



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

GLAUBER RUDÁ FEITOZA BRAZ

**INIBIÇÃO DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA DURANTE
A LACTAÇÃO MELHORA A BIOENERGÉTICA
MITOCONDRIAL E BALANÇO OXIDATIVO NO CORAÇÃO
DE RATOS MACHOS E FÊMEAS JUVENIS**

**Recife
2017**

GLAUBER RUDÁ FEITOZA BRAZ

**INIBIÇÃO DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA DURANTE
A LACTAÇÃO MELHORA A BIOENERGÉTICA
MITOCONDRIAL E BALANÇO OXIDATIVO NO CORAÇÃO
DE RATOS MACHOS E FÊMEAS JUVENIS**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Claudia Jacques Lagranha

Co-orientadora: Aline Isabel da Silva

**Recife
2017**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Braz, Glauber Rudá Feitoza

Inibição da recaptção de serotonina durante a lactação melhora a bioenergética mitocondrial e balanço oxidativo no coração de ratos machos e fêmeas juvenis/ Glauber Rudá Feitoza Braz- 2017.

69 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Claudia Jacques Lagranha

Coorientadora: Aline Isabel da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em

Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2017.

Inclui referências e anexo

1. Lactação 2. Serotonina 3. Mitocôndria I. Lagranha, Claudia Jacques
(orient.) II. Silva, Aline Isabel da (coorient.) III. Título

573.679

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-169

GLAUBER RUDÁ FEITOZA BRAZ

**INIBIÇÃO DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA DURANTE A
LACTAÇÃO MELHORA A BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL E
BALANÇO OXIDATIVO NO CORAÇÃO DE RATOS MACHOS E
FÊMEAS JUVENIS**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 21/07/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Cláudia Jacques Lagranha (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr^o Leucio Duarte Vieira Filho (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Mariana Pinheiro Fernandes (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Sandra Lopes de Souza (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à família “Feitoza Braz”: minha mãe, Maria Dilma, meu pai, Osvaldo Braz, e meus irmãos, Raquel e Ravi. O amor e humor característicos do nosso cotidiano tornam a palavra família mais do que uma palavra para mim!

AGRADECIMENTOS

Nesse momento de “finalização” a gratidão se torna a palavra de maior peso para mim. De que outra forma eu poderia evoluir se não com a ajuda de muitos? Acredito que Deus me proporcionou um caminho tão bom que as tristezas e dificuldades são pequenas e quase sem valor diante da grandiosa benção de poder ser filho, amigo, aluno e pesquisador ao lado de pessoas que fazem a minha vida mais feliz. Por isso, nenhum fruto do trabalho desses últimos anos seria possível sem a ajuda Dele. Não somente por guiar meus passos, mas por trilhá-los ao meu lado, Deus é quem merece o meu primeiro **MUITO OBRIGADO!**

Tudo que tenho conquistado até hoje também não seria possível sem os esforços dos meus pais, Dilma e Osvaldo, no início da minha formação e dos meus irmãos. Ter sido estimulado desde pequeno a me esforçar nos estudos me faz querer cada vez mais honrar seus ensinamentos e permanecer nesse caminho. A alegria é ainda maior quando penso nos momentos em família e neles estão presentes os primeiros amigos: meus irmãos Raquel e Ravi. Sem vocês não teria graça, literalmente. Pelo apoio e incentivo de sempre (especialmente quando decidi estudar em outra cidade), o amor, a torcida, o suporte, a oração... **MUITO OBRIGADO!**

Os amigos de todas as horas também merecem ser registrados. Os verdadeiros amigos que tive o prazer de conhecer e que tornaram essa trajetória menos difícil, me ensinaram o quanto ainda tenho para compartilhar e aprender. Em diferentes contextos, cada um foi importante para o meu crescimento e tornaram esse trabalho ainda mais significativo para mim, pois muitas vezes foram os momentos que envolveram conversa, dança, vôlei, cinema, fim de semana, inglês, comida, festa e tantos outros, que me possibilitaram desfrutar de outras situações e perceber o quanto eu tive apoio e torcida para conduzir meu trabalho com mais determinação e comprometimento. De maneira especial, represento todos os amigos que estiveram presentes na maior parte dessa caminhada, nas pessoas de D’arc Cintra, Vitória Interaminense, Anderson Pedroza, Leonardo Galindo, Denis Carvalho, Júlio César, Camila Melo, Juliana Cabral e Wilka Araújo. A todos aqueles não citados, mas que contribuíram direta ou indiretamente durante essa fase sintam-se também merecedores e acolhidos por essas simples palavras. Não somente por me incentivarem, mas por dividir e entender minhas principais alegrias e dificuldades, **MUITO OBRIGADO!**

Todos os amigos que trabalharam ao meu lado e se dispuseram a me ajudar para que esse trabalho fosse concluído também merecem minha especial atenção.

Aos estudantes e professores de outros laboratórios que se prontificaram de alguma forma para o êxito desse trabalho agradeço verdadeiramente. Em especial ao Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício, no qual tenho a honra de ser integrante e dividir toda uma trajetória de alegrias, companheirismo e ciência. Tenho muito orgulho em fazer parte dessa família e trabalhar em um ambiente onde o esforço coletivo têm construído uma história de sucesso e bons frutos! Nada disso seria possível sem o esforço e comprometimento iniciais de nossas líderes, Professoras Claudia Lagranha e Mariana Pinheiro, e da contribuição de membros antigos e novos. Aos amigos que dividiram essa responsabilidade em todos os experimentos e que contribuíram de alguma maneira para que esse trabalho pudesse ser concretizado, sintam-se representados por Luciana Caroline, Cristiane Freitas, Anderson Pedroza, Reginaldo Correia, Alexsandro Emiliano, Shirley Souza, Cássia Andrade, Diorginis Soares, David Santana, Tercya de Araújo, Roger dos Santos, Diego de Araújo, Aiany Simões e Talita Ricarly. **MUITO OBRIGADO!**

Todo o aprendizado de hoje só foi possível pela indispensável presença de orientadoras que não somente me acolheram e acreditaram na minha capacidade, mas foram as responsáveis por moldar minha formação em todos os sentidos. Claudia Lagranha e Aline Isabel, vocês têm me proporcionado um crescimento profissional e pessoal incomparável. Se hoje me orgulho do trabalho que tenho realizado é porque tive o prazer e talvez a sorte de ter vocês como exemplo. O olhar concentrado, a disposição, a incrível humildade, a preocupação e a dedicação pelo que se comprometem, a compreensão e a firmeza, tem me inspirado a buscar o melhor de mim. Duas personalidades diferentes que guiaram os meus passos como verdadeiras mentoras. Certamente ainda tenho muito para aprender, inclusive com minhas próprias falhas, mas desejo que a amizade construída com cumplicidade e respeito durante esses quatro anos de convivência seja apenas o início de uma caminhada ainda mais vitoriosa. Por representarem um “divisor de águas” na minha vida pessoal e acadêmica, e estarem presentes nas minhas memórias mais significativas, **MUITO OBRIGADO!**

Por fim, agradeço ao apoio financeiro do CNPq, e a todos os que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização de um dos passos mais importantes da minha vida. **MUITO OBRIGADO!**

*“Sejam completamente humildes e dóceis, e sejam pacientes, suportando uns
aos outros com amor”*
Efésios, 4:2

RESUMO

As mitocôndrias desempenham processos altamente interconectados, principalmente no que diz respeito a produção de energia e de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estão presentes em grandes quantidades nos cardiomiócitos, favorecendo um alto consumo de oxigênio; o que vulnerabiliza este tecido às ações de EROS e à consequente disfunção mitocondrial. Um mecanismo subjacente associado a elevada produção de EROs é a elevação nos níveis de serotonina (5-HT) cerebrais, induzida por exemplo por manipulação farmacológica através da fluoxetina; um inibidor seletivo de recaptação de serotonina (ISRS) que age impedindo a recaptação da mesma no neurônio pré-sináptico. Em decorrência da ação desse fármaco, altos níveis de 5-HT têm sido associados à gênese de doenças cardiovasculares (DCVs). Embora igualmente prejudicial para ambos os gêneros, as DCVs associadas à disfunção mitocondrial parecem ser menos severas no gênero feminino. Os estudos sobre os efeitos cardíacos decorrentes da manipulação serotoninérgica neonatal mediados pela função mitocondrial ainda não estão bem elucidados, fato que nos induziu a avaliar os efeitos da inibição crônica de recaptação de 5-HT induzida por fluoxetina durante o período de lactação (1º ao 21º dia de vida) sobre a bioenergética mitocondrial e balanço oxidativo no coração de ratos machos e fêmeas, aos 60 dias de vida. Para tal, ratos *Wistar* machos e fêmeas foram divididos aleatoriamente em dois grupos durante o período de lactação, de acordo com o tratamento: Controle (NaCl 0,9%) e Fluoxetina (10mg/kg de peso corporal). Aos 60 dias de vida foram realizadas as seguintes análises: consumo de oxigênio mitocondrial, estimativa da produção de espécies reativas mitocondriais, potencial elétrico de membrana mitocondrial, biomarcadores de estresse oxidativo (Malondialdeído-MDA e Carbonilas), defesa antioxidante enzimática (atividade das enzimas superóxido dismutase-SOD, catalase-CAT e glutathione-S-transferase-GST), defesa antioxidante não enzimática (conteúdo de glutathione reduzida-GSH) e atividade da enzima do ciclo de Krebs (citrate sintase-CS). Nossos dados mostraram que, o tratamento com fluoxetina durante a lactação induziu aumento na capacidade respiratória mitocondrial, com menor produção de espécies reativas e aumento do potencial elétrico de membrana em ambos os gêneros. Em relação ao balanço oxidativo, os machos tratados com fluoxetina no período neonatal apresentaram menores níveis de MDA, e aumento na atividade da CAT, GPx e CS. Nas fêmeas, o tratamento neonatal com a fluoxetina reduziu o conteúdo de carbonilas, aumentou a atividade da SOD e CAT e não alterou os parâmetros hemodinâmicos. Dessa forma, sugere-se que a manipulação farmacológica durante o período crítico de desenvolvimento foi capaz de modular positivamente a bioenergética mitocondrial e balanço oxidativo cardíacos, independente de gênero.

Palavras-chave: Lactação. Serotonina. Mitocôndria. Estresse oxidativo. Coração.

ABSTRACT

Mitochondria perform highly interconnected processes, mainly related to energy production and reactive oxygen species (ROS). They are widely expressed in cardiomyocytes, favoring a high oxygen consumption; which makes this tissue vulnerable to ROS deleterious effects and consequent mitochondrial dysfunction. An underlying mechanism associated with increased ROS production is the elevated brain serotonin (5-HT) levels, induced by pharmacological manipulation through fluoxetine, for example; a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) that acts by preventing its reuptake into the presynaptic neuron. Due to this drug action, elevated levels of 5-HT have been associated with the onset of cardiovascular diseases (CVDs). Although equally harmful for both genders, CVDs associated with mitochondrial dysfunction appear to be less severe in females. Studies on the cardiac effects of neonatal serotonergic manipulation mediated by mitochondrial function remains scarce and inconclusive. This has led us to evaluate the effects of chronic inhibition of 5-HT reuptake induced by fluoxetine during the lactation period (1st to 21st day of life) on mitochondrial bioenergetics and oxidative balance in the heart of male and female rats at 60 days of age. For this, male and female *Wistar* rats were randomly divided into two groups during the lactation period, according to the treatment: Control (0.9% NaCl) and Fluoxetine (10mg/kg b.w.). The following analyzes were carried out at 60 days of life: Mitochondrial oxygen consumption, mitochondrial reactive species production, mitochondrial membrane potential, oxidative stress biomarkers (Malondialdehyde-MDA and Carbonyl content), enzymatic antioxidant defense (activity of the enzymes superoxide dismutase-SOD, catalase-CAT and glutathione-S-transferase-GST), non-enzymatic antioxidant defense (reduced glutathione-GSH) and Krebs cycle enzyme activity (Citrate synthase-CS). Our data showed that chronic treatment with fluoxetine during lactation period improves mitochondrial respiratory capacity, with less reactive species production and increased membrane potential in both genders. Related to the oxidative balance, male rats treated with fluoxetine in the neonatal period had lower levels of MDA, and increased CAT, GPx and CS activity. In females, neonatal fluoxetine treatment reduced carbonyl content, increased SOD and CAT activity and did not alter hemodynamic parameters. Thus, it is suggested that pharmacological manipulation during the critical period of development could positively modulate mitochondrial bioenergetics and cardiac oxidative balance, regardless of gender.

Keywords: Lactation. Serotonin. Mitochondria. Oxidative stress. Heart.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1 – Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidant defense in rat heart

Figure 1 – Effect of neonatal selective serotonin reuptake inhibitor exposure during nursing phase on mitochondrial bioenergetics in male rats heart at 60 days of life	37
Figure 2 – Effect of neonatal selective serotonin reuptake inhibitor exposure during nursing phase on oxidative stress biomarker in heart of male rats at 60 days of life	38
Figure 3 – Effect of neonatal selective serotonin reuptake inhibitor exposure during nursing phase on antioxidant defense on heart of male rats at 60 days of life	39

Artigo 2 – Serotonin modulation in neonatal age does not impair cardiovascular physiology in adult female rat: Hemodynamics and oxidative stress analysis

Figure 1 – Baseline cardiovascular parameters	46
Figure 2 – Sympathetic–vagal balance and intrinsic heart rate	47
Figure 3 – Body weight evaluation	48
Figure 4 – Oxidative stress biomarker	48
Figure 5 – Antioxidant defense analysis	49
Figure 6 – Metabolic enzyme in brainstem and heart	49

RESULTADOS COMPLEMENTARES

Figura 1 – Peso corporal (g) de ratos <i>wistar</i> machos, dos grupos controle (NaCl 0,9%, 10ml/kg peso corporal, n=8) e tratado com fluoxetina (10mg/kg peso corporal, n=8)	52
Figura 2 – Peso corporal (g) de ratas <i>wistar</i> fêmeas, dos grupos controle (NaCl 0,9%, 10ml/kg peso corporal, n=8) e tratado com fluoxetina (10mg/kg peso corporal, n=8)	52
Figura 3 – Consumo de oxigênio e controle respiratório de mitocôndrias cardíacas (nmol/min/mg proteína) de ratas <i>wistar</i> fêmeas aos 60 dias de vida, dos grupos controle (NaCl 0,9%, 10ml/kg peso corporal, n=6) e tratado com	

fluoxetina (10mg/kg peso corporal, n=7)
..... 52

Figura 4 – Estimativa da produção de espécies reativas (área sobre a curva) em mitocôndrias cardíacas de ratas *wistar* fêmeas aos 60 dias de vida, dos grupos controle (NaCl 0,9%, 10ml/kg peso corporal, n=6) e tratado com fluoxetina (10mg/kg peso corporal, n=5) 53

Figura 5 – Potencial elétrico de membrana (área sobre a curva) de mitocôndrias cardíacas de ratas *wistar* fêmeas aos 60 dias de vida, dos grupos controle (NaCl 0,9%, 10ml/kg peso corporal, n=3) e tratado com fluoxetina (10mg/kg peso corporal, n=3) 53

LISTA DE TABELAS

Artigo 2 – Serotonin modulation in neonatal age does not impair cardiovascular physiology in adult female rat: Hemodynamics and oxidative stress analysis

Table 1 – Effect of fluoxetine treatment on spectral analysis of systolic arterial pressure (SAP) and pulse interval (PI) 46

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina/Serotonina
5-HTR	Receptor de 5-hidroxitriptanina
5-HTT	5-hidroxitriptofano
ATP	Adenosina trifosfato
BPM	beats per minute
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
Cu, Zn-SOD	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs/ROS	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and drug administration/Administração de alimentação e drogas
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo no estado reduzido
GPx	Glutaciona peroxidase
GSSG	Glutaciona oxidada
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona-S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ O	Água
HF	High-frequency bands
HR	Heart rate
ISRS/SSRI	Inibidores seletivos de recaptção de serotonina
LF	Low-frequency bands
MAO-A	Monoamina oxidase A
MAO-B	Monoamina oxidase B
MAP	Mean Arterial Pressure
MDA	Malondialdeído
Mn-SOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo no estado reduzido
NADH-desidrogenase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase
O ₂ [•]	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
PI	Pulse interval
PTPM	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial

SAP	Systolic arterial pressure
SERT	Transportador de serotonina
SH	Grupamento tiol
Smac/DIABLO	Segundo ativador mitocondrial de caspase/Proteína de ligação-IAP direta com baixo pl
SOD	Superóxido dismutase
TPH1	Triptofano hidroxilase 1
TPH2	Triptofano hidroxilase 2
$\Delta\Psi_m$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 <i>Período crítico de desenvolvimento e tecido cardíaco</i>	18
2.2 <i>Doenças cardiovasculares e diferença de gênero</i>	20
2.3 <i>Caracterização da serotonina</i>	22
2.4 <i>Manipulação serotoninérgica e efeitos cardiovasculares</i>	24
2.5 <i>Mitocôndria: características e funções</i>	27
2.6 <i>Mitocôndria e serotonina: interação no tecido cardíaco</i>	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 <i>Objetivo geral</i>	33
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	33
4 RESULTADOS – ARTIGOS ORIGINAIS PUBLICADOS	34
4.1 <i>Artigo 1 – Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidant defense in rat heart</i>	35
4.2 <i>Artigo 2 – Serotonin modulation in neonatal age does not impair cardiovascular physiology in adult female rat: Hemodynamics and oxidative stress analysis</i>	43
5 RESULTADOS COMPLEMENTARES	52
5.1 <i>Machos</i>	52
5.2 <i>Fêmeas</i>	52
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE A - ARTIGOS NÃO REFERENTES À DISSERTAÇÃO, PUBLICADOS NO PERÍODO DO MESTRADO	68
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA	69

1 INTRODUÇÃO

A menção do termo período crítico de desenvolvimento é conhecida desde a década de 70, tendo sido atribuído a uma janela temporal do desenvolvimento de órgãos e sistemas vulnerável a influências externas. Portanto, o organismo, susceptível a estímulos ambientais, pode ser modificado e ter comprometimento de sua função (Dobbing, 1970). Partindo desse pressuposto, a exposição neonatal a insultos, como os farmacológicos, poderia certamente contribuir para alterações biológicas posteriores, tais como modificações bioquímicas.

