore, et al. (2015). "Neural Control of Energy Expenditure." Handb Exp Pharmacol.
- Haynes, W. G., D. A. Morgan, et al. (1999). "Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic." Hypertension 33(1 Pt 2): 542-547.
- Chen, A. S., J. M. Metzger, et al. (2000). "Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice." Transgenic Res 9(2): 145-154.
- Ste Marie, L., G. I. Miura, et al. (2000). "A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A 97(22): 12339-12344.
- Hill, A. J. and J. E. Blundell (1990). "Sensitivity of the appetite control system in obese subjects to nutritional and serotonergic challenges." Int J Obes 14(3): 219-233.
- Ansorge, M. S., M. Zhou, et al. (2004). "Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice." Science 306(5697): 879-881.
- Borue, X., J. Chen, et al. (2007). "Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies." Int J Dev Neurosci 25(6): 341-347.
- Ansorge, M. S., E. Morelli, et al. (2008). "Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice." J Neurosci 28(1): 199-207.
- Hansen, H. H. and J. D. Mikkelsen (1998). "Long-term effects on serotonin transporter mRNA expression of chronic neonatal exposure to a serotonin reuptake inhibitor." Eur J Pharmacol 352(2-3): 307-315.
- Limon-Morales, O., C. Soria-Fregozo, et al. (2014). "Altered expression of 5-HT1A receptors in adult rats induced by neonatal treatment with clomipramine." Physiol Behav 124: 37-44.
- Brito, M. N., N. A. Brito, et al. (2007). "Differential activation of the sympathetic innervation of adipose tissues by melanocortin receptor stimulation." Endocrinology 148(11): 5339-5347.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A inibição da recaptação de serotonina no período neonatal foi associada a alterações no peso corporal, no comportamento alimentar e na imunorreatividade neuronal contra c-Fos no Arc do hipotálamo na vida adulta. Ratos adultos submetidos ao tratamento crônico com fluoxetina durante a lactação apresentaram menor peso corporal. Uma vez que o peso corporal é a resultante do balanço entre a ingestão e o gasto energético, essa redução do peso corporal poderia ser justificada por uma redução da ingestão alimentar e/ou aumento do gasto de energia.

Não foi observada alteração na ingestão alimentar após injeção ICV neutra de ACSF. Por outro lado, houve redução da taxa alimentar após injeção ICV de ACSF, antecipação do ponto de saciedade após injeção ICV de agonista 5-HT_{1B} e aumento da ingestão alimentar após injeção ICV de agonista 5-HT_{2C}. Esses achados referentes aos parâmetros do comportamento alimentar não permitiram a confirmação da hipótese inicial de que a INRS promove um fenótipo caracterizado por hipofagia em longo prazo.

Apesar disso, a INRS promoveu maior imunorreatividade neuronal contra c-Fos no Arc em resposta à injeção ICV de agonista do receptor 5-HT_{2C}. Esse resultado reforça o que encontramos em estudo anterior e ratifica a hipótese inicial de que a maior disponibilidade sináptica neonatal de serotonina sinaliza para uma maior atividade da via das melanocortinas na idade adulta. A ativação da via das melanocortinas está associada ao aumento do gasto energético. Dessa forma, os achados deste estudo apontam para justificar o menor peso corporal em ratos adultos submetidos à INRS através do aumento da atividade da via anorexígena no Arc, possivelmente, associada a um aumento do gasto energético. Corroborando com essa ideia, na literatura, vários estudos apontam que a INRS pode induzir um fenótipo de maior gasto energético na vida adulta.

Nossos resultados apontam para a necessidade de realizar novos estudos com as seguintes perspectivas:

- ✓ Analisar o peso corporal, o comportamento alimentar e o gasto energético em ratos adultos submetidos à INRS e expostos ao aumento da oferta energética com dieta hiperlipídica/hipercalórica.

- ✓ Analisar a imunorreatividade neuronal no Arc em resposta à injeção ICV de agonistas serotoninérgicos em ratos adultos submetidos à INRS e expostos ao aumento da oferta energética com dieta hiperlipídica/hipercalórica.