Um importante neurohormônio presente durante as fases de desenvolvimento é a serotonina ou 5-hidroxitriptamina – 5-HT, que possui atuação complexa e diversificada não somente no trato gastrointestinal, onde é predominante sintetizada, como também no encéfalo, local de intensa atuação e alvo crescente de estudos, e tecidos periféricos. De acordo com sua íntima função determinante no processo de desenvolvimento, a alteração dos níveis de 5-HT durante esse período de sensibilidade maturacional tornou-se um interessante tema de estudo na área da manipulação serotoninérgica em períodos precoces da vida e consequências a longo prazo, fomentando discussões acerca da vasta atuação dessa molécula e o quanto ainda se desconhece sobre seus efeitos.

Entre as múltiplas atuações da 5-HT no organismo, seus efeitos sobre o sistema cardiovascular têm gerado discussões pela controvérsia de achados na área. Tornam-se então necessárias as investigações que favoreçam uma melhor elucidação dessa temática, favorecendo o conhecimento científico para futuras ações de intervenção no âmbito da saúde pública relacionada às doenças cardiovasculares, que embora estejam atreladas em parte, a fatores ambientais e diferenças sociais entre homens e mulheres, ainda possuem etiologia multifatorial complexa. Como decisivo fator biológico, a diferença nos hormônios sexuais está associada diferentemente com a incidência de doenças cardiovasculares. Dessa forma, observamos que a compreensão de mecanismos associados a processos patológicos é de fundamental importância.

De maneira única, as mitocôndrias figuram com destaque entre organelas de importância vital. Sua relação com processos de saúde e doença são fortemente corroboradas por pesquisas científicas que buscam delinear de que maneira seu funcionamento regula os mais variados processos biológicos como homeostase redox, fluxo de íons e produção de energia, e, por outro lado, como o prejuízo à sua função está intimamente relacionada à indução de processos pré-patogênicos, como doenças comportamentais, neurodegenerativas e metabólicas.

De modo a sumarizar o conteúdo exposto a seguir, o presente trabalho está estruturado por uma fundamentação teórica, que conduziu nossa hipótese de que o tratamento crônico com fluoxetina durante a lactação prejudica a bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo cardíacos na vida adulta, seguida pelos objetivos que delinearam a realização da mesma para atender nossa problemática, apresentação dos resultados na forma dos artigos originais e considerações finais acerca dos nossos achados. Como resultados, nossa pesquisa originou dois artigos originais, intitulados *Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidante defense em rat heart*, publicado em 2016 na revista *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* de fator de impacto 1,91 e Qualis B2 em Ciências Biológicas II; e *Serotonin modulation in neonatal ages does not impair cardiovascular physiology in adult female rats: Hemodynamics and oxidative stress analysis*, publicado em 2016 na revista *Life Sciences* de fator de impacto 2,93 e Qualis B1 em Ciência Biológicas II.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Período crítico de desenvolvimento e tecido cardíaco

O estudo da associação entre insultos precoces e efeitos biológicos tardios tem concentrado esforços de pesquisadores em todo o mundo. O entendimento dessa relação visa compreender e fortalecer a ideia de que o estímulo recebido durante um período de vulnerabilidade do organismo pode interferir no desenvolvimento de processos maturacionais e afetar a estrutura e funcionamento de órgãos e sistemas de maneira permanente. Sendo assim, o termo período crítico de desenvolvimento refere-se a uma janela de desenvolvimento exclusiva em fases iniciais da vida, que não pode ser revertida ou repetida posteriormente, onde os processos organizacionais acontecem mais rapidamente e podem ser modificados com maior facilidade (Dobbing, 1970).

Sabendo que cada espécie e sistema biológico possui processos de desenvolvimento específicos, Morgane *et al.*, 2002 discute que a taxa de mudança nesses processos é o fator crucial que prediz a duração e importância dos mesmos. Ainda de acordo com Morgane, através de seus estudos sobre o crescimento, desenvolvimento e especialização de funções no sistema nervoso central, a duração e temporização de processos específicos do desenvolvimento encefálico em humanos varia entre os primeiros meses de gestação até os 15 meses de vida, tendo como período crítico de crescimento e desenvolvimento cerebral a fase pré-natal, em seu último trimestre. Por outro lado, em ratos, essa fase de maior vulnerabilidade encefálica encontra-se na fase pós-natal (lactação), durante os primeiros 21 dias de vida (Morgane *et al.*, 2002).

Como evidenciado, o desenvolvimento encefálico possui fases cruciais para a consolidação de suas funções. Sendo este um órgão que coordena a função de outros órgãos e sistemas, a integridade no seu desenvolvimento favorece a preservação da sua atuação central e periférica, como o controle da função cardiovascular por exemplo, exercida por regiões do encéfalo que integram os sinais de barorreceptores periféricos e quimiorreceptores centrais e periféricos, modulando a atividade simpática do coração (Smith, 1974; Tahsili-Fahadan e Geocadin, 2017). Para o perfeito funcionamento cardíaco, a integração e consolidação das fases de desenvolvimento e maturação são decisivas e merecem ser destacadas.

Sequencialmente, quatro processos constituem o desenvolvimento cardíaco: 1. Migração interna de subtipos celulares mesodérmicos; 2.

Especificação dessas células para formar o mesoderma cardíaco; 3. Refinamento e diferenciação em diferentes tipos de células cardíacas e tecidos constituintes e; 4. Finalização do posicionamento, arranjo e alterações na forma das células cardíacas para a terminação da morfogênese, com posterior formação dos septos e câmaras cardíacas especializadas para vertebrados (Ahmad, 2017). Esse desenvolvimento cardíaco pós-natal é acompanhado ainda por um aumento no tamanho do órgão de quase 4 vezes, em resposta ao rápido aumento no peso corporal entre o nascimento e a puberdade, com um consequente aumento proporcional na contratilidade cardíaca, volume sistólico, débito cardíaco e pressão sanguínea (Li *et al.*, 2014).

Acerca da composição cardíaca, diversos tipos celulares estão presentes como os fibroblastos, encontrados em predominância na parede do epicárdio cardíaco, e os cardiomiócitos, que ocupam o maior volume do tecido cardíaco devido ao seu tamanho e formato característicos (Furtado, Costa, *et al.*, 2016). O início do desenvolvimento desses tipos celulares dá-se ainda na fase embrionária por volta de 9,5 dias após a fertilização (Furtado, Nim, *et al.*, 2016). Originam-se de tubos lineares dispostos ao longo do eixo ântero-posterior e apresentam um influxo e efluxo circulatório que seguem, respectivamente, da porção ínfero-posterior do coração, através das veias vitelinas, até a região ântero-superior, por meio do tronco arterioso. Mais tarde, a polaridade ântero-posterior torna-se lateralizada com a formação dos átrios e a região que anteriormente comportava a entrada do sangue no coração, torna-se possivelmente os ventrículos, com a função de bombeamento sanguíneo externo (Manner, 2000).

A especialização do tecido cardíaco sobrepõe a sua plasticidade, notável pela composição celular complexa e uma compartimentação bem definida (Weber *et al.*, 2013). Durante o desenvolvimento (ainda na fase fetal), há uma proliferação ativa dos cardiomiócitos auxiliada pelos fibroblastos. Entretanto, é na fase adulta que os fibroblastos parecem estar mais associados com o suporte à hipertrofia dos cardiomiócitos bem como o seu remodelamento, possuindo papel importante na síntese de matriz extracelular e fatores de crescimento após alguma injúria sofrida pelos miocárdios (Ieda, 2016). Em roedores, a fase de proliferação encontra-se entre os dias 1 e 4 pós-natal, e a fase hipertrófica entre 7 e 14 dias do neonato (Vite *et al.*, 2015). O poder regenerativo reduzido do tecido cardíaco de mamíferos pode ser atribuído em parte a essa diferenciação tardia dos cardiomiócitos, que só é concretizada na fase adulta (Li *et al.*, 1996; Kajstura *et al.*, 2010).

A reposta de células cardíacas à injúria sofrida pode variar de acordo com a fase de desenvolvimento. Em estágios embrionários, caracterizada pela proliferação dos cardiomiócitos, o crescimento compensatório em cardiomiócitos parece favorecer a recuperação do tecido perdido. Ao passo que o organismo se desenvolve, a regeneração cardíaca diminui; com recuperação da maior parte do tecido lesionado e efeitos deletérios mínimos, na fase neonatal, em contraste com grande deposição de matriz extracelular seguida de lesão em maior grau, em insultos ocorridos na fase adulta (Drenckhahn *et al.*, 2008; Kikuchi e Poss, 2012; Uygur e Lee, 2016). Essa diferença no grau de comprometimento do coração frente aos insultos, não é específica somente aos estágios de desenvolvimento cardíacos. De maneira semelhante, os hormônios sexuais possuem uma íntima relação com as doenças cardiovasculares, influenciando diferentemente o seu aparecimento e severidade (Arnold *et al.*, 2017; Lucas-Herald *et al.*, 2017).

2.2 Doenças cardiovasculares e diferença de gênero

Quase metade das mortes por doenças crônico-degenerativas em 2012 foram atribuídas a doenças cardiovasculares, e a estimativa de mortalidade anual para 2030 é projetada para cerca de 27% a mais do que em 2012; o que significa 1,7 milhões de óbitos a cada ano. Dados de 2014 relataram que os homens possuem uma maior prevalência de hipertensão do que mulheres (Who, 2014).

Diversos fatores contribuem para o elevado risco de desenvolver doenças cardiovasculares, como sedentarismo, má alimentação, fumo e álcool; bem como comorbidades e complicações associadas, a exemplo da obesidade e diabetes. Entretanto, diante de uma etiologia multifatorial a maior prevalência de cardiopatias ainda se encontra entre os homens. Ainda que as mulheres apresentem maior susceptibilidade para algumas patologias como osteoporose, depressão e doenças autoimunes, a taxa de disfunções cardiovasculares permanece menor comparada aos homens, fato que vem sendo atribuído ao efeito cardioprotetor dos estrogênios (Aldrighi *et al.*, 2004; Knowlton e Korzick, 2014). Esse dimorfismo sexual em doenças cardiovasculares parece favorecer não somente a fisiologia cardiovascular, como a duração do potencial de ação e função contrátil, e parâmetros bioquímicos como a eficiência energética proveniente das mitocôndrias (Blenck *et al.*, 2016).

Múltiplas ações têm sido atribuídas aos estrogênios, ésteres derivados do colesterol encontrados de maneira mais abundante em mulheres. Receptores

funcionais de estrogênio, alfa e beta, têm sido descritos em homens e mulheres, no ventrículo do miocárdio, possuindo efeitos genômicos e não genômicos (Leinwand, 2003). Atuando através dessa interação com os seus receptores, os estrogênios destacam-se pela participação em processos de crescimento e diferenciação do tecido mamário, inibição da diferenciação de osteoclastos, neuroproteção e cardioproteção (Gruber *et al.*, 2002).

Acerca do papel dos estrogênios sobre a função cardiovascular, relatos clínicos já demonstraram níveis endógenos de estradiol elevados imediatamente após episódios de infarto do miocárdio em homens que sobreviveram ao ocorrido. Entretanto, os níveis de estradiol nesses homens encontravam-se menores antes e após o infarto. Os níveis de progesterona por sua vez apresentaram-se contrários: diminuídos após o infarto e sem diferença nos momentos pré e pós infarto (Kalin e Zumoff, 1990). Outros estudos apontam ainda que a sobrevivência a episódios de infarto do miocárdio e outras doenças cardiovasculares é maior em fêmeas do que em machos (Sullivan *et al.*, 1995; Lagranha *et al.*, 2010; Sbroggio *et al.*, 2011; Unsold *et al.*, 2014; Meyer e Barton, 2016), sendo ainda fêmeas em idade pós-menopausa mais resistentes em comparação àquelas em idade pré-menopausa, por apresentarem maiores níveis de estrogênios (Reckelhoff, 2001; Yang *et al.*, 2013).

O fato de homens apresentarem uma maior pressão arterial do que mulheres em idades similares encontram reforço da *American Heart Association* que pontuam uma maior prevalência de pressão alta entre homens, especialmente quando abaixo dos 45 anos. De maneira oposta, mulheres com baixos níveis de estrogênios, característica prevalente acima dos 65 anos, lideram as estatísticas de pressão arterial elevada, o que fortalece a relação diretamente proporcional entre níveis hormonais e proteção cardiovascular (Go *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2015).

Essa relação parece não ser influenciada por especificidades de desenvolvimento dos cardiomiócitos entre homens e mulheres, uma vez que o mesmo parece ser equivalente entre homens e mulheres em idades precoces da vida (Grandi *et al.*, 1992). Em termos de função, foi demonstrado que mulheres possuem uma melhor função diastólica do que homens da mesma idade, e com o envelhecimento os homens acabam diminuindo a função diastólica, fato não observado em mulheres (Grandi *et al.*, 1992). Essa discussão em relação à função cardíaca associada à regulação do processo trófico de tecidos como o coração enfatiza a necessidade de entendimento sobre moléculas que influenciam esse processo, como a serotonina, discutido em seguida.

2.3 Caracterização da serotonina

Classificada bioquimicamente como uma bioamina, a serotonina - 5-HT foi primeiramente estudada na década de 30 quando Erspamer, em seus estudos sobre o sistema enterocromafim, identificou uma substância ativa presente no trato gastrointestinal que a partir de técnica fluorimétrica era compatível a compostos de indol com a presença de um grupo amina, caracterizando-a como uma enteramina. Posteriormente, Pagar e colaboradores isolaram e caracterizaram essa substância, introduzindo o nome de serotonina, que apresentava propriedades séricas de vasoconstrição mediando o processo de coagulação; de maneira até mais eficaz do que a epinefrina (Rapport *et al.*, 1948a; b).

Embora o trato gastrointestinal contribua de maneira predominante na síntese de 5-HT, o sistema nervoso central depende exclusivamente da síntese local de 5-HT, dada sua impossibilidade em ultrapassar a barreira hematoencefálica (Bradley, 1984). Nesse contexto, a 5-HT é sintetizada (cerca de 2%) em nove populações de neurônios diferentes, localizados nos núcleos da rafe do tronco encefálico, que emitem projeções para inervar várias regiões do encéfalo (Molliver, 1987; Burke and Heisler, 2015).

A biossíntese da serotonina é mediada pelas enzimas triptofano hidroxilase (TPH) 1 e 2, diferentemente expressas no organismo. Enquanto o subtipo TPH 1 é predominantemente encontrado em células da glândula pineal e do trato gastrointestinal (células enterocromafins), a TPH 2 é limitada ao sistema nervoso central, pelos núcleos da rafe do tronco encefálico, e periférico, pelo sistema nervoso entérico (Cote *et al.*, 2003; Walther e Bader, 2003). Para que haja biossíntese, o aminoácido essencial precursor, triptofano, precisa ser hidroxilado na fase preliminar a 5-hidroxitriptofano (5-HTT) pela TPH 1; enquanto na fase seguinte, catalisada por meio da TPH 2, há uma descarboxilação do 5-HTT sintetizando por fim a 5-HT (Renson *et al.*, 1962).

Um conjunto de receptores serotoninérgicos (5-HTR) regulam os múltiplos efeitos da serotonina, e são classificados de acordo com suas características evolutivas, estruturais e farmacológicas, bem como seu sistema de transdução intracelular (Lam *et al.*, 2010). Possuem uma conformação que apresenta sete domínios transmembrana, sendo uma extremidade extracelular amino-terminal e uma extremidade intracelular carboxi-terminal (Nebigil e Maroteaux, 2003). Sete famílias estabelecidas de 5-HTR são conhecidos e diferentes subtipos têm sido descritos: 5-HT₁R (1A, 1B, 1D, 1E e 1F), 5-HT₂R (2A-C), 5-HT₃R (3A-E),

5HT₄R, 5-HT₅R (5A e 5B), 5-HT₆R e 5-HT₇R (Hoyer *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2016).

A partir desses receptores predominantemente acoplados à proteína G, a 5-HT age de maneira heterogênea em órgãos centrais e periféricos desempenhando uma variedade de efeitos como os que dizem respeito a performance cognitiva (Khaliq *et al.*, 2006), humor (Jenkins *et al.*, 2016), ritmo circadiano (Nakamaru-Ogiso *et al.*, 2012), homeostase energética (Halford e Blundell, 1996; Da Silva, Braz, Pedroza, *et al.*, 2015), controle respiratório (Tiradentes *et al.*, 2014), resposta imune (Leon-Ponte *et al.*, 2007), modulação do tônus vascular (Cho *et al.*, 1994; Linder *et al.*, 2010) entre outras.

No sistema cardiovascular, pontualmente, o papel da 5-HT ainda é controverso, pois dependendo do receptor atuante ou inibido a mesma pode relacionar-se a processos de vasodilatação ou vasoconstrição (Crumpton *et al.*, 1959; Silverberg *et al.*, 1979), hipotensão ou hipertensão (Demoulin *et al.*, 1981; Watts *et al.*, 2012; Vantrease *et al.*, 2015), sugerindo um papel dúbio que favorece tanto a terapêutica de doenças cardiovasculares quanto o aparecimento das mesmas.

Um importante regulador da concentração de 5-HT é o transportador de serotonina (SERT). SERT é caracterizado como uma proteína integral de membrana com 12 domínios α -hélice, que pertence à família de neurotransmissores transportadores (simportadores) de sódio (Martel, 2006). No encéfalo é limitado aos núcleos da rafe e axônios serotoninérgicos. Periféricamente, é encontrado nas plaquetas, intestino, coração e nos vasos sanguíneos da glândula adrenal e dos rins. SERT pode controlar a síntese de 5-HT, modulando a atividade da enzima TPH, assim como atua na sinalização de 5-HT por agir na recaptação e na concentração de 5-HT no neurônio pré-sináptico (Kriegebaum *et al.*, 2010), podendo desta forma inativar ou metabolizar a 5-HT (Gershon, 2003).

O processamento metabólico da 5-HT se dá por uma flavoenzima denominada monoamina oxidase (MAO). Ligada a membrana mitocondrial externa, a MAO é responsável pela deaminação de monoaminas e catecolaminas, em uma reação que envolve amônia e produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂); regulando a liberação de 5-HT das vesículas sinápticas. Duas isoformas são atualmente bem conhecidas: MAO-A e -B, que diferem pela especificidade de substrato e sensibilidade a inibidor.

Em termos de localização, no encéfalo encontra-se MAO-A principalmente em neurônios noradrenérgicos e dopaminérgicos, enquanto a MAO-B pode ser

encontrada em neurônios serotoninérgicos (Westlund *et al.*, 1988). Periféricamente, a presença de MAO-A é encontrada primordialmente na placenta, fígado, intestino, glândula tireóide e coração; enquanto órgãos como fígado, rins e pâncreas possuem MAO-B com predominância (Bortolato e Shih, 2011; Kaludercic *et al.*, 2014). Como visto, o coração também possui certa especificidade em se tratando de metabolização da serotonina; entretanto sua associação com a função cardíaca vai além dessa relação e ainda há muito a ser explorado, como discutido a seguir.

2.4 Manipulação serotoninérgica e efeitos cardiovasculares

Tendo evidenciado o amplo papel da serotonina no organismo, seu envolvimento em mecanismos cerebrais especificamente tem recebido grande atenção por se tratar de uma área historicamente conhecida pela clássica atuação do sistema serotoninérgico. Nesse contexto, não somente a própria 5-HT como agonistas, antagonistas e inibidores de sua função são alvos de estudos sobre a influência dessa manipulação no encéfalo e funções correlatas nos mais variados campos de estudo (De Souza *et al.*, 2004; Weng *et al.*, 2015; Matott e Kline, 2016; Cheah *et al.*, 2017; Pratelli *et al.*, 2017). Embora muito já se tenha avançado no entendimento da 5-HT e sua múltipla atuação biológica, efeitos centrais mostram-se significativamente mais discutidos comparados a efeitos sistêmicos. Nesse panorama, a literatura necessita de contribuições mais substanciais a fim de ampliar o “estado da arte” e favorecer novas discussões e aplicações para a saúde.

Do ponto de vista clínico, inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) possuem grande relevância, dada a preferência a agentes que compõem essa classe, como fluoxetina (Prozac), sertralina (Zoloft), paroxetina (Paxil), fluvoxamina (Luvox) e citalopran (Celexa), para o tratamento de distúrbios psicológicos como depressão e transtornos de ansiedade. Essa classe de fármacos constitui a primeira família de drogas desenvolvidas com atuação específica, reduzidos efeitos colaterais e boa tolerabilidade, que agem bloqueando o SERT e aumentando a concentração de 5-HT na fenda sináptica e sua neurotransmissão (Masand e Gupta, 1999; Krishnan e Nestler, 2008). Mesmo diante do atual conhecimento sobre ISRS, ainda há muito para elucidar sobre a relação entre a inibição da recaptação da 5-HT e efeitos metabólicos a curto ou longo prazo.

A fluoxetina é um dos antidepressivos mais conhecidos da classe dos ISRS, tendo sido a primeira molécula a ser sintetizada para o tratamento de distúrbios

psicológicas via ISRS e com maior prescrição até os dias atuais (Wong *et al.*, 1974; Nonacs e Cohen, 2003). Após ter sua eficácia clínica comprovada, a fluoxetina foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1987, comercializada também como Prozac.

As primeiras pesquisas sobre serotonina e depressão na área de psicofarmacologia foram lideradas por Wong e datam da década de 70, onde seu grupo de pesquisa concentrou-se no desenvolvimento de drogas com um maior potencial terapêutico do que os antidepressivos tricíclicos, dada as propriedades cardiotoxícas e anticolinérgicas já apresentadas por essa classe, e que apresentassem um mecanismo de ação seletivo para a recaptação de serotonina com reduzidos efeitos adversos (Wong *et al.*, 1974; Lopez-Munoz e Alamo, 2009). Posteriormente, suas propriedades farmacocinéticas também foram relatadas, como alto perfil lipofílico e alta afinidade de ligação à proteínas plasmáticas, favorecendo sua distribuição e atuação cerebral (Perez-Caballero *et al.*, 2014).

A conversão metabólica da fluoxetina a norfluoxetina é realizada no fígado; e esse metabólito ativo possui características peculiares e bem descritas na literatura, como um longo tempo de meia-vida, facilidade ao ultrapassar a placenta e a barreira hematoencefálica (Francis-Oliveira *et al.*, 2013), além de ser encontrada também no leite materno (Davanzo *et al.*, 2011). Entre outros antidepressivos, a fluoxetina é o fármaco identificado em maior nível em neonatos cujas mães seguiram o tratamento farmacológico em questão (Weissman *et al.*, 2004).

Sendo a 5-HT primordial para a regulação do desenvolvimento de tecidos centrais e periféricos, a manipulação do sistema serotoninérgico pode influenciar a morfogênese e crescimento celular (Buznikov *et al.*, 2001). Diante disso, o uso materno de ISRS tem sido alvo de estudos experimentais e populacionais que buscam melhor elucidar a relação entre 5-HT e desenvolvimento cardíaco da prole. Sobre a prevalência de riscos associados ao uso materno de ISRS, há relatos de anormalidades anatomofisiológicas (Davis *et al.*, 2007) e cardiopatia congênita (Wichman *et al.*, 2009) em cerca de 3% (em ambos os estudos) de crianças expostas a ISRS no período fetal, sugerindo uma relativa segurança do uso de antidepressivos na gestação.

Huybrechts *et al.* por outro lado, demonstraram uma maior prevalência de malformações cardíacas em lactentes cujas mães utilizaram ISRS durante a gestação comparado àquelas não expostas. Entretanto, ao ajustar a coorte de gestantes para as que apresentavam depressão somente, não houve diferença

significativa entre os grupos; atribuindo-se tal resultado a presença de outros potenciais fatores de risco para anomalias cardíacas como tabagismo, má alimentação, obesidade, diabetes e hipertensão (Huybrechts *et al.*, 2014).

Recente estudo conduzido por Nembhard *et al.* argumenta ainda que o maior risco a cardiopatias congênitas em filhos de mães tratadas com ISRS durante a gestação e/ou lactação pode não ser atribuído à exposição em si ou não somente a esse fator; pois concomitantemente identificou-se maiores polimorfismos em genes relacionados a vias de síntese de neurotransmissores; mecanismo subjacente associado a depressão e não ao uso de ISRS, sugerindo uma influência genética (Nembhard *et al.*, 2017). Nota-se então que a ausência de estratificações pertinentes pode induzir discrepâncias entre efeitos deletérios ou não em estudos sobre o uso de ISRS no período periconcepcional.

A atuação serotoninérgica em mecanismos não clássicos durante a fase adulta também contribui cientificamente para o entendimento mais amplo do papel dessa bioamina em processos da saúde e doença. Nesse contexto, Selim *et al.*, encontraram maiores níveis de 5-HT plasmática em pacientes com insuficiência cardíaca proporcional a severidade da disfunção, de maneira independente de idade, gênero e doenças correlatas (Selim *et al.*, 2017). Meschin *et al.*, sugeriram ainda que alguns dos efeitos cardíacos adversos induzidos pela manipulação serotoninérgica podem ser explicados parcialmente pela modulação do acoplamento excitação-contração do músculo cardíaco com distúrbio no fluxo de cálcio, encontrados em seu estudo após tratamento agudo com agonista seletivo de 5-HT₄R em ratos machos (Meschin *et al.*, 2015).

Contudo, Dutschmann *et al.*, demonstraram que a administração aguda de agonistas de 5-HT₁R e 5-HT₄R restaurou a atividade simpática, resistência vascular e frequência cardíaca em ratos tratados com agonista de receptor opioide (Dutschmann *et al.*, 2009) – classe de analgésico com uso restrito por seus efeitos colaterais, incluindo depressão da função cardiorrespiratória (Gunther *et al.*, 2017).

De maneira crônica, os efeitos da hiperserotoninemia foram primeiramente reportados por Gustafsson *et al.*, onde três meses de administração de serotonina em ratos repercutiu negativamente sobre parâmetros morfológicos e ecocardiográficos (Gustafsson *et al.*, 2005). De modo similar, Hauso *et al.*, associaram uma administração crônica de 5-HT à insuficiência aórtica e maior peso do coração, efeitos abolidos com a administração concomitante de um antagonista de 5-HT_{2B/2C}R (Hauso *et al.*, 2007). Por outro lado, efeitos cardioprotetores foram demonstrados de maneira pioneira por Ayme-Dietrich *et*

al., que conduziram um tratamento com antagonista seletivo de 5-HT_{2B}R por 14 semanas em ratos espontaneamente hipertensos, demonstrando melhoria na vasodilatação coronária e preservação na fração de ejeção cardíaca (Ayme-Dietrich *et al.*, 2015).

Com base no exposto previamente, nota-se que os receptores serotoninérgicos medeiam a função da 5-HT diferentemente e são peças fundamentais para o entendimento da variedade funcional dessa molécula. Em se tratando de alvos serotoninérgicos e metabolismo, especificamente, uma organela que também expressa receptores serotoninérgicos e está intimamente relacionada a processos de saúde e doença via 5-HT, é a mitocôndria. Sua relevância nessa área de estudo e interação com a serotonina é discutida a seguir.

2.5 Mitocôndria: características e funções

Todos os processos biológicos são dependentes da manutenção de uma homeostase energética celular. Nesse sentido, um funcionamento eficiente das mitocôndrias pode certamente preservar a integridade do processo intracelular. Esta organela vital adquiriu maior significância há mais de 150 anos, desde a descoberta da sua possível estrutura intracelular, e anos mais tarde pela ocorrência de sua presença na maioria das células (Ernster e Schatz, 1981). Naturalmente, em relação à história das mitocôndrias, a teoria quimiosmótica de Mitchell da fosforilação oxidativa continua a ser o principal marco, premiado com o Prêmio Nobel de Química em 1978.

De fato, a função clássica das mitocôndrias defendida por Mitchell e já bem estabelecida é a síntese de adenosina trifosfato-ATP (um intermediário energético utilizado pelo organismo como “combustível” para uma gama de reações metabólicas pertinentes), promovida pelo acoplamento de um gradiente eletroquímico (transporte de elétrons e bombeamento de prótons) através da membrana mitocondrial interna (Mitchell, 1966); embora ainda esteja envolvida com o fluxo de cálcio, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sinalização redox e mecanismos de apoptose e necrose (Koopman *et al.*, 2010).

A estrutura mitocondrial alongada compreende uma membrana externa e uma interna (ambas constituídas por uma bicamada de fosfolipídeos) separadas por um espaço intermembranar. Atréados à membrana mitocondrial interna, cinco complexos proteicos constituem a cadeia transportadora de elétrons envolvida na produção de energia mencionada anteriormente. As dobras internas

da membrana interna originam cristas que aumentam a superfície interna e contatam diretamente a matriz mitocondrial, o local das enzimas do ciclo do ácido cítrico e da beta-oxidação (Nelson e Cox, 2008; Kang e Pervaiz, 2012).

Por meio dos complexos proteicos a mitocôndria exerce sua função de acoplar o fluxo de elétrons e o gradiente de prótons. Os transportadores de elétrons, por meio dos complexos I (NADH-desidrogenase), II (Succinato-desidrogenase), III (complexo citocromo *bc*) e IV (citocromo *c* oxidase), transferem os elétrons através de cofatores reduzidos, como NADH e FADH₂, derivados das reações metabólicas do ciclo de Krebs e da β -oxidação de ácidos graxos (Jezek e Hlavata, 2005; Ferreira *et al.*, 2016). O bombeamento de prótons, entretanto é realizado por meio dos complexos I, III e IV mitocondriais, que realizam a extrusão dos prótons para o espaço intermembranar. Esse mecanismo altera o potencial de membrana mitocondrial e favorece a geração de uma força próton-motriz, havendo o retorno dos mesmos pelo complexo V (ATP-sintetase) para síntese de ATP (Skulachev, 1980; Nelson e Cox, 2008).

Durante a redução monoelétrica do oxigênio à água, na cadeia transportadora de elétrons, há a formação de EROs, iniciado com o ânion superóxido (O₂^{•-}) e derivados de sua metabolização por enzimas antioxidantes, como o H₂O₂ e o radical hidroxil (OH⁻) (Sies, 1991; Adam-Vizi e Chinopoulos, 2006). Considerando a formação em termos fisiológicos, estima-se que 2-5% do oxigênio consumido da cadeia respiratória seja convertido em EROs, desempenhando papel fundamental em processos de regulação redox e vias de sinalização intracelular envolvidas na proteção celular, por exemplo. Entretanto, sua produção em excesso causa um desequilíbrio oxidativo favorecendo o acúmulo dessas moléculas em detrimento da reduzida capacidade antioxidante que não acompanha essa superprodução. Esse estado pró-oxidante é denominado de estresse oxidativo e é capaz de danificar biomoléculas como lipídeos de membrana, proteínas e até o DNA (Gutteridge, 1993).

Inúmeras pesquisas têm associado o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial a processos fisiopatológicos variados como obesidade, diabetes, doenças neurodegenerativas e hipertensão (Akbar *et al.*, 2016; Rubattu *et al.*, 2016; Gonzalez-Franquesa e Patti, 2017; Udhayabanu *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017). Os cardiomiócitos em especial, consomem uma grande quantidade de oxigênio por possuírem um elevado número de mitocôndrias, em comparação a outros tecidos. Sendo assim, a quantidade de produção de EROs torna-se proporcionalmente elevada bem como a vulnerabilidade desse tecido à lesões decorrentes da disfunção mitocondrial, suscetibilizando-o ao desenvolvimento de

doenças cardiovasculares (Handy e Loscalzo, 2012; Nascimento *et al.*, 2014; Zorov *et al.*, 2014).

De maneira a combater o estresse oxidativo, a defesa antioxidante torna-se atuante através da ação de enzimas importantes nesse processo, como a superóxido dismutase-SOD em suas formas mitocondriais dependentes de manganês (Mn-SOD) ou de cobre e zinco (Cu, Zn-SOD), que participam da redução de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , e a catalase, que converte o H_2O_2 a água (H_2O). A família das glutations também são importantes na defesa antioxidante, sendo a Glutathione-S-transferase (Bergstrom *et al.*) a enzima responsável pela detoxificação metabólica contra xenobióticos e regulação do estresse oxidativo, e a Glutathione peroxidase (GPx) neutralizante de H_2O_2 . Para tal, a GPx utiliza a redução concomitante de glutathione reduzida (GSH); um tiol não proteico celular mais abundante que participa da defesa antioxidante não-enzimática e favorece a regeneração de enzimas antioxidantes, doando grupos tióis (-SH) e formando glutathione oxidada (GSSG) (Meister e Anderson, 1983; Halliwell e Aruoma, 1991; Ferreira e Lagranha, 2013; Ferreira *et al.*, 2016).

Outra importante atuação da mitocôndria diz respeito a homeostase de cálcio, controlada por sistemas de transporte membranar que movem esse cátion entre os ambientes extracelulares. O transporte de Ca^{2+} mitocondrial ocorre por mediação de um canal uniporte, que direciona-o para a matriz mitocondrial conduzido pelo potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Entre as principais ações mediadas pelo Ca^{2+} encontram-se a estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio, do controle da taxa de fosforilação oxidativa, de processos de excitação, da atividade de ciclos celulares e metabólicos (como o ciclo de Krebs), controle da morte celular por apoptose e abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) (McCormack e Denton, 1993; Foskett e Madesh, 2014; Santo-Domingo *et al.*, 2015).

Favorecida pelo desbalanço oxidativo, com a produção de EROs mitocondriais, e o fluxo elevado de Ca^{2+} mitocondrial, a abertura do PTPM dissipa o gradiente eletroquímico prejudicando a produção de ATP através da fosforilação oxidativa, afetando o suprimento de energia celular (Vercesi *et al.*, 1988; Gunter *et al.*, 2004). Assim, há um rápido desdobramento da membrana mitocondrial interna conhecido como inchamento mitocondrial; que por sua vez pode romper a membrana mitocondrial externa e provocar extravasamento do conteúdo da matriz mitocondrial para o citosol, como proteínas pró-apoptóticas (citocromo *c* e Smac/DIABLO). Como consequência, a ativação de caspases e subsequente morte celular são fatores característicos presentes em processos

fisiopatológicos, que podem induzir doenças crônico-degenerativas (Kowaltowski *et al.*, 2001; Quintanilla *et al.*, 2013).