REFERÊNCIAS

- ANSORGE, M. S. et al. Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. **Science**, v. 306, n. 5697, p. 879-81, Oct 29 2004.
- 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, n. 1, p. 199-207, Jan 2 2008.
- AHLEMEYER, B. et al. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. **Brain Res**, v. 858, n. 1, p. 121-8, Mar 6 2000.
- AJA, S. et al. Intracerebroventricular C75 decreases meal frequency and reduces AgRP gene expression in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 291, n. 1, p. R148-54, Jul 2006.
- AZMITIA, E. C.; DOLAN, K.; WHITAKER-AZMITIA, P. M. S-100B but not NGF, EGF, insulin or calmodulin is a CNS serotonergic growth factor. **Brain Res**, v. 516, n. 2, p. 354-6, May 21 1990.
- AZMITIA, E. C. et al. Dystrophic serotonin axons in postmortem brains from young autism patients. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 294, n. 10, p. 1653-62, Oct 2011.
- BONNIN, A. et al. A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. **Nature**, v. 472, n. 7343, p. 347-50, Apr 21 2011.
- BONNIN, A.; LEVITT, P. Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. **Neuroscience**, v. 197, p. 1-7, Dec 1 2011.
- BOCK, N. et al. Chronic fluoxetine treatment changes S100B expression during postnatal rat brain development. **J Child Adolesc Psychopharmacol**, v. 23, n. 7, p. 481-9, Sep 2013.
- BORUE, X.; CHEN, J.; CONDRON, B. G. Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies. **Int J Dev Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 341-7, Oct 2007.
- BOUET, V. et al. Age-dependent effects of chronic fluoxetine treatment on the serotonergic system one week following treatment. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 221, n. 2, p. 329-39, May 2012.

BREWERTON, T. D.; JIMERSON, D. C. Studies of serotonin function in anorexia nervosa. **Psychiatry Res**, v. 62, n. 1, p. 31-42, Apr 16 1996.

CABRERA-VERA, T. M.; BATTAGLIA, G. Prenatal exposure to fluoxetine (Prozac) produces site-specific and age-dependent alterations in brain serotonin transporters in rat progeny: evidence from autoradiographic studies. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 286, n. 3, p. 1474-81, Sep 1998.

CARVALHEIRA, J. B. et al. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. **FEBS Lett**, v. 500, n. 3, p. 119-24, Jul 6 2001.

CHEN, K. et al. c-Fos expression in rat brainstem following intake of sucrose or saccharin. **Front Med**, v. 5, n. 3, p. 294-301, Sep 2011.

CLISSOLD, K. A.; CHOI, E.; PRATT, W. E. Serotonin 1A, 1B, and 7 receptors of the rat medial nucleus accumbens differentially regulate feeding, water intake, and locomotor activity. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 112, p. 96-103, Nov 2013.

CONE, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 5, p. 571-8, May 2005.

COWLEY, M. A. et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 480-4, May 24 2001.

^aDAVAL, G. et al. Autoradiographic evidence of serotonin₁ binding sites on primary afferent fibres in the dorsal horn of the rat spinal cord. **Neurosci Lett**, v. 83, n. 1-2, p. 71-6, Dec 16 1987.

^bDAVAL, G. et al. Transient expression of 5-HT_{1A} receptor binding sites in some areas of the rat CNS during postnatal development. **Int J Dev Neurosci**, v. 5, n. 3, p. 171-80, 1987.

DA SILVA, A. I. et al. 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**, v. 92, n. 4, p. 330-7, Apr 2014.

DAUBERT, E. A.; CONDRON, B. G. Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. **Trends Neurosci**, v. 33, n. 9, p. 424-34, Sep 2010.

DEIRO, T. C. et al. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 10, p. 1503-9, Oct 2004.