2.6 Mitocôndria e serotonina: interação no tecido cardíaco

Todo e qualquer processo que ameace a disponibilidade de energia celular pode estar associado com disfunções mitocondriais, tendo em vista que o suprimento de aproximadamente 95% do ATP utilizado pelas células de vertebrados são provenientes dessa organela (Gunter *et al.*, 2004). Sendo o coração um órgão altamente dependente de energia e com vasta presença de mitocôndrias em seus cardiomiócitos, a produção de ATP para garantir um desempenho cardíaco eficaz também precisa ser mantida (Ong e Hausenloy, 2010; Ventura-Clapier *et al.*, 2011). Como a homeostase mitocondrial contribui para a preservação de funções celulares e teciduais, sua proteção contra distúrbios pode certamente reduzir a incidência de patologias associadas à disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, incluindo as cardiovasculares.

Nesse sentido, evidências crescentes têm reportado o envolvimento da serotonina na proteção cardiovascular atribuído à redução da disfunção mitocondrial. Nebigil *et al.*, demonstraram pela primeira vez o papel protetor da serotonina em cardiomiócitos isolados de camundongos neonatos, onde a estimulação aguda com 5-HT protegeu a permeabilidade mitocondrial através da inibição da redistribuição de citocromo *c* e de caspases-3 e 9 (Nebigil, Etienne, *et al.*, 2003). Muto *et al.*, demonstrou de maneira similar a prevenção da apoptose (via diminuição da atividade da caspase-3) e inibição da abertura do PTPM (via supressão do aumento de Ca^{2+} mitocondrial) em corações que sofreram a injúria de isquemia e reperfusão, mas que foram pré-tratados com 5-HT (Muto *et al.*, 2014).

Outros estudos discutem ainda o papel da 5-HT, mediada por seus receptores, em outros processos mitocondriais no sistema cardiovascular, como uma maior fosforilação oxidativa, via atividade do receptor 5-HT_{2B}, pelo aumento na atividade de enzimas como citocromo *c* oxidase e succinato desidrogenase, segundo Nebigil *et al.*, (Nebigil, Jaffre, *et al.*, 2003); aumento da biogênese mitocondrial, demonstrado por Garret *et al.*, na utilização de agonistas de receptor 5-HT_{1F} (Garrett *et al.*, 2014); e aumento do controle respiratório mitocondrial, manutenção da homeostase do cálcio e maior produção de ATP, sugerido por Wang *et al.*, e atribuídos à ativação de receptores 5-HT₃ (Wang *et*

al., 2016). Por outro lado, Genet et al., demonstrou recentemente que a ativação de receptores 5-HT₂ em artérias intrapulmonares induziu formação de O₂[•], aumento de Ca²⁺ intracelular e diminuição da respiração mitocondrial, favorecendo o aparecimento de hipertensão pulmonar (Genet *et al.*, 2017).

Em publicações prévias, a associação entre ativação de MAO e produção de EROs com comprometimento da função cardiovascular é reforçada, por exemplo, por Poon et al., que descreveram uma maior formação de H₂O₂ decorrente da metabolização de 5-HT pela MAO-A na artéria basilar de miócitos, levando a uma maior tensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos comparado ao grupo que apresentou menor atividade da MAO-A (Poon *et al.*, 2010). Villeneuve et al., evidenciaram uma diminuição da função mitocondrial, com indução de necrose e insuficiência ventricular em cardiomiócitos neonatais decorrentes da superexpressão de MAO-A (Villeneuve *et al.*, 2013). De maneira similar, Santin et al., atribuíram um prejuízo mitocondrial à maior ativação de MAO-A e consequente produção de H₂O₂ em cardiomiócitos de camundongos, que foi associada positivamente com morte dos cardiomiócitos e insuficiência cardíaca (Santin *et al.*, 2016).

Ao analisar a literatura referente a relação entre serotonina, mitocôndria e período crítico de desenvolvimento, é nítida a escassez de produções científicas acerca dos efeitos cardiovasculares. As poucas existentes, ainda apresentam divergências e associam a manipulação serotoninérgica em modelos experimentais, a alterações na cadeia respiratória ou no metabolismo energético mitocondrial no cérebro (Curti *et al.*, 1999; Hroudova e Fisar, 2012) e fígado (Souza *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2012) por exemplo. De maneira interessante, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram efeitos positivos da manipulação serotoninérgica neonatal com fluoxetina (desenho experimental adotado no presente estudo) em relação a bioenergética mitocondrial e metabolismo oxidativo. Da Silva *et al.*, 2014 demonstrou um aumento na atividade das enzimas antioxidantes catalase e GST no hipocampo de ratos aos 60 dias tratados com fluoxetina durante a lactação (Da Silva *et al.*, 2014). Seguindo o mesmo desenho experimental, também encontramos um aumento na capacidade respiratória mitocondrial associada à menor produção de EROs no hipotálamo e músculo esquelético de ratos machos aos 60 dias de vida, e aumento na atividade da GST apenas no hipotálamo (Da Silva, Braz, Pedroza, *et al.*, 2015). As análises realizadas em mitocôndrias do tecido adiposo marrom demonstraram ainda um maior consumo de oxigênio após a adição de GDP, um inibidor de proteína desacopladora mitocondrial-UCP, menor produção de EROs e um aumento na

expressão proteica da UCP1 (Da Silva *et al.*, 2014; Da Silva, Braz, Pedroza, *et al.*, 2015; Da Silva, Braz, Silva-Filho, *et al.*, 2015).

Diante das evidências, fica claro que a 5-HT possui relevantes efeitos em diversos tecidos e que o organismo imaturo pode ser exposto aos efeitos dos ISRS não apenas enquanto feto como também na idade neonatal, fortalecendo a justificativa de estudos sobre os efeitos dessa manipulação durante períodos críticos para o desenvolvimento de órgãos e sistemas, como gestação e lactação, e especialmente sobre a função cardíaca onde a compreensão dos efeitos da manipulação serotoninérgica neonatal ainda precisa ser mais explorada. Sabendo que as poucas evidências existentes acerca dos efeitos cardíacos mediados pela exposição à fluoxetina neonatal ainda não estão bem elucidadas e baseadas na literatura, nosso trabalho foi conduzido mediante a hipótese de que a inibição crônica de recaptação de serotonina durante o período crítico de desenvolvimento (i.e. durante o período de lactação) poderia induzir disfunção mitocondrial e estresse oxidativo cardíacos na vida adulta, com maior comprometimento em machos do que em fêmeas.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Avaliar os efeitos da inibição crônica de recaptação de serotonina induzida por fluoxetina durante o período de lactação sobre a bioenergética mitocondrial e balanço oxidativo no coração de ratos machos e fêmeas aos 60 dias de vida.

3.2 *Objetivos específicos*

Avaliar o peso corporal durante o período de manipulação do sistema serotoninérgico (1° ao 21° dia de vida), bem como aos 30, 45 e 60 dias de vida;

Avaliar nas mitocôndrias do tecido cardíaco de ratos machos e fêmeas do grupo controle e fluoxetina:

- O consumo de oxigênio mitocondrial;
- A produção de espécies reativas mitocondriais;
- O potencial elétrico de membrana mitocondrial.

Avaliar no tecido cardíaco de ratos machos e fêmeas do grupo controle e fluoxetina:

- Os biomarcadores de estresse oxidativo (MDA e Carbonilas);
- A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST);
- A atividade da enzima do Ciclo de Krebs (Citrato Sintase);
- Os níveis de Glutathiona reduzida (GSH).

4 RESULTADOS – ARTIGOS ORIGINAIS PUBLICADOS

- *Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidant defense in rat heart*
BRAZ, GRF, FREITAS, CMF; NASCIMENTO, L; PEDROZA, AA; DA SILVA, AI; LAGRANHA, C.

- *Serotonin modulation in neonatal age does not impair cardiovascular physiology in adult female rats: Hemodynamics and oxidative stress analysis*
BRAZ, GRF; PEDROZA, AA; NOGUEIRA, VO; BARROS, MAV; FREITAS, CM; BRITO-ALVES, JL; DA SILVA, AI; COSTA-SILVA, JH; LAGRANHA, CJ.

Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidant defense in rat heart

Glauber Ruda F. Braz, Cristiane M. Freitas, Luciana Nascimento, Anderson A. Pedroza, Aline Isabel da Silva, and Claudia Lagranha

Abstract: Protein restriction during prenatal, postnatal, or in both periods has a close relationship with subsequent development of cardiovascular disease in adulthood. Elevated brain levels of serotonin and its metabolites have been found in malnourished states. The aim in the present study was to investigate whether treatment with fluoxetine (Fx), a selective serotonin reuptake inhibitor, mimics the detrimental effect of low-protein diet during the perinatal period on the male rat heart. Our hypothesis is that increased circulating serotonin as a result of pharmacologic treatment with Fx leads to cardiac dysfunction similar to that observed in protein-restricted rats. Male Wistar rat pups received daily subcutaneous injection of Fx or vehicle from postnatal day 1 to postnatal day 21. Male rats were euthanized at 60 days of age and the following parameters were evaluated in the cardiac tissue: mitochondrial respiratory capacity, respiratory control ratio, reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial membrane potential, and biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. We found that Fx treatment increased mitochondrial respiratory capacity (123%) and membrane potential (212%) and decreased ROS production (55%). In addition we observed an increase in the antioxidant capacity (elevation in catalase activity (5-fold) and glutathione peroxidase (4.6-fold)). Taken together, our results suggest that Fx treatment in the developmental period positively affects the mitochondrial bioenergetics and antioxidant defense in the cardiac tissue.

Key words: heart, mitochondria, serotonin, antioxidant defense.

Résumé : La restriction calorique au cours de la période pré et/ou postnatale est associée étroitement au développement subséquent d'une maladie cardiovasculaire à l'âge adulte. Des études rapportent un taux cérébral élevé de sérotonine et de ses métabolites dans des conditions de malnutrition. Cette étude a pour objectif de vérifier si un traitement à la fluoxétine (« Fx »), un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, reproduit dans le cœur les effets nocifs d'un régime pauvre en protéines durant la période périnatale chez le rat mâle. Selon notre hypothèse, l'augmentation de la concentration sanguine de la sérotonine causée par le traitement à la Fx entraîne une dysfonction cardiaque semblable à celle observée chez le rat restreint en matière de protéines. Du jour 1 au jour 21 suivant leur naissance, on administre chaque jour à des rats mâles Wistar une injection sous-cutanée de Fx ou le véhicule. On sacrifie les rats au 60^e jour et on évalue les variables suivantes du tissu cardiaque : capacité respiratoire des mitochondries, ratio du contrôle respiratoire, production des dérivés réactif de l'oxygène (« ROS »), potentiel de membrane de la mitochondrie, biomarqueurs du stress oxydatif et de la défense antioxydante. Nos observations révèlent que le traitement au Fx augmente la capacité respiratoire des mitochondries (123 %), le potentiel de membrane (212 %) et diminue la production des ROS (55 %). De plus, on observe une augmentation de la capacité antioxydante (augmentation de 5 fois l'activité de la catalase et de 4,6 fois l'activité de la glutathion peroxydase). Globalement, d'après nos résultats, le traitement à la Fx durant la période de développement modifie positivement la bioénergétique de la mitochondrie et la défense antioxydante du tissu cardiaque. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : cœur, mitochondrie, sérotonine, défense antioxydante.

Introduction

A large number of experimental studies have demonstrated that low-protein diet during prenatal (Langley-Evans 2000; Pladys et al. 2004; Torrens et al. 2006), postnatal (Penitente et al. 2007; Costa-Silva et al. 2009; Oliveira-Sales et al. 2010), or in both periods (de Brito Alves et al. 2014, 2015; Barros et al. 2015) bears a close relationship with the

subsequent development of cardiovascular disease in adulthood. Despite the studies demonstrating that low-protein diet during the lactation period induces cardiac dysfunction or hypertension in adulthood, the molecular mechanisms underlying this process in central and peripheral tissues are yet unclear.

Elevated brain levels of serotonin and its metabolites have been found in malnourished states (Sobotka et al. 1974; Resnick et al.

Received 18 September 2015. Accepted 17 November 2015.

G.R.F. Braz, C.M. Freitas, and L. Nascimento. Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, Centro Acadêmico de Vitória (CAV)-Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil; Biochemistry and Physiology Graduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

A.A. Pedroza. Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry; CAV-Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil.

A.I. da Silva. Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry; CAV-Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil; Neuropsychiatry and Behavior Science Graduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

C. Lagranha.* Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry; CAV-Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil; Biochemistry and Physiology Graduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; Neuropsychiatry and Behavior Science Graduate Program, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

Corresponding author: Claudia J. Lagranha (email: lagranha@hotmail.com).

*Present address: Rua Alto do Reservatório, s/n CEP: 55608-680, Núcleo de Educação Física e, Ciências do Esporte, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

1979; Hernandez et al. 1989; Manjarrez et al. 2003; Choi et al. 2011). Serotonin or 5-hydroxytryptamine (5-HT) was discovered in the mid 1950s as a neurotransmitter in mammalian brain (Brodie and Shore 1957). Only 2% of 5-HT is produced in the central nervous system, mainly in the raphe nucleus, located in brainstem (Halliday et al. 1995). Despite the low content in the brain, serotonin is associated with a variety of functions in the control of energy and behavior. In addition, several studies suggest that 5-HT is also important in the cardiovascular system, controlling various functions, including modulation of vascular tone and tissue-specific function by interaction with a specific 5-HT receptor (Rapport et al. 1948; Ersparmer and Asero 1952; Watts 2005; Hildreth et al. 2008).

Fluoxetine (Fx) is a member of the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) class that according to some authors, acts by increasing levels of extracellular serotonin in the brain's serotonergic system areas (Krishnan and Nestler 2008). It has been shown that exposure to certain classes of antidepressant drugs induces excessive reactive oxygen species (ROS) production and alters the antioxidant defense (Novio et al. 2011; Moretti et al. 2012; De Long et al. 2014). Increased ROS levels may be one of the mechanisms triggering some cardiac diseases, such as left ventricular hypertrophy, heart failure, and ischemia-reperfusion injury (Kohr et al. 2011; Munzel et al. 2015; Zheng and Lu 2015).

During the normal process of ATP synthesis in the mitochondria, a small percentage of electrons can leak from the electron transport chain and directly react with oxygen, producing short-lived ROS, such as the superoxide anion (O_2^-) (Fridovich 1995). This superoxide anion can be converted to nonradical species, hydrogen peroxide (H_2O_2), mainly by superoxide dismutase (SOD) (Weisiger and Fridovich 1973; Turrens 2003). H_2O_2 is membrane permeable and can be converted into oxygen and water by the antioxidant enzymes, catalase (CAT), and glutathione peroxidase. Although ROS in small concentrations can act as an intracellular signaling molecule (Halliwell and Gutteridge 2007), an excess of ROS can induce damage in important cellular components, such as lipids and proteins, causing oxidative stress (Sies 1991).

It has been shown that in undernourished rats, elevated serotonin levels in the brain may lead to cardiac dysfunction. A study from our group using the protein restriction as experimental model during the gestation and lactation periods demonstrated that perinatal low-protein diet induces mitochondrial dysfunction associated with significantly elevated levels of oxidative stress in the heart (Nascimento et al. 2014). We have recently demonstrated that low-protein diet not only affects the heart, but also induces oxidative stress combined with a marked decrease in the antioxidant defense in brainstem of male rats at 100 days of age (Ferreira et al. 2015).

Based on previous data, the aim of the present study was investigate whether the elevation of brain's serotonin induced by pharmacological treatment of male rats with Fx, an SSRI, mimics the effect of the low-protein diet fed during the perinatal period on mitochondrial function and oxidative balance in the heart. Our hypothesis is that modulation of serotonin during critical periods for development may be associated with impairment the cardiac mitochondrial capacity and induce oxidative stress. To perform this study, we treated rat pups from postnatal day 1 to postnatal day 21 (i.e., during the lactation period) with Fx or vehicle (control; Ct), and we evaluated mitochondrial oxygen consumption, respiratory control ratio, ROS production, mitochondrial membrane potential, citrate synthase, oxidative stress biomarkers, and antioxidant defense in the cardiac tissue when rats reached 60 days of age.

Material and methods

Animals

Wistar rats were maintained at a room temperature of $23 \pm 1^\circ C$, on a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 0700 h), with ad libitum access to water and food. The animals were assigned randomly to 2 groups with 8 pups per litter, 24 h after birth as previously published (da Silva et al. 2014, 2015a, 2015b). All procedures were performed with the approval of the Animal Care Committee of the Universidade Federal de Pernambuco (no. 23076.026644/2010-20) in accordance with the recommendations of the National Institutes of Health's *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.

Pharmacological treatment and experimental design

Fx was dissolved in sterile saline (1 mg/mL). The treated and control groups received daily a single dose of subcutaneous injection with Fx (treated (Fx) group: 10 mg/kg, dissolved in sterile saline solution) or sterile saline (control (Ct) group: NaCl 0.9%, 10 mL/kg). Treatments were applied from the postnatal day 1 to postnatal day 21 (i.e., suckling period), as previously described (da Silva et al. 2014, 2015a, 2015b).

Mitochondria isolation and mitochondrial oxygen consumption analyses

Freshly isolated mitochondria were prepared from the homogenized hearts by differential centrifugation as previously described (Lagranha et al. 2010; Nascimento et al. 2014). Aliquots of mitochondria were analyzed for the total protein content using the Bradford protocol. The mitochondrial respiration was measured at $28^\circ C$ in a chamber connected to a Clark-type oxygen electrode (Hansatech Instruments, Pentney King's Lynn, UK) and in the respiration buffer comprising 120 mmol/L KCl, 4 mmol/L HEPES, 5 mmol/L K_2HPO_4 , and 0.2% bovine serum albumin (BSA) (w/v), pH 7.4, with 0.5 mg protein of mitochondria and complex I (10 mmol-L⁻¹ glutamate/2 mmol-L⁻¹ malate) as substrate. The mitochondria were kept on ice during the assay (Nascimento et al. 2014).

Measurement of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

After mitochondria isolation, samples were immediately diluted and then held in the isolation buffer at $4^\circ C$ until use. For the safranin O uptake measurements, the cardiac mitochondria were incubated at a final concentration of 0.10 mg/mL in a buffer containing 120 mmol/L KCl, 4 mmol/L HEPES, 5 mmol/L K_2HPO_4 , 0.2% BSA, 5 μ mol/L safranin O, pH 7.4, and complex I substrate (Feldkamp et al. 2007; Park et al. 2011). Fluorescence was measured once every 30 s at 485-nm excitation and 586-nm emission using fluorimeters (FLUOStar, Omega, USA), temperature controlled ($28^\circ C$), with continued shaking to follow safranin O uptake by the mitochondria. Fluorescence values for the safranin uptake were normalized to the value at the start of uptake when safranin O was entirely in the medium in control, which was set at 100%. Uptake of safranin O into the matrix of energized mitochondria results in quenching of its fluorescence, so the measured signal decreases.

ROS production measurement

Briefly, the production of ROS was monitored using a fluorescent probe 5- (and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA). Freshly isolated mitochondria (0.1 mg mitochondrial protein) were incubated in a respiratory buffer with 1 μ M DCFDA, 10 mmol/L glutamate, and 2 mmol/L malate. The DCFDA fluorescence was monitored at 485 nm and 525 nm via fluorescence spectrophotometry (FLUOStar) (da Silva et al. 2015a, 2015b).

Tissue homogenate preparation

The hearts were quickly harvested and immediately homogenized in 50 mmol/L TRIS and 1 mmol/L EDTA (pH 7.4), with the addition of 1 mmol/L sodium orthovanadate and 200 μ g/mL phenylmethanesulfonyl fluoride. Homogenates were centrifuged at

Fig. 1. Effect of neonatal selective serotonin reuptake inhibitor exposure during nursing phase on mitochondrial bioenergetics in male rats heart at 60 days of life. The pups received daily fluoxetine (fluoxetine = 10 mg/kg body weight, sc, $N = 6$) or vehicle (0.9% NaCl, Control = 10 mL/kg body weight, 1 subcutaneous, $N = 6$) from postnatal day 1 to postnatal day 21. Data are presented as means \pm SE. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (A) Mitochondrial respiration and respiratory control ratio (RCR); (B) reactive oxygen species (ROS) production; (C) mitochondrial membrane potential; (D) citrate synthase activity.

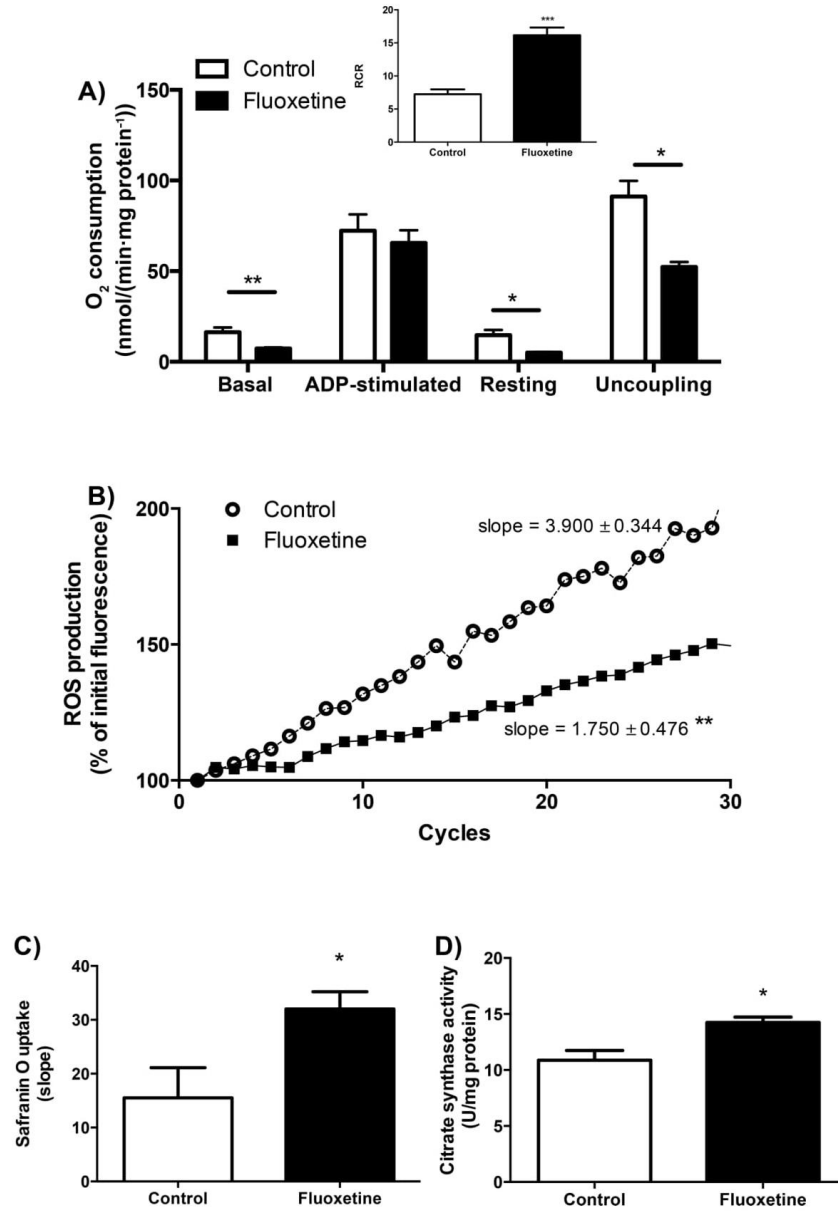
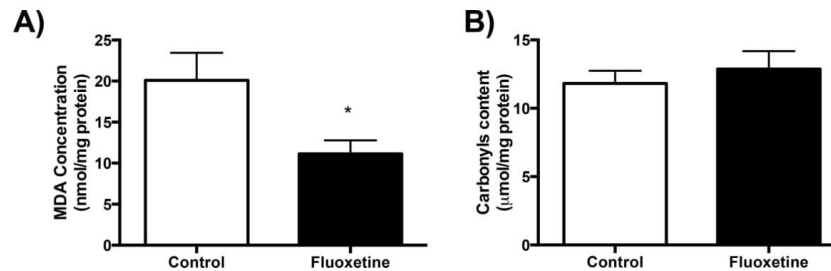


Fig. 2. Effect of neonatal selective serotonin reuptake inhibitor exposure during nursing phase on oxidative stress biomarker in heart of male rats at 60 days of life. The pups received daily fluoxetine (fluoxetine = 10 mg/kg body weight, sc, N = 6) or vehicle (0.9% NaCl, control = 10 mL/kg body weight, subcutaneous, N = 6) from postnatal day 1 to postnatal day 21. Data are presented as means \pm SE. *, $p < 0.05$. (A) Malondialdehyde production (MDA) concentration; (B) Carbonyls content.



4000 r/min (1180g) for 10 min at 4 °C. Protein concentration was determined in the supernatant using the Bradford protocol and supernatant was used for the subsequent biochemical analyses.

Citrate synthase (CS) activity

CS is the first enzyme in the Krebs cycle and catalyzes the condensation of acetyl-CoA with oxaloacetate to form citrate (Wiegand and Remington 1986). Enzymatic activity was determined as described previously (Le Page et al. 2009). Briefly, the citrate synthase activity was in a reaction mixture containing (in mmol/L) 100 Tris-HCl (pH 8.2), 1 MgCl₂, 1 EDTA, 0.2 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) ($\epsilon = 13.6 \mu\text{mol}/(\text{mL}\cdot\text{cm}^{-1})$), 3 acetyl-CoA, 5 oxaloacetate and 0.3 mg/mL homogenate. The citrate synthase activity was measured by assessing the rate of change in absorbance at 412 nm over 3 min (30-s intervals) (da Silva et al. 2015b).

Evaluation of malondialdehyde production

A total of 0.2 mg/mL heart homogenate was used to measure the malondialdehyde production (MDA) following the reaction with thiobarbituric acid at 100 °C according to the method of Draper (Draper et al. 1993). The results are expressed as nmol/mg protein.

Protein carbonyl content

The access of protein oxidation was performed according to Levine (Levine et al. 1990; Reznick and Packer 1994). The heart homogenate was added to and incubated, at room temperature, with 10 mmol/L dinitro phenyl hydrazine (DNPH) in 2.5 mol/L HCl for 60 min. Then the samples were washed (ethanol/ethyl acetate), precipitated, redissolved in 6 mol/L guanidine, and the insoluble material removed by centrifugation. Thereafter, the supernatant was read at 370 nm and the protein carbonyl content expressed as $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein, based in the DNPH extinction coefficient.

SOD activity

SOD is an enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide anion into another species, H₂O₂ (Halliwell and Gutteridge 2007). The determination of total SOD enzyme activity was performed according to the method of Misra and Fridovich (1972). Samples (0.3 mg/mL homogenate) were incubated in a sodium carbonate buffer (0.05%, pH 10.2, 0.1 mmol/L EDTA) in a water bath at 37 °C. The reaction was started by the addition of 30 mmol/L epinephrine dissolved in 0.05% acetic acid. Absorbance at 480 nm was determined after 4 min. SOD activity was expressed as U/mg protein.

CAT activity

CAT catalyzes the decomposition of H₂O₂ into water and oxygen. CAT activity was measured according to a method described by Aebi (1984). Briefly, 0.3 mol/L H₂O₂ was added to a mixture containing 0.3 mg/mL of homogenate and 50 mmol/L phosphate buffer (pH 7.0). The decrease in H₂O₂ was followed by measuring 240 nm absorbance

for 3 min, and the CAT activity was expressed as U/mg protein (Aebi 1984).

Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was performed as previously published by Paglia and Valentine (1967). Briefly, 150 μg protein was added to 50 mmol/L phosphate buffer (pH 7.0) containing 5 mmol/L EDTA, 0.28 mmol/L NADPH, 3.75 mmol/L sodium azide, 5 mmol/L glutathione (GSH), and 16 U glutathione reductase. The reaction was initiated with 2.2 mmol/L H₂O₂, and the activity was followed at 340 nm absorbance for 4 min. GPx activity was expressed as U/mg protein.

Reduced GSH content

The measurement of GSH content was carried out as previously published (Nascimento et al. 2014). The samples were sequentially diluted in phosphate buffer (pH 8.0) and then incubated with o-phthalaldehyde at room temperature for 15 min. The fluorescence intensity was measured at 420 nm and excitation at 350 nm and compared with a standard curve range from (0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$) to (6.48 $\mu\text{mol}/\text{L}$).

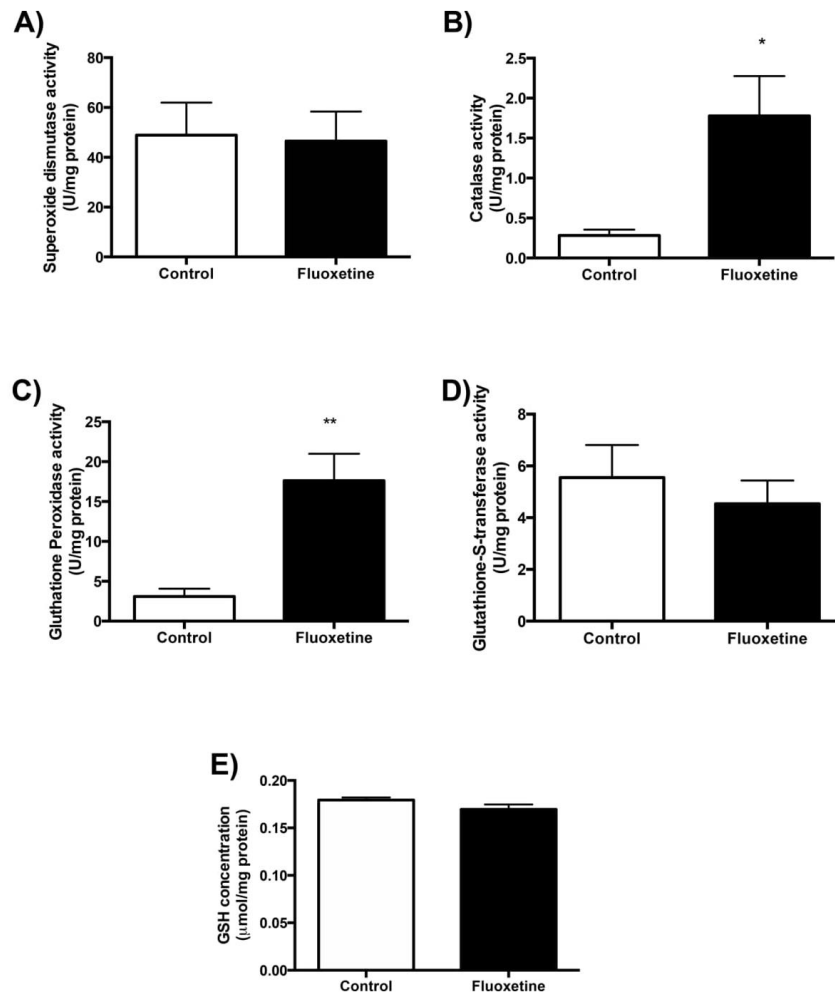
Statistical analysis

All results are expressed as means \pm SE. Student's t test was used to assess the significant differences between groups. Data were considered as statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results

We observed that Fx increased the coupling state in cardiac mitochondria under many conditions: basal (Ct: 16.4 \pm 2.5; Fx: 7.4 \pm 0.6 nmol O₂/(min-mg protein⁻¹); $p < 0.01$; N = 6), resting (Ct: 14.7 \pm 2.9; Fx: 5.1 \pm 0.4 nmol O₂/(min-mg protein⁻¹); $p < 0.05$; N = 6), and after uncoupling agent (Ct: 91.2 \pm 8.7; Fx: 52.3 \pm 2.8 nmol O₂/(min-mg protein⁻¹); $p < 0.01$; N = 6). In the ADP-stimulated phosphorylation condition, Fx did not induce a significant difference (Ct: 72.3 \pm 9.8; Fx: 71.1 \pm 5.3 nmol O₂/(min-mg protein⁻¹); N = 6). However, there was an increase in the respiratory control ratio by 123% (Ct: 7.3 \pm 0.7; Fx: 16.2 \pm 1.2; $p < 0.0001$; N = 6) (Fig. 1A and insert). In addition, we observed that mitochondrial ROS production was significantly decreased in the Fx group (Ct: 3.9 \pm 0.4; Fx: 1.8 \pm 0.5; $p < 0.01$; N = 6) (Fig. 1C). Fx improved the $\Delta\psi_m$ (Ct: 15.5 \pm 5.6; Fx: 32.0 \pm 3.2; $p < 0.05$; N = 6), which was associated with a decrease in ROS production and an increase in respiratory capacity. In addition to the evaluation of mitochondrial respiration, we assess citrate synthase activity (i.e., first enzyme in the Krebs cycle), since this enzymatic activity is commonly used as a marker for mitochondrial oxidative capacity in a number of tissues. Our data showed that citrate synthase activity measured at 60 days was significantly increased in animals that had received Fx (Ct:

Fig. 3. Effect of neonatal selective serotonin reuptake inhibitor exposure during nursing phase on antioxidant defense on heart of male rats at 60 days of life. The pups received daily fluoxetine (fluoxetine = 10 mg/kg body weight, sc, $N = 6$) or vehicle (0.9% NaCl, C = 10 mL/kg body weight, subcutaneous, $N = 6$) from postnatal day 1 to postnatal day 21. (A) Superoxide dismutase activity; (B) catalase activity; (C) glutathione peroxidase activity; (D) glutathione-S-transferase activity; (E) reduced glutathione (GSH) concentration. Data are presented as means \pm SE. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.



10.88 \pm 0.85 U/mg protein; Fx: 14.3 \pm 0.48 U/mg protein; $p < 0.05$; $N = 6$; Fig. 1D).

Related to oxidative stress evaluation, we observe that MDA formation decreased (Ct: 20.1 \pm 3.4; Fx: 11.1 \pm 1.7 nmol/mg protein; $p < 0.05$; $N = 6$) in association with the mitochondrial function capacity (Fig. 2A), with no difference in the content of carbonyls (Ct: 11.8 \pm 0.9; Fx: 12.9 \pm 1.3 μ mol/mg protein; $N = 6$; Fig. 2B). In accordance with decreased oxidative stress biomarkers in the Fx group, a significant increase in CAT and GPx enzyme activities (CAT Ct: 0.3 \pm 0.07; Fx: 1.8 \pm 0.5 U/mg protein, $p < 0.05$; and GPx Ct: 3.1 \pm 1.0; Fx: 17.6 \pm 3.4 U/mg protein, $p < 0.01$; $N = 6$; Fig. 3B–3C) was observed, with no changes in SOD and glutathione-S-transferase

(GST) activity, and GSH levels (SOD Ct: 48.8 \pm 13.1; Fx: 46.5 \pm 11.9 U/mg protein; $N = 6$; GST Ct: 5.6 \pm 1.3; Fx: 4.5 \pm 0.9 U/mg protein; $N = 6$; and GSH Ct: 0.18 \pm 0.003; Fx: 0.17 \pm 0.005 μ mol/mg protein; $N = 6$; Fig. 3A, 3D–3E).