- DEIRO, T. C. et al. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. **Physiol Behav**, v. 87, n. 2, p. 338-44, Feb 28 2006.
- DEIRO, T. C. et al. Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 66, n. 3B, p. 736-40, Sep 2008.
- DONOVAN, M. H.; TECOTT, L. H. Serotonin and the regulation of mammalian energy balance. **Front Neurosci**, v. 7, p. 36, 2013.
- FAHY, T. A.; RUSSELL, G. F. Outcome and prognostic variables in bulimia nervosa. **Int J Eat Disord**, v. 14, n. 2, p. 135-45, Sep 1993.
- FRANCIS-OLIVEIRA, J. et al. Fluoxetine exposure during pregnancy and lactation: Effects on acute stress response and behavior in the novelty-suppressed feeding are age and gender-dependent in rats. **Behav Brain Res**, v. 252, p. 195-203, Sep 1 2013.
- FEENSTRA, M. G. et al. Decreased hypothalamic serotonin levels in adult rats treated neonatally with clomipramine. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 55, n. 4, p. 647-52, Dec 1996.
- FLETCHER, P. J. et al. Characterizing the effects of 5-HT(2C) receptor ligands on motor activity and feeding behaviour in 5-HT(2C) receptor knockout mice. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 3, p. 259-67, Sep 2009.
- GALINDO, L. C. M. et al. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. **Int. J. Devl Neuroscience**, v. 46, p. 76–81, Nov 2015.
- GENTILE, S.; ROSSI, A.; BELLANTUONO, C. SSRIs during breastfeeding: spotlight on milk-to-plasma ratio. **Arch Womens Ment Health**, v. 10, n. 2, p. 39-51, 2007.
- GLUCKMAN, P. D. et al. Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. **Lancet**, v. 373, n. 9675, p. 1654-7, May 9 2009.
- GOLDBERG, J. I. Serotonin regulation of neurite outgrowth in identified neurons from mature and embryonic *Helisoma trivolvis*. **Perspect Dev Neurobiol**, v. 5, n. 4, p. 373-87, 1998.

GRUDELL, A. B. et al. A controlled pharmacogenetic trial of sibutramine on weight loss and body composition in obese or overweight adults. **Gastroenterology**, v. 135, n. 4, p. 1142-54, Oct 2008.

GUERDJIKOVA, A. I. et al. High-dose escitalopram in the treatment of binge-eating disorder with obesity: a placebo-controlled monotherapy trial. **Hum Psychopharmacol**, v. 23, n. 1, p. 1-11, Jan 2008.

HANSEN, H. H.; MIKKELSEN, J. D. Long-term effects on serotonin transporter mRNA expression of chronic neonatal exposure to a serotonin reuptake inhibitor. **Eur J Pharmacol**, v. 352, n. 2-3, p. 307-15, Jul 10 1998.

HALFORD, J. C. et al. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. **Curr Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 201-13, Mar 2005.

HALFORD, J. C.; WANNINAYAKE, S. C.; BLUNDELL, J. E. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 61, n. 2, p. 159-68, Oct 1998.

HEISLER, L. K. et al. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. **Science**, v. 297, n. 5581, p. 609-11, Jul 26 2002.

HEISLER, L. K. et al. Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 994, p. 169-74, Jun 2003.

HEISLER, L. K. et al. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. **Neuron**, v. 51, n. 2, p. 239-49, Jul 20 2006.

HENDRICK, V. Treatment of postnatal depression. **BMJ**, v. 327, n. 7422, p. 1003-4, Nov 1 2003.

HENDRICKS, T. J. et al. Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. **Neuron**, v. 37, n. 2, p. 233-47, Jan 23 2003.

HILL, A. J.; BLUNDELL, J. E. Sensitivity of the appetite control system in obese subjects to nutritional and serotonergic challenges. **Int J Obes**, v. 14, n. 3, p. 219-33, Mar 1990.

JIMERSON, D. C. et al. Decreased serotonin function in bulimia nervosa. **Arch Gen Psychiatry**, v. 54, n. 6, p. 529-34, Jun 1997.

KARPOVA, N. N. et al. 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, n. 2, p. 97-108, Feb 2009.