Discussion

To our knowledge, there are no data available to date examining the effect of elevated levels of serotonin induced by Fx treatment during the perinatal period with repercussion on the cardiac mitochondrial function in adult animals. In the present study, we investigated the hypothesis that Fx-induced elevated serotonin

levels at an early age impair the cardiac mitochondrial capacity and induce oxidative stress. However, our studies have shown, on the contrary, that treatment with Fx during the lactation period resulted in improvement of the mitochondrial respiratory capacity, respiratory control ratio, citrate synthase activity, and mitochondrial potential, as well as decreases in ROS production, decreases oxidative stress biomarkers, and increases enzymatic antioxidant defense (CAT and GPx activity) in the heart of treated rats when they reached 60 days of age.

Some authors suggest that Fx among other antidepressants has a deleterious effect in mitochondria (Souza et al. 1994; Curti et al. 1999; Novio et al. 2011; Hroudová and Fisar 2012; Moretti et al. 2012; De Long et al. 2014); in contrast, others (Park et al. 2002; Avram et al. 2005; Abdel-Razaq et al. 2011; Moretti et al. 2012; Abdel Salam et al. 2013; Aksu et al. 2014; da Silva et al. 2014, 2015a, 2015b) suggest that Fx act as antioxidant. However, the effect of Fx in mitochondrial function is still a matter of debate. In our case Fx during developmental age improved mitochondrial bioenergetics and antioxidant defense.

The discrepancy between authors may be related to differences in the drug concentration or the developmental stage of the treated animals (fully developed animals vs. neonates). Souza et al. (1994) showed that high doses (160–320 $\mu\text{mol/L}$) of Fx interfere in energy metabolism in rat liver mitochondria. Additionally, Curti et al. (1999), also using high doses (50–250 $\mu\text{mol/L}$), showed that Fx induces inhibition of oxphox capacity and decreases the activity of ATP synthase in rat brain mitochondria. Hroudová and Fisar (2012) demonstrated that Fx inhibited mitochondrial respiration capacity at doses higher than 86 $\mu\text{mol/L}$ with complex I substrate and higher than 266 $\mu\text{mol/L}$ with complex II substrate. In contrast, Agostinho et al. (2011) showed that acute treatment of adult male rats with Fx induced an increase in the corpus striatal activity of citrate synthase, the first enzyme of the Krebs cycle. This corroborates with our present findings and our previous study where we demonstrated that Fx during developmental age improves mitochondrial function and citrate synthase activity in several tissues at 60 days of age (da Silva et al. 2015a, 2015b).

In eukaryotic mitochondria an increase in the production of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and flavin adenine dinucleotide (FADH_2) results in upregulation of mitochondrial respiration and the electrons from reduced substrates (i.e. NADH and FADH_2) pass through the enzymes present in the electron transport chain, coupling the reactions for energy-releasing oxidation to the energy-demanding reaction associated with ATP synthesis and accompanied with the maintenance of the membrane potential (Brand 2000). Dimroth et al. (2000) have shown that the rate of ATP synthesis increases with the increase in mitochondrial membrane potential (Dimroth et al. 2000). Our data showed that early treatment with Fx increased mitochondrial membrane potential. In accordance with our data, Tagashira et al. (2014) demonstrated that administration of fluvoxamine, another type of SSRI drug, in vivo or in cultured cardiomyocytes increased ATP production (Tagashira et al. 2014). In addition, Muto et al. (2014), also using fluvoxamine, demonstrated that this drug inhibited the mitochondrial permeability transition pore opening and increased ATP production after ischemia and after the reperfusion period (Muto et al. 2014).

In addition to promoting ATP synthesis by oxidative phosphorylation, mitochondria is the major site of ROS production through reduction of oxygen to superoxide anion and other ROS, such as H_2O_2 and hydroxyl agents (Boveris and Chance 1973; Brand 2000). Some studies suggest that agents that increase the respiratory rate, such as ADP, are associated with a decrease in ROS production (Boveris and Chance 1973; Brand 2000; Feldkamp et al. 2007; Park et al. 2011). Our results showed that Fx-induced serotonin brain levels decrease ROS production, possibly because of an increase in the respiratory control ratio. This is in agreement with a previous study from Simplicio et al. (2015), where they

evaluated the effect of chronic treatment with Fx on rat aorta, showing that Fx decreased hydrogen peroxide in association with an increase in CAT activity with no alterations in the systemic or vascular levels of malondialdehyde (Simplicio et al. 2015). This also parallels previous data from our laboratory where we observed that Fx treatment during lactation decreases mitochondrial production of ROS in skeletal muscle and hypothalamus (da Silva et al. 2015b). Consistent with the decrease in ROS production, Fx did not induce oxidative stress and also improved antioxidant defense as we observed in different tissues (da Silva et al. 2014, 2015a, 2015b).

In summary, elevated levels of the brain's serotonin by Fx in rat hearts did not induce deleterious effect; on the contrary, it improved mitochondrial capacity and decreased oxidative stress. Consistent with reduced oxidative stress in Fx-treated animals, we found that mitochondria from the experimental group had a number of modifications in functions involved in regulating ROS generation and oxidative metabolism. Taken together, our results suggest that Fx treatment in the developmental period positively affects the mitochondria, improving mitochondrial capacity and decreasing oxidative stress in the cardiac tissue.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are thankful to Dr Sonia Doi for her invaluable collaboration with the discussion. The acquisition of the reagents that were used in this work was supported financially by the Foundation to Support Science and Research from Pernambuco State – Brazil (Fundacao de Amparo a Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) grant APQ-n°1026-4.09/12). We are also grateful to FACEPE, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), which provided scholarships for G.R.F.B., A.A.P., and A.I.S. The English version of this text was revised by Sidney Pratt, M.A.T. (The Johns Hopkins University), RSAdip (TEFL-University of Cambridge).

References

- Abdel Salam, O.M., Mohammed, N.A., Sleem, A.A., and Farrag, A.R. 2013. The effect of antidepressant drugs on thioacetamide-induced oxidative stress. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**: 735–744. PMID:23609356.
- Abdel-Razaq, W., Kendall, D.A., and Bates, T.E. 2011. The effects of antidepressants on mitochondrial function in a model cell system and isolated mitochondria. *Neurochem. Res.* **36**: 327–338. doi:10.1007/s11064-010-0331-z. PMID: 21120605.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**: 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3. PMID:6727660.
- Agostinho, F.R., Réus, G.Z., Stringari, R.B., Ribeiro, K.F., Ferraro, A.K., Benedet, J., et al. 2011. Treatment with olanzapine, fluoxetine and olanzapine/fluoxetine alters citrate synthase activity in rat brain. *Neurosci. Lett.* **487**: 278–281. doi:10.1016/j.neulet.2010.10.037. PMID:20971158.
- Aksu, U., Guner, I., Yaman, O.M., Erman, H., Uzun, D., Sengezer-Inceli, M., et al. 2014. Fluoxetine ameliorates imbalance of redox homeostasis and inflammation in an acute kidney injury model. *J. Physiol. Biochem.* **70**(4): 925–934. doi:10.1007/s13105-014-0361-0. PMID:25270428.
- Avram, A.S., Avram, M.M., and James, W.D. 2005. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J. Am. Acad. Dermatol.* **53**: 671–683. doi:10.1016/j.jaad.2005.05.015.
- Barros, M.A., De Brito Alves, J.L., Nogueira, V.O., Wanderley, A.G., and Costa-Silva, J.H. 2015. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **25**: 123–130. doi:10.1016/j.numecd.2014.07.011. PMID:25287449.
- Boveris, A., and Chance, B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**: 707–716. doi:10.1042/bj1340707.
- Brand, M.D. 2000. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* **35**: 811–820. doi:10.1016/S0531-5565(00)00135-2.
- Brodie, B.B., and Shore, P.A. 1957. A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **66**: 631–642. doi:10.1111/j.1749-6632.1957.tb40753.x. PMID:13425246.
- Choi, S., DiSilvio, B., Fernstrom, M.H., and Fernstrom, J.D. 2011. Effect of chronic protein ingestion on tyrosine and tryptophan levels and catecholamine and

- serotonin synthesis in rat brain. *Nutr. Neurosci.* **14**: 260–267. doi:10.1179/1476830511Y.0000000019. PMID:22053757.
- Costa-Silva, J.H., Silva, P.A., Pedi, N., Luzardo, R., Einicker-Lamas, M., Lara, L.S., et al. 2009. Chronic undernutrition alters renal active Na⁺ transport in young rats: potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood? *Eur. J. Nutr.* **48**: 437–445. doi:10.1007/s00394-009-0032-z. PMID:19434436.
- Curti, C., Mingatto, F.E., Polizello, A.C., Galastri, L.O., Uyemura, S.A., and Santos, A.C. 1999. Fluoxetine interacts with the lipid bilayer of the inner membrane in isolated rat brain mitochondria, inhibiting electron transport and F1F0-ATPase activity. *Mol. Cell Biochem.* **199**: 103–109. doi:10.1023/A:1006912010550. PMID:10544958.
- da Silva, A.I., Galindo, L.C.M., Nascimento, L., Freitas, C.M., Manhaes-de-Castro, R., Lagranha, C.J., and Souza, S.L. 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**: 330–337. doi:10.1139/cjpp-2013-0321. PMID:24708216.
- da Silva, A.I., Braz, G.R., Pedroza, A.A., Nascimento, L., Freitas, C.M., Ferreira, D.J., et al. 2015a. Fluoxetine induces lean phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1 expression. *J. Bioenerg. Biomembr.* **47**(4): 309–318. doi:10.1007/s10863-015-9617-9. PMID:26129910.
- da Silva, A.I., Braz, G.R., Silva-Filho, R., Pedroza, A.A., Ferreira, D.S., Manhaes de Castro, R., and Lagranha, C. 2015b. Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **40**: 565–574. doi:10.1139/apnm-2014-0462. PMID:2592379.
- de Brito Alves, J.L., Nogueira, V.O., de Oliveira, G.B., da Silva, G.S., Wanderley, A.G., Leandro, C.G., and Costa-Silva, J.H. 2014. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *Br. J. Nutr.* **111**: 606–615. doi:10.1017/S0007114513002833. PMID:24059468.
- de Brito Alves, J.L., Nogueira, V.O., Cavalcanti Neto, M.P., Leopoldino, A.M., Curti, C., Colombari, D.S., et al. 2015. Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. *J. Nutr.* **145**: 907–914. doi:10.3945/jn.114.202804. PMID:25934662.
- De Long, N.E., Hyslop, J.R., Raha, S., Hardy, D.B., and Holloway, A.C. 2014. Fluoxetine-induced pancreatic beta cell dysfunction: New insight into the benefits of folic acid in the treatment of depression. *J. Affect. Disord.* **166**: 6–13. doi:10.1016/j.jad.2014.04.063. PMID:25012404.
- Dimroth, P., Kaim, G., and Matthey, U. 2000. Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F₁F₀ ATP synthases. *J. Exp. Biol.* **203**: 51–59. PMID:10600673.
- Draper, H.H., Squires, E.J., Mahmoodi, H., Wu, J., Agarwal, S., and Hadley, M. 1993. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic. Biol. Med.* **15**: 353–363. doi:10.1016/0891-5849(93)90035-S. PMID:8225017.
- Erspamer, V., and Asero, B. 1952. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*, **169**: 800–801. PMID:14941051.
- Feldkamp, T., Kribben, A., Roeser, N.F., Ostrowski, T., and Weinberg, J.M. 2007. Alleviation of fatty acid and hypoxia-reoxygenation-induced proximal tubule deenergization by ADP/ATP carrier inhibition and glutamate. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **292**: F1606–F1616. doi:10.1152/ajprenal.00476.2006. PMID:17244890.
- Ferreira, D.J., Liu, Y., Fernandes, M.P., and Lagranha, C.J. 2015. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. *Nutr. Neurosci.* [Epub ahead of print] doi:10.1179/1476830515Y.0000000030.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 97–112. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000525. PMID:7574505.
- Halliday, G., Baker, K., and Harper, C. 1995. Serotonin and alcohol-related brain damage. *Metab. Brain Dis.* **10**: 25–30. doi:10.1007/BF01991780. PMID:7596326.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, UK.
- Hernandez, J., Manjarrez, G.G., and Chagoya, G. 1989. Newborn humans and rats malnourished in utero: free plasma L-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. *Brain Res.* **488**: 1–13. doi:10.1016/0006-8993(89)90687-2. PMID:2743105.
- Hildreth, C.M., Padden, J.R., Pilowsky, P.M., and Goodchild, A.K. 2008. Impaired serotonergic regulation of heart rate may underlie reduced baroreflex sensitivity in an animal model of depression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **294**: H474–H480. PMID:17993598.
- Hroudova, J., and Fisar, Z. 2012. In vitro inhibition of mitochondrial respiratory rate by antidepressants. *Toxicol. Lett.* **213**: 345–352. doi:10.1016/j.toxlet.2012.07.017. PMID:22842584.
- Kohr, M.J., Sun, J., Aponete, A., Wang, G., Gucek, M., Murphy, E., and Steenbergen, C. 2011. Simultaneous measurement of protein oxidation and S-nitrosylation during preconditioning and ischemia/reperfusion injury with resin-assisted capture. *Circ. Res.* **108**: 418–426. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.232173. PMID:21193739.
- Krishnan, V., and Nestler, E.J. 2008. The molecular neurobiology of depression. *Nature*, **455**: 894–902. doi:10.1038/nature07455. PMID:18923511.
- Lagranha, C.J., Deschamps, A., Aponete, A., Steenbergen, C., and Murphy, E. 2010. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ. Res.* **106**: 1681–1691. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.213645. PMID:20413785.
- Langley-Evans, S.C. 2000. Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **51**: 11–17. doi:10.1080/096374800100859. PMID:10746100.
- Le Page, C., Noirez, P., Courty, J., Riou, B., Swynghedauw, B., and Besse, S. 2009. Exercise training improves functional post-ischemic recovery in senescent heart. *Exp. Gerontol.* **44**: 177–182. doi:10.1016/j.exger.2008.10.003. PMID:18984034.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., et al. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**: 464–478. doi:10.1016/0076-6879(90)86141-H. PMID:1978225.
- Manjarrez, G., Manuel, A.L., Mercado, C.R., and Hernandez, R.J. 2003. Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* **21**: 283–289. doi:10.1016/S0736-5748(03)00034-0. PMID:12850062.
- Misra, H.P., and Fridovich, I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **247**: 3170–3175. PMID:4623845.
- Moretti, M., Colla, A., de Oliveira Balen, G., Dos Santos, D.B., Budni, J., de Freitas, A.E., et al. 2012. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J. Psychiatr. Res.* **46**: 331–340. doi:10.1016/j.jpsychires.2011.11.009. PMID:22154133.
- Munzel, T., Gori, T., Keaney, J.F., Jr., Maack, C., and Daiber, A. 2015. Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *Eur. Heart J.* **36**(38): 2555–2564. doi:10.1093/eurheartj/ehv305. PMID:26142467.
- Muto, T., Usuda, H., Yamamura, A., Yoshida, K., Ohashi, A., Mitsui-Saitoh, K., et al. 2014. Protective effects of fluvoxamine against ischemia/reperfusion injury in isolated, perfused guinea-pig hearts. *Biol. Pharm. Bull.* **37**: 731–739. doi:10.1248/bpb.b13-00552. PMID:24789996.
- Nascimento, L., Freitas, C.M., Silva-Filho, R., Leite, A.C., Silva, A.B., da Silva, A.I., et al. 2014. The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **39**: 880–887. doi:10.1139/apnm-2013-0452. PMID:24905448.
- Novio, S., Nunez, M.J., Amigo, G., and Freire-Garabal, M. 2011. Effects of fluoxetine on the oxidative status of peripheral blood leucocytes of restraint-stressed mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **109**: 365–371. doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00736.x. PMID:21624059.
- Oliveira-Sales, E.B., Colombari, D.S., Davison, R.L., Kasparov, S., Hirata, A.E., Campos, R.R., and Paton, J.F. 2010. Kidney-induced hypertension depends on superoxide signaling in the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension*, **56**: 290–296. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150425. PMID:20606111.
- Paglia, D.E., and Valentine, W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**: 158–169. PMID:6066618.
- Park, J.W., Youn, Y.C., Kwon, O.S., Jang, Y.Y., Han, E.S., and Lee, C.S. 2002. Protective effect of serotonin on 6-hydroxydopamine- and dopamine-induced oxidative damage of brain mitochondria and synaptosomes and PC12 cells. *Neurochem. Int.* **40**: 223–233. doi:10.1016/S0197-0186(01)00072-9. PMID:11741005.
- Park, J.S., Pasupulati, R., Feldkamp, T., Roeser, N.F., and Weinberg, J.M. 2011. Cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition in kidney proximal tubules after hypoxic and ischemic injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **301**: F134–F150. doi:10.1152/ajprenal.00033.2011. PMID:21490135.
- Penitente, A.R., Fernandes, L.G., Cardoso, L.M., Silva, M.E., Pedroza, M.L., Silva, A.L., et al. 2007. Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. *Life Sci.* **81**: 609–614. doi:10.1016/j.lfs.2007.07.006. PMID:17688888.
- Pladys, P., Lahaie, I., Cambonie, G., Thibault, G., Le, N.L., Abran, D., and Nuyt, A.M. 2004. Role of brain and peripheral angiotensin II in hypertension and altered arterial baroreflex programmed during fetal life in rat. *Pediatr. Res.* **55**: 1042–1049. doi:10.1203/01.PDR.000127012.37315.36. PMID:15071169.
- Rapport, M.M., Green, A.A., and Page, I.H. 1948. Serum vasoconstrictor, serotonin: isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* **176**: 1243–1251. PMID:18100415.
- Resnick, O., Miller, M., Forbes, W., Hall, R., Kemper, T., Bronzino, J., and Morgane, P.J. 1979. Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **3**: 233–246. doi:10.1016/0149-7634(79)90011-3. PMID:44355.
- Reznick, A.Z., and Packer, L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* **233**: 357–363. doi:10.1016/S0076-6879(94)33041-7. PMID:8015470.
- Sies, H. 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* **69**: 965–968. doi:10.1007/BF01645140. PMID:1798292.
- Simplicio, J.A., Resstel, L.B., Tirapelli, D.P., D'Orleans-Juste, P., and Tirapelli, C.R. 2015. Contribution of oxidative stress and prostanooids in endothelial dysfunction induced by chronic fluoxetine treatment. *Vascul. Pharmacol.* **73**: 124–137. doi:10.1016/j.vph.2015.06.015. PMID:26141931.
- Sobotka, T.J., Cook, M.P., and Brodie, R.E. 1974. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Res.* **65**: 443–457. doi:10.1016/0006-8993(74)90234-0. PMID:4414787.
- Souza, M.E., Polizello, A.C., Uyemura, S.A., Castro-Silva, O., and Curti, C. 1994.

- Effect of fluoxetine on rat liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **48**: 535–541. doi:10.1016/0006-2952(94)90283-6. PMID:8068040.
- Tagashira, H., Bhuiyan, M.S., Shioda, N., and Fukunaga, K. 2014. Fluvoxamine rescues mitochondrial Ca²⁺ transport and ATP production through σ_1 -receptor in hypertrophic cardiomyocytes. *Life Sci.* **95**: 89–100. doi:10.1016/j.lfs.2013.12.019. PMID:24373833.
- Torrens, C., Brawley, L., Anthony, F.W., Dance, C.S., Dunn, R., Jackson, A.A., et al. 2006. Folate supplementation during pregnancy improves offspring cardiovascular dysfunction induced by protein restriction. *Hypertension*, **47**: 982–987. doi:10.1161/01.HYP.0000215580.43711.d1. PMID:16585422.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **552**: 335–344. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478. PMID:14561818.
- Watts, S.W. 2005. 5-HT in systemic hypertension: foe, friend or fantasy? *Clin. Sci. (Lond.)*, **108**: 399–412. doi:10.1042/CS20040364.
- Weisiger, R.A., and Fridovich, I. 1973. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* **248**: 4793–4796. PMID:4578091.
- Wiegand, G., and Remington, S.J. 1986. Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **15**: 97–117. doi:10.1146/annurev.bb.15.060186.000525. PMID:3013232.
- Zheng, H., and Lu, G.M. 2015. Reduction of prohibitin expression contributes to left ventricular hypertrophy via enhancement of mitochondrial reactive oxygen species formation in spontaneous hypertensive rats. *Free Radic. Res.* **49**: 164–174. doi:10.3109/10715762.2014.991724. PMID:25465279.



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Serotonin modulation in neonatal age does not impair cardiovascular physiology in adult female rats: Hemodynamics and oxidative stress analysis



Glauber Ruda F. Braz^a, Anderson Apolonio Pedroza^a, Viviane O. Nogueira^b,
Monique Assis de Vasconcelos Barros^b, Cristiane de Moura Freitas^a, José Luiz de Brito Alves^b,
Aline Isabel da Silva^{a,c}, João Henrique Costa-Silva^b, Claudia J. Lagranha^{a,b,c,*}

^a Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, CAV-Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

^b Department of Physical Education and Sports Science, CAV-Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

^c Neuropsychiatry and Behavior Science Graduate Program, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 July 2015

Received in revised form 8 December 2015

Accepted 9 December 2015

Available online 11 December 2015

Keywords:

Serotonin modulation
Hemodynamic evaluation
Oxidative stress
Heart
Brainstem

ABSTRACT

Aims: The present study investigates the effects of neonatal serotonin modulation in female rats on cardiac parameters related to hemodynamics and oxidative metabolism in the mature animal.

Main methods: Female Wistar rat pups were administered daily subcutaneous injections of fluoxetine (Fx-treated group) or vehicle solution (Ct-group) from the 1st to 21st day of life. At 60 days of age, animals from both groups were either used for cardiovascular evaluation or sacrificed for tissue collection for biochemical assays.

Key findings: We found that body weight in the Fx-treated group was less than that in the control. When analyzing hemodynamic parameters (i.e., arterial blood pressure, heart rate—HR, sympathetic and vagal tonus, or intrinsic HR), we did not observe significant difference in the Fx-treated group. Evaluating oxidative stress in brainstem and heart by measuring carbonyl content and malondialdehyde—MDA formation, we observe a decrease in carbonyl content only in the Fx-treated group (60.3%, in brainstem; 58.2%, in heart), without difference in the MDA levels. This observation is consonant with an increase in superoxide dismutase—SOD and catalase—CAT activity in brainstem and heart in the Fx-treated group (SOD: 82.7% and CAT: 23.7 in brainstem; SOD: 60.6%, and CAT: 40.7 in heart), with no changes in glutathione S-transferase activity and reduced glutathione levels. With regard to oxidative metabolism markers, citrate synthase activity was higher in brainstem in the Fx-treated group (20%).

Significance: Our data suggest that serotonin modulation by Fx-treatment at an early age does not induce hemodynamic alteration, although it modulates oxidative metabolism in cardiac-related tissues.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) was first discovered in the mid-50s as a neurotransmitter in the mammalian brain [1]. Only 2% of total body 5-HT is produced in the central nervous system (CNS) [2]. Though present in lesser amounts, 5-HT in the CNS is associated with a wide variety of functions, including control of arterial blood pressures [3,4]. Wolf et al. demonstrated that microinjection of 5-HT in the nucleus tractus solitarius (NTS) induced a hypertensive response [5]. In addition, Feldman and Galiano showed that microinjection of 5 nmol of 5-HT induces hypotension and bradycardia, postulating that 5-HT injection evokes vagal cardioinhibition and sympathetic withdrawal [6]. In agreement with these data, Callera et al. showed that unilateral

microinjection of 5-HT in the picomolar range into the NTS of unanesthetized rats resulted in a dose-dependent decrease in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) which was blocked by a previous microinjection of 5-HT_{2A} inhibitor (ketanserin) [7].

In addition to decreasing blood pressure following microinjection, 5-HT has also been shown to have a dual effect on vascular tone, inducing concentration-dependent vasoconstriction. Cohen et al. showed that the ED₅₀ for 5-HT-induced contraction in the aorta and jugular vein was approximately 6.0 and 0.6 μM [8]. Later, Lai et al. also demonstrated an endothelium-independent 5-HT-induced contraction in the coronary artery [9]. Conversely, studies have shown that fluoxetine (Fx; inhibitor of serotonin transporter SERT) treatment for 21 days consecutively in adult rats can induce a mild hypertension due to an alteration in the baroreflex control of HR [10]. In support of this finding, recent studies have shown that exposure to Fx increases reactive oxygen species (ROS) levels and alters the antioxidant defense system in several tissues [11,12]. In agreement with these findings, studies have shown that an

* Corresponding author at: Rua Alto do Reservatório, s/n, CEP: 55608-680, Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.
E-mail address: lagranha@hotmail.com (C.J. Lagranha).

increase in ROS concentration in specific regions of the CNS can result in increased arterial blood pressure [13,14].

As mechanistic control of arterial blood pressure requires the participation of the CNS, which is vulnerable to environmental stimuli during the critical developmental period, it is very likely that the 5-HT system manipulation by Fx treatment during development could induce adaptation in hemodynamic and oxidative metabolism in brainstem and heart. 5-HT system modulation at an early age is not clinically irrelevant, as the serotonin reuptake inhibitor is widely used for the treatment of depressive disorders in women during pregnancy and in the postpartum period. Some authors demonstrate that Fx can cross human placenta and its presence in breast milk could induce harmful effects on developing fetuses and newborns [15,16]; thus, the evaluation of the hemodynamics and oxidative status in brainstem and heart in adult animal could provide further insight into serotonin modulation at a critical period of development. Thus, the aim of the present study was to investigate whether serotonin system manipulation by Fx treatment, during development, would affect hemodynamic response and oxidative metabolism in brainstem and heart in adult rat.

2. Material and methods

2.1. Animals

Wistar rats were maintained at a room temperature of 23 ± 1 °C, on a light–dark cycle of 12:12 h, with free access to water and food. The animals were assigned randomly to two groups with eight pups per litter 24 h after birth. In order to avoid any possible influence of the circadian rhythm on the measurements, all Fx and vehicle injections were administered between 7:00 and 8:00 AM. All surgical procedures and experiments were performed with the approval of the Animal Care Committee of the Federal University of Pernambuco, Brazil, under the process number 23.076.026644/2010-20 [17–19].

2.2. Pharmacological treatment

The experimental and control groups were administered a single daily subcutaneous injection of Fx (10 mg/kg, dissolved in saline solution, 10 ml/kg) or saline vehicle (NaCl 0.9%), approximately between 7:00 and 8:00 AM. The treatments were applied from the 1st to the 21st postnatal day (i.e., during the suckling period) [17–19].

2.3. Measurement of body weight

Body weights were determined from the 1st to the 21st day of life (i.e., birth to weaning) and also before sacrifice of the animals at 40 and 60 days of age. Body weights were recorded using an analytical balance accurate to 0.01 g [17–19].

2.4. Surgical procedure

Female Wistar rats at 59 days of age were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) for inserting arterial and venous cannulas into control ($n = 8$ in each group) and treated rats ($n = 8$ in each group) a day before cardiovascular evaluation, and all animals were administered a single injection of ketoprofen (4 mg/kg). While the rat was under anesthesia, polyethylene-tipped cannulas (PE-50 connected to PE-10, Clay Adams, NJ, USA) filled with heparin in normal saline (500 U/ml) were inserted into the left femoral artery and vein. The ends of the cannulas were tunneled subcutaneously and exteriorized at the back of the neck. After surgery for catheter implantation, each rat was maintained in a separate cage to avoid additional stress. On the day of the experiment, the arterial cannula was placed into a pressure transducer (SP844, AD instruments, MSW, Australia) and a pressure amplifier (ML866/P, AD instruments, MSW, Australia). The electrode cable and the arterial cannula were attached to extensions

during the recording period, thus allowing each rat complete freedom of movement in its chamber.

2.5. Measurement of AP and HR

A day after catheter implantation, the AP and HR were recorded in conscious animals using the appropriate measurement system (LabChart 7 Pro; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). Briefly, each animal was placed in the recording chamber for a period of acclimatization (approximately 60 min). The pulsatile AP was recorded for an additional 30 min under basal conditions, and the values of the MAP and HR were calculated following measurements taken at a 5-min interval of this period.

2.6. Spectral analyses of cardiovascular variability

Cardiovascular autonomic evaluation was performed using frequency domain analysis of the HR and systolic arterial pressure (SAP) with an appropriate software program (CardioSeries-v.2.4) that integrates spectra in the low-frequency (LF) (0.2–0.75 Hz) and high-frequency (HF) bands (0.75–3 Hz). The LF/HF ratio of the variability was calculated for assessing the sympathetic and parasympathetic indices of the heart [20].

2.7. Evaluation of sympathetic and parasympathetic tonus and intrinsic HR

A muscarinic antagonist methylatropine, a parasympathetic blocker administered at 2 mg/kg, iv, and B-adrenergic antagonist propranolol, a sympathetic blocker administered at 4 mg/kg, iv, were used to evaluate the effects of parasympathetic and sympathetic tonus on HR, respectively. In the first group of animals, methylatropine was injected initially and the HR recorded for 15 min; then propranolol was injected, following which the HR was recorded for 15 min. In the second group, this sequence was reversed; the animals were initially administered propranolol and then methylatropine. After each sequence, the intrinsic HR (iHR) was calculated [21,22].

2.8. Tissue homogenate preparation

Brainstem and heart were collected quickly and stored at -20 °C. Tissue samples were placed in small glass homogenizers with extraction buffer containing protease and phosphatase inhibitors. The tissue was homogenized on ice and centrifuged at 1000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected and stored at -20 °C until assay [23,24].

2.9. Protein determination

Aliquots of tissue homogenate were used for measuring the total protein content as described by Bradford [25].

2.10. Evaluation of malondialdehyde production

Lipid peroxidation is a process under which reactive oxygen species attack lipids, especially polyunsaturated fatty acids. Among the many different aldehydes formed as secondary products during lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA), appears to be the most mutagenic product of lipid peroxidation [26]. For the evaluation of lipid peroxidation, a total of 0.2 mg/ml homogenate was used to measure malondialdehyde production (MDA) following reaction with thiobarbituric acid (TBA) at 100 °C according to the method of Draper [27,28]. The results are expressed as nmol/mg protein.

2.11. Evaluation of protein oxidation

Reactive oxygen species can induce the oxidation of amino acid residues on proteins, thus yielding protein carbonyls. The protein carbonyl

content is the most widely used marker of oxidative modification of proteins [29]. The protein oxidation was assessed using the procedures highlighted by Reznick and Packer [30]. 2,2,2-Trichloroacetic acid (TCA) of 30% (w/v) was added to the sample on ice, and then this mixture was centrifuged for 14 min at 4000 RPM. The pellet was suspended in 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and immediately incubated in a dark room for 1 h with shaking every 15 min. Thereafter, the samples were centrifuged and washed thrice with ethyl/acetate buffer; then, the final pellet suspended in 6 M guanidine hydrochloride was incubated for 5 min in a water bath at 37 °C and the absorbance was measured at 370 nm.

2.12. Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase (SOD) is an enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide anion into another species such as hydrogen peroxide (H_2O_2) [31]. The determination of total SOD enzyme activity (t-SOD) was performed according to the method of Misra and Fridovich [32]. Samples (0.3 mg/ml homogenate) were incubated in sodium carbonate buffer (0.05%, pH 10.2, 0.1 mM EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid) in a water bath at 37 °C. The reaction was started by the addition of 30 mM epinephrine dissolved in 0.05% acetic acid. Absorbance at 480 nm was determined after 4 min. One unit of t-SOD was defined as the amount of enzyme causing a 50% inhibition of epinephrine oxidation. Tissue t-SOD activity was expressed as units per milligram protein (U/mg protein) [28].

2.13. Catalase activity

Catalase (CAT) catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide into water and oxygen [31]. Catalase activity was measured according to the method described by Aebi [33]. Briefly, 0.3 M H_2O_2 was added to a mixture containing 0.3 mg/ml of homogenate and 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). A decrease in the H_2O_2 levels was noted, following which the absorbance was measured at 240 nm for 3 min; the CAT activity was expressed as U/mg protein [33,34].

2.14. Glutathione S-transferase activity

Glutathione S-transferase (GST) is an antioxidant enzyme involved in the detoxification of a wide range of toxic agents including peroxide and alkylating agents present in the brain. The activity of GST was measured by the method described by Habig et al. [35]. The principle of the assay is based on the determination through absorbance spectroscopy of the conjugation of 1-chloro, 2,4-dinitrobenzene (CDNB) with reduced glutathione (GSH). Absorbance is measured at 340 nm. One unit of enzyme conjugates 10.0 nmol of CDNB per minute with reduced glutathione [28].

2.15. Reduced GSH levels

GSH is the major non-enzymatic antioxidant present in mammalian cells; in its reduced state, the thiol group of cysteine is able to donate a reducing equivalent to unstable molecules such as reactive oxygen species, thereby decreasing the toxicity of the unstable molecules. A homogenate of 0.3 mg/ml was added to 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) containing 5 mM EDTA and incubated with o-phthalaldehyde (OPT, 1 mg/ml) at room temperature for 15 min. Fluorescence intensity was measured at 350 nm excitation and 420 nm emission wavelengths and compared with a known standard GSH curve (0.5–10 μ M) [36].

2.16. Citrate synthase activity

Citrate synthase (CS) is the first enzyme in Krebs cycle and catalyzes the condensation of acetyl-CoA with oxaloacetate to form citrate [37]. Enzymatic activity was determined as described previously [38].

Briefly, the reaction mixture contained (in mM) 100 Tris-HCl (pH 8.2), 1 $MgCl_2$, 1 EDTA, 0.2 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ($\epsilon = 13.6 \mu mol \cdot ml^{-1} cm^{-1}$), 3 acetyl-CoA, 5 oxaloacetate, and 0.3 mg/ml of homogenate. The CS activity was measured by assessing the rate of change in absorbance at 412 nm over 3 min (30-s intervals) [18].

2.17. Statistical analysis

Results were expressed as the mean \pm the standard error of the mean (SEM) and compared using Student's unpaired t-test; however, the LF/HF ratios were expressed as median and compared using the Mann-Whitney test and body weight was determined using two-way ANOVA (analysis of variance) with multiple comparisons. The tests of significance were recommended based on the results of the tests of normality (Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk test). Comparisons were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., v.5, La Jolla, CA, USA), and differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Hemodynamic

At 60 days of age, rats treated with Fx and control rats had nearly identical values of baseline MAP (Ct: 102 ± 2 vs. Fx: 105 ± 4 mm Hg; $p < 0.05$; Fig. 1B) and HR (Ct: 394 ± 15 vs. Fx: 401 ± 24 bpm; Fig. 1C).