KLOMP, A. et al. Lasting effects of chronic fluoxetine treatment on the late developing rat brain: age-dependent changes in the serotonergic neurotransmitter system assessed by pharmacological MRI. **Neuroimage**, v. 59, n. 1, p. 218-26, Jan 2 2012.

KO, M. C.; LEE, L. J.; LI, Y. Long-term consequences of neonatal fluoxetine exposure in adult rats. **Dev Neurobiol**, v. 74, n. 10, p. 1038-51, Oct 2014.

KRISTENSEN, J. H. et al. Distribution and excretion of fluoxetine and norfluoxetine in human milk. **Br J Clin Pharmacol**, v. 48, n. 4, p. 521-7, Oct 1999.

LAM, D. D. et al. Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1323-8, Mar 2008.

LAUDER, J. M.; KREBS, H. Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. **Dev Neurosci**, v. 1, n. 1, p. 15-30, 1978.

LAUDER, J. M.; SZE, P. Y.; KREBS, H. Maternal influences on tryptophan hydroxylase activity in embryonic rat brain. **Dev Neurosci**, v. 4, n. 4, p. 291-5, 1981.

LAUDER, J. M. et al. Combined serotonin immunocytochemistry and 3H-thymidine autoradiography: in vivo and in vitro methods. **J Histochem Cytochem**, v. 30, n. 8, p. 788-93, Aug 1982.

LAUDER, J. M. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. **Ann N Y Acad Sci**, v. 600, p. 297-313, discussion 314, 1990.

LEE, L. J. Neonatal fluoxetine exposure affects the neuronal structure in the somatosensory cortex and somatosensory-related behaviors in adolescent rats. **Neurotox Res**, v. 15, n. 3, p. 212-23, Apr 2009.

LEE, L. J. Neonatal fluoxetine exposure alters motor performances of adolescent rats. **Dev Neurobiol**, v. 72, n. 8, p. 1122-32, Aug 2012.

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

LEOMBRUNI, P. et al. Citalopram versus fluoxetine for the treatment of patients with bulimia nervosa: a single-blind randomized controlled trial. **Adv Ther**, v. 23, n. 3, p. 481-94, May-Jun 2006.

LEOMBRUNI, P. et al. A randomized, double-blind trial comparing sertraline and fluoxetine 6-month treatment in obese patients with Binge Eating Disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1599-605, Aug 1 2008.

LIAO, C. C.; LEE, L. J. Neonatal fluoxetine exposure affects the action potential properties and dendritic development in cortical subplate neurons of rats. **Toxicol Lett**, v. 207, n. 3, p. 314-21, Dec 15 2011.

LI, Q. Cellular and molecular alterations in mice with deficient and reduced serotonin transporters. **Mol Neurobiol**, v. 34, n. 1, p. 51-66, Aug 2006.

LOPES DE SOUZA, S. et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 6, p. 1400-8, Mar 2008.

LUCAS, J. J. et al. Absence of fenfluramine-induced anorexia and reduced c-Fos induction in the hypothalamus and central amygdaloid complex of serotonin 1B receptor knock-out mice. **J Neurosci**, v. 18, n. 14, p. 5537-44, Jul 15 1998.

MACIAG, D. et al. Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 1, p. 47-57, Jan 2006.

MANHAES DE CASTRO, R. et al. Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 1, p. 121-4, Jan 2001.

MARSTON, O. J.; GARFIELD, A. S.; HEISLER, L. K. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. **Eur J Pharmacol**, v. 660, n. 1, p. 70-9, Jun 11 2011.

MATEOS, S. S. et al. Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 104, n. 1, p. 52-9, Jan 2009.

MENDES-DA-SILVA, C. et al. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 60, n. 4, p. 928-31, Dec 2002.

MOISEWITSCH, J. R.; LAUDER, J. M. Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 16, p. 7182-6, Aug 1 1995.

MONTELEONE, P. et al. Serotonergic dysfunction across the eating disorders: relationship to eating behaviour, purging behaviour, nutritional status and general psychopathology. **Psychol Med**, v. 30, n. 5, p. 1099-110, Sep 2000.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289-95, Sep 21 2006.

NOGUEIRA, M. I. et al. A practical device for histological fixative procedures that limits formaldehyde deleterious effects in laboratory environments. **J Neurosci Methods**, v. 72, n. 1, p. 65-70, Mar 1997.

NORDENG, H. et al. Neonatal withdrawal syndrome after in utero exposure to selective serotonin reuptake inhibitors. **Acta Paediatr**, v. 90, n. 3, p. 288-91, Mar 2001.

ORSOLINI, L.; BELLANTUONO, C. Serotonin reuptake inhibitors and breastfeeding: a systematic review. **Hum Psychopharmacol**, v. 30, n. 1, p. 4-20, Jan 2015.

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, n. 6, p. 672-7, Dec 2009.

O'RAHILLY, S.; FAROOQI, I. S. Human obesity as a heritable disorder of the central control of energy balance. **Int J Obes (Lond)**, v. 32 Suppl 7, p. S55-61, Dec 2008.

PAXINOS, G.; WATSON, C. R.; EMSON, P. C. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. **J Neurosci Methods**, v. 3, n. 2, p. 129-49, Dec 1980.

^aPIJL, H. et al. [Regulation of food intake and the treatment of obesity using centrally-active serotonergic drugs]. **Ned Tijdschr Geneesk**, v. 135, n. 16, p. 700-3, Apr 20 1991.

^bPIJL, H. et al. Effect of serotonin re-uptake inhibition by fluoxetine on body weight and spontaneous food choice in obesity. **Int J Obes**, v. 15, n. 3, p. 237-42, Mar 1991.

PIJL, H. et al. Plasma amino acid ratios related to brain serotonin synthesis in response to food intake in bulimia nervosa. **Biol Psychiatry**, v. 38, n. 10, p. 659-68, Nov 15 1995.

RAMOS, A. J. et al. The 5HT1A receptor agonist, 8-OH-DPAT, protects neurons and reduces astroglial reaction after ischemic damage caused by cortical devascularization. **Brain Res**, v. 1030, n. 2, p. 201-20, Dec 31 2004.

REBELLO, T. J. et al. Postnatal day 2 to 11 constitutes a 5-HT-sensitive period impacting adult mPFC function. **J Neurosci**, v. 34, n. 37, p. 12379-93, Sep 10 2014.

RIBAS, V. R. et al. Neonatal administration of fluoxetine did not alter the anxiety indicators, but decreased the locomotor activity in adult rats in the elevated plus-maze. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 66, n. 4, p. 844-7, Dec 2008.

RICCI, L. A.; MELLONI, R. H., JR. Repeated fluoxetine administration during adolescence stimulates aggressive behavior and alters serotonin and vasopressin neural development in hamsters. **Behav Neurosci**, v. 126, n. 5, p. 640-53, Oct 2012.

RICE, D.; BARONE, S., JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect**, v. 108 Suppl 3, p. 511-33, Jun 2000.

RODGERS, R. J.; HOLCH, P.; TALLETT, A. J. Behavioural satiety sequence (BSS): separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 97, n. 1, p. 3-14, Nov 2010.

RODRIGUEZ-PORCEL, F. et al. Neonatal exposure of rats to antidepressants affects behavioral reactions to novelty and social interactions in a manner analogous to autistic spectrum disorders. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 294, n. 10, p. 1726-35, Oct 2011.

ROSEBERRY, A. G. et al. Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. **Neuron**, v. 41, n. 5, p. 711-22, Mar 4 2004.

SAGAR, S. M.; SHARP, F. R.; CURRAN, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science**, v. 240, n. 4857, p. 1328-31, Jun 3 1988.

SANZ, E. J. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors in pregnant women and neonatal withdrawal syndrome: a database analysis. **Lancet**, v. 365, n. 9458, p. 482-7, Feb 5-11 2005.

SGHENDO, L.; MIFSUD, J. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. **J Pharm Pharmacol**, v. 64, n. 3, p. 317-25, Mar 2012.

SCHREIBER, R. et al. Effects of serotonin(1/2) receptor agonists on dark-phase food and water intake in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 67, n. 2, p. 291-305, Oct 2000.

SILVA, C. M. et al. Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. **Neurosci Lett**, v. 483, n. 3, p. 179-83, Oct 15 2010.

SIMANSKY, K. J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. **Behav Brain Res**, v. 73, n. 1-2, p. 37-42, 1996.

SHUEY, D. L. et al. Serotonin and morphogenesis. Transient expression of serotonin uptake and binding protein during craniofacial morphogenesis in the mouse. **Anat Embryol (Berl)**, v. 187, n. 1, p. 75-85, Jan 1993.

TANOSHIMA, R. et al. Population PK modelling and simulation based on fluoxetine and norfluoxetine concentrations in milk: a milk concentration-based prediction model. **Br J Clin Pharmacol**, v. 78, n. 4, p. 918-28, Oct 2014.

TECOTT, L. H. et al. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors. **Nature**, v. 374, n. 6522, p. 542-6, Apr 6 1995.

TECOTT, L. H. Serotonin and the orchestration of energy balance. **Cell Metab**, v. 6, n. 5, p. 352-61, Nov 2007.

VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 18, n. 2, p. 158-68, Feb 2008.

VITALIS, T. et al. Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. **Eur J Neurosci**, v. 26, n. 2, p. 331-44, Jul 2007.

XU, Y. et al. 5-HT_{2CRs} expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. **Neuron**, v. 60, n. 4, p. 582-9, Nov 26 2008.

WEST-EBERHARD, M. J. Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 5, p. 1388-92, Mar 1986.

^aWEST-EBERHARD, M. J. Developmental plasticity and the origin of species differences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102 Suppl 1, p. 6543-9, May 3 2005.

^bWEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, v. 304, n. 6, p. 610-8, Nov 15 2005.

WHITAKER-AZMITIA, P. M.; MURPHY, R.; AZMITIA, E. C. Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. **Brain Res**, v. 528, n. 1, p. 155-8, Sep 24 1990.

WHITAKER-AZMITIA, P. M.; AZMITIA, E. C. Astroglial 5-HT_{1a} receptors and S-100 beta in development and plasticity. **Perspect Dev Neurobiol**, v. 2, n. 3, p. 233-8, 1994.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. **Brain Res Bull**, v. 56, n. 5, p. 479-85, Nov 15 2001.

ZHENG, J. et al. Neonatal exposure to fluoxetine and fluvoxamine alters spine density in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 4, n. 2, p. 162-8, 2011.

ZESKIND, P. S.; STEPHENS, L. E. Maternal selective serotonin reuptake inhibitor use during pregnancy and newborn neurobehavior. **Pediatrics**, v. 113, n. 2, p. 368-75, Feb 2004.

ZIMMERBERG, B.; GERMEYAN, S. C. Effects of neonatal fluoxetine exposure on behavior across development in rats selectively bred for an infantile affective trait. **Dev Psychobiol**, v. 57, n. 2, p. 141-52, Mar 2015.

ANEXO A

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

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



Recife, 11 de agosto de 2010.

Ofício nº 305/2010

Da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Profª: Ligia Cristina Monteiro Galindo**
 Departamento Nutrição – CCS
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.024394/2010-93

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, *“Possíveis efeitos da manipulação farmacológica perinatal do sistema serotoninérgico sobre o comportamento alimentar, o metabolismo da glicose e o perfil lipídico em ratos.”*

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

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

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

Observação:

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição,
 Animais: Ratos, linhagem Wistar; sexo: Machos; Idade:
 Neonatos (1º ao 21º dia), Jovens (30 dias) e adultos; Nº de
 Animais : 140 (cento e quarenta).

Atenciosamente,

 Prof. Maria Teresa Jansen
 Presidente do CEEA