3.2. Cardiovascular variability

In addition, perinatal Fx treatment did not change either the LF oscillations of the SAP compared to control (Ct: 1.81 ± 0.14 vs. Fx: 1.98 ± 0.48 mm Hg²; $p > 0.05$; Table 1) or those of the PI (Ct: 24.00 ± 7.00 vs. Fx: 31.00 ± 7.00 NU; $p > 0.05$; Table 1). Likewise, the HF components of the SAP (Ct: 3.69 ± 1.01 vs. Fx: 3.93 ± 1.85 mm Hg²; $p > 0.05$; Table 1) and the PI (Ct: 76.00 ± 7.04 vs. Fx: 69.00 ± 7.00 NU; $p > 0.05$; Table 1) were similar to those of the control group. The LF/HF ratio of the PI in the Fx-treated group also had values similar to those of control (Ct: 0.41 ± 0.15 vs. Fx: 0.54 ± 0.16 ; $p > 0.05$; Table 1).

3.3. Evaluation of sympathetic and parasympathetic tonus and iHR

Fig. 2 shows the effects of pharmacological blockade to sympathetic (propranolol-induced) and parasympathetic (methylatropine-induced) activity in the heart of Fx-treated and control animals. These values were very similar to the parasympathetic (Ct: 67 ± 16 vs. Fx: 69 ± 14 bpm; $p < 0.05$; Fig. 2C) and sympathetic tonus (Ct: 89 ± 22 vs. Fx: 69 ± 11 bpm; Fig. 2D) of the heart, respectively. After a double pharmacological blockade, the iHR of the Fx-treated group was also similar to that of the control group (Ct: 398 ± 10 vs. Fx: 395 ± 21 bpm; $p < 0.05$; Fig. 2E).

3.4. Body weight and oxidative stress biomarkers

Fx treatment during lactation resulted in a small but significant decrease in body weight that was maintained until at least 60 days of age (20 days of age Ct: 46.8 ± 1.2 vs. Fx: 36.6 ± 1.6 g, $n = 8$; 40 days of age Ct: 133.7 ± 4.4 vs. Fx: 115.8 ± 1.9 g, $n = 8$; 60 days of age Ct: 188.2 ± 4.1 vs. Fx: 172.1 ± 4.2 g, $n = 8$) (Fig. 3).

Measuring oxidative stress in the brainstem and heart, evaluating MDA levels and carbonyl content, showed no significant difference between the Fx-treated and control groups in MDA levels in both tissues (brainstem = Ct: 4.91 ± 0.62 vs. Fx: 5.16 ± 0.39 nmol/mg of protein, $n = 6$; heart = Ct: 15.51 ± 1.04 vs. Fx: 16.87 ± 1.09 nmol/mg of protein, $n = 6$; Fig. 4A and C). However, we observed a decrease in the carbonyl contents of both tissues (brainstem = Ct: 11.15 ± 1.36

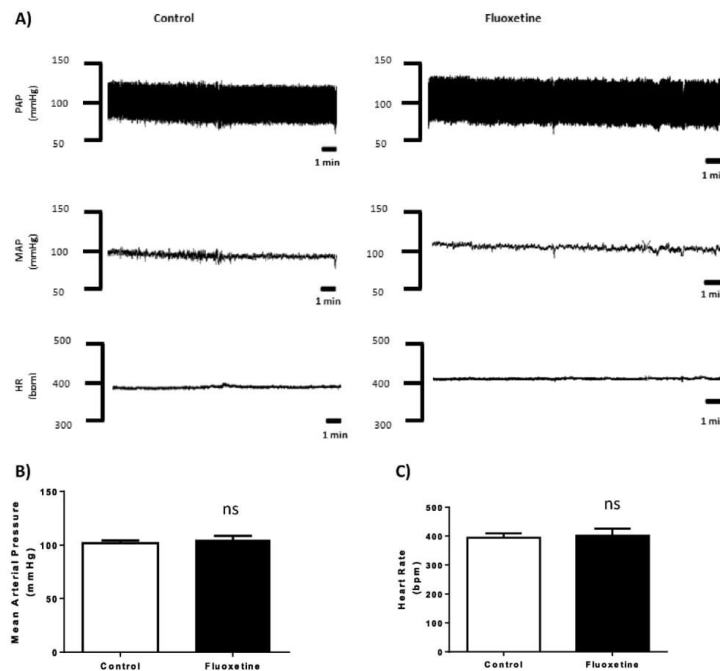


Fig. 1. Baseline cardiovascular parameters. Representative recordings of baseline pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP), and heart rate (HR, panel A). Mean values of MAP (panel B) and HR (panel C) in 60-day-old female rats of the control group (control, white bars, $n = 8$) and Fx-treated group (fluoxetine, black bars, $n = 8$). Values are expressed as mean \pm SEM. ns = not significant. Groups were compared by unpaired Student's *t*-test.

vs. Fx: 4.43 ± 0.14 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein, $n = 4$, $p < 0.01$; heart = Ct: 15.51 ± 1.04 vs. Fx: 16.87 ± 1.09 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ of protein, $n = 4$, $p < 0.01$; Fig. 4B and D, respectively).

3.5. Antioxidant defense and metabolic enzyme

The decrease observed in protein oxidation could be explained, in part at least, due to the increase in SOD and CAT activity observed in Fx-treated rats in both tissues (brainstem, SOD = Ct: 1.97 ± 0.24 vs. Fx: 3.60 ± 0.45 U/mg protein, $n = 6$, $p < 0.05$; CAT = Ct: 57.33 ± 3.55 vs. Fx: 70.86 ± 3.39 U/mg protein, $n = 6$, $p < 0.05$; GST = Ct: 2.39 ± 0.67 vs. Fx: 2.47 ± 0.26 U/mg protein, $n = 6$, $p > 0.05$; heart, SOD = Ct: 4.65 ± 0.48 vs. Fx: 7.47 ± 1.17 U/mg protein, $n = 6$; CAT = Ct: 15.23 ± 1.70 vs. Fx: 21.43 ± 1.76 U/mg protein, $n = 6$, $p < 0.05$; GST = Ct: 11.03 ± 2.06 vs. Fx: 10.42 ± 0.42 U/mg of protein,

$p > 0.05$; Fig. 5A–F. In addition to the evaluation of enzymatic defense, we also measured the non-enzymatic defense, GSH; however, we did not observe any difference in both tissues (brainstem Ct: 0.97 ± 0.17 vs. Fx: 1.01 ± 0.15 $\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein, $n = 4$, $p > 0.05$; heart Ct: 1.52 ± 0.05 vs. Fx: 1.34 ± 0.15 $\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein, $n = 4$, $p > 0.05$; Fig. 5G–H).

With regard to metabolic enzyme, we measured the activity of CS, an important enzyme in Krebs cycle that has been commonly used as an oxidative metabolic marker; in our study, we observed that serotonin modulation at an early age significantly increases its activity in brainstem (Ct: 7.00 ± 0.19 , $n = 4$ vs. Fx: 8.37 ± 0.31 U/mg protein, $n = 4$, $p < 0.05$) but not in heart (Ct: 3.70 ± 0.36 , $n = 4$ vs. Fx: 4.21 ± 0.34 U/mg protein, $n = 4$, $p > 0.05$) (Fig. 6A and B).

4. Discussion

The present study was designed to assess the long-term effect of Fx-induced increases in serotonin levels in neonatal female rats on hemodynamics and oxidative metabolism in the adult animal. With regard to hemodynamics parameters, our study showed that the Fx-treated group presented values for MAP and HR, LF, and HF bands of the SAP and PI, and sympathetic and parasympathetic tonus of the heart, which did not differ from those of control. It is known that the rhythmicity of the sympathetic nervous system can modulate the AP and the PI (time between beats, RR) at regular frequencies [39], and these rhythmic oscillations in cardiovascular parameters facilitate measurement of cardiovascular autonomic balance [40]. Accordingly, the LF oscillations of the SAP are typically enhanced during the states of sympathetic activation and facilitate an indirect measurement of sympathetic nerve activity [41]. In this study, the Fx-treated animals

Table 1

Effect of fluoxetine treatment on spectral analysis of systolic arterial pressure (SAP) and pulse interval (PI). Spectral analysis of the systolic arterial pressure and pulse interval in 60-day-old female rats in the control group and Fx-treated groups. Values are expressed as mean \pm SEM. mm Hg² = millimeters of mercury; NU = normalized units. Groups were compared by unpaired Student's *t*-test.

Cardiovascular variability	Control	Fluoxetine
Systolic arterial pressure		
LF (mm Hg ²)	1.81 ± 0.14	1.98 ± 0.48
HF (mm Hg ²)	3.69 ± 1.01	3.93 ± 1.85
Pulse interval		
Pulse interval	24.00 ± 7.00	31.00 ± 7.00
HF (NU)	76.00 ± 7.04	69.00 ± 7.00
LF/HF	0.41 ± 0.15	0.54 ± 0.16

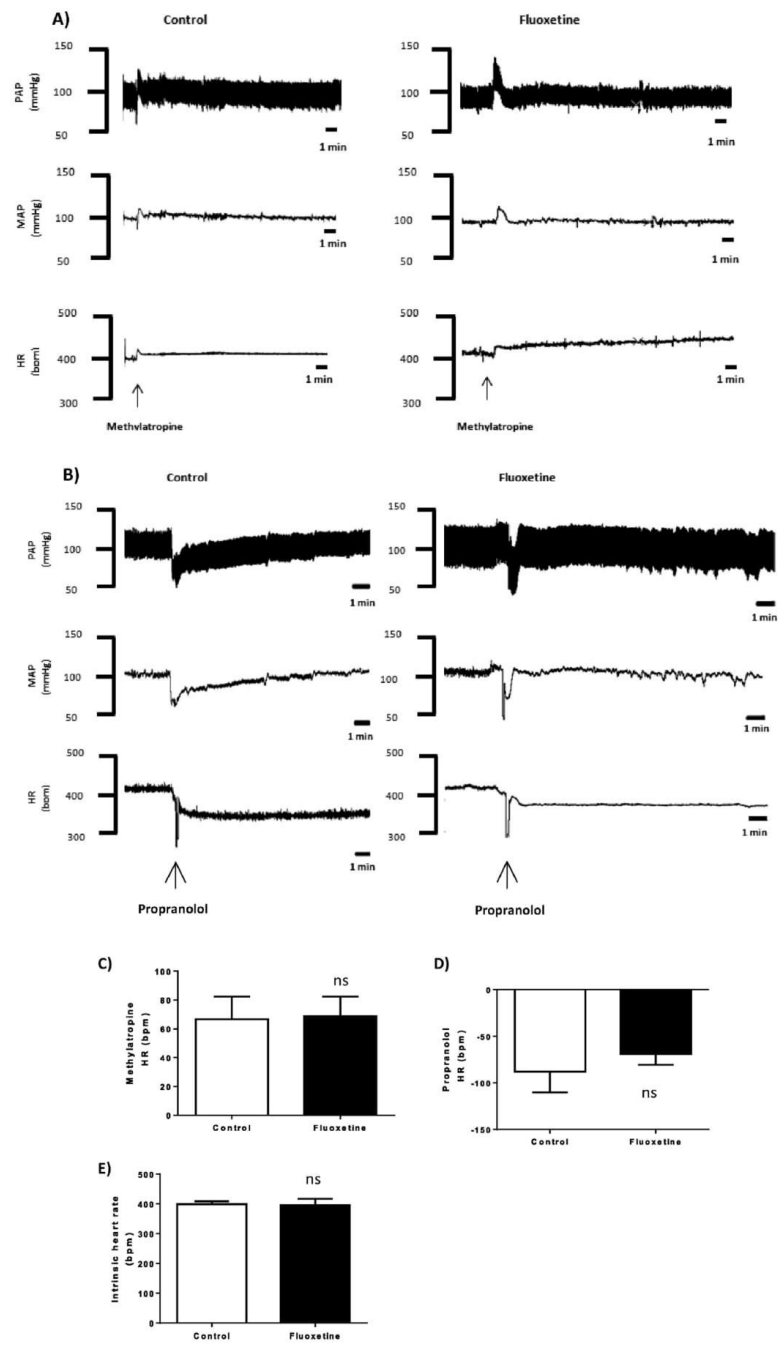


Fig. 2. Sympathetic–vagal balance and intrinsic heart rate. Representative recordings (panels A and B), heart rate variability (Δ HR, bpm) after administration of propranolol (panel C) and methylatropine (panel D), and intrinsic heart rate after double blockade (panel E) in 60-day-old female rats in the control group (control, white bars, $n = 4$) and Fx-treated group (fluoxetine, black bars, $n = 4$). Values are expressed as mean \pm SEM. ns = not significant. Groups were compared by unpaired Student's t -test.

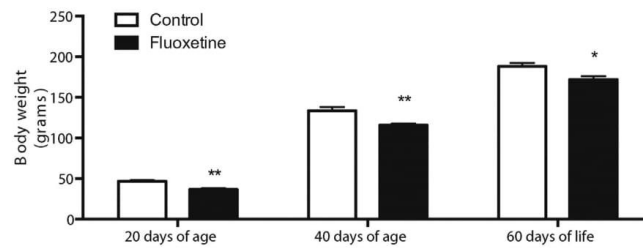


Fig. 3. Body weight evaluation. Body weight evaluation over 60 days in females upon chronic exposure to fluoxetine. Rat pups were administered daily subcutaneous injections of control vehicle (0.9% NaCl, 10 ml/kg body weight, $n = 8$) or Fx (10 mg/kg body weight, $n = 8$) from the 1st to the 21st day of life. Data are mean \pm SEM, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Groups were compared by two-way ANOVA with multiple comparisons.

exhibited normal values for the LF component in the SAP spectrum, suggesting that the vasoconstrictor sympathetic activity is not altered by Fx treatment. In regard to the HF component of the SAP, which represents an indirect evaluation of the parasympathetic and respiratory modulation of AP [42], Fx-treated animals also showed values similar to those of the control group.

Moreover, PI variability showed values of LF and HF components in the Fx-treated animals, which do not differ from the control values, and therefore a normal LF/HF ratio in the treated rats. Thus, our data suggest the presence of normal function of cardiac autonomic control in the Fx-treated animals. In addition to the methods for estimating cardiovascular autonomic modulation described earlier, we analyzed cardiovascular function in Fx-treated rats by performing a selective autonomic blockade of HR. After antagonism of either β -adrenergic receptors or muscarinic receptors, the Fx-treated group showed normal cardiac sympathetic and parasympathetic tone, respectively; suggesting that autonomic control of HR was not affected by an early elevation in serotonin levels. iHR also remained unchanged upon Fx treatment, thus highlighting the absence of a serotonin effect on the normal control of HR. These findings suggest that increased serotonin signaling early in development does not alter the mechanisms of cardiovascular control in adulthood.

The present observations differ from those of a previous study with regard to effect of Fx on arterial blood pressure, which showed that fluoxetine treatment for 21 days consecutively in adult animals induces a mild hypertension due to an alteration in baroreflex control of HR [10]. It is important to highlight that this discrepancy in the findings could be explained in part by the difference in the age at which the treatment was conducted. In our model, we performed the treatment during brain development, while in the previous study, animals were treated when they reached adulthood, an age at which brain development would have been completed.

Several studies suggest that alteration in arterial blood pressure in part is due to an increase in reactive oxygen species associated with an increase in oxidative stress-induced damage [13,43–46]. In regard to oxidative stress parameters, Fx treatment did not induce lipid peroxidation either in the brainstem or heart but decreased protein oxidation in both tissues. Recently, studies from our laboratory have shown that serotonin modulation at an early age by Fx treatment improved the antioxidant status in the hypothalamus and hippocampus of female rats [19]; our group also showed that this treatment improved mitochondrial function and oxidative status in hypothalamus and skeletal muscle of male rats [18]. Our data corroborate with those of the previous studies conducted in the hippocampus and lung, where it was shown that Fx

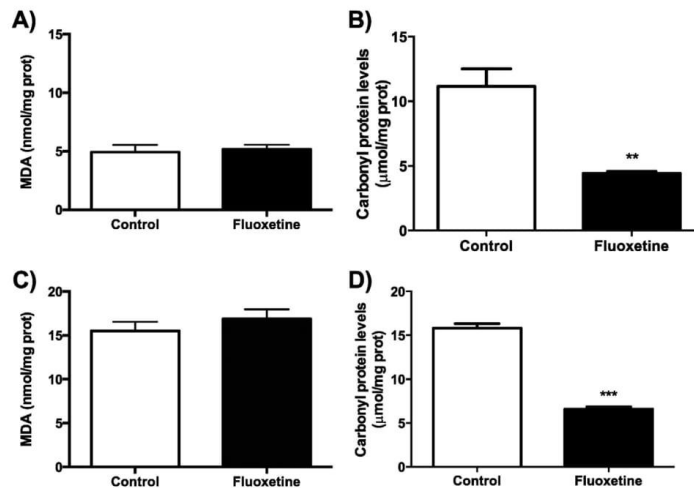


Fig. 4. Oxidative stress biomarker. Evaluation of the effects of chronic exposure to fluoxetine during nursing on oxidative stress in the brainstem and heart of female rats at 60 days of life. Pups were administered daily fluoxetine (Fx = 10 mg/kg body weight) or vehicle (0.9% NaCl, C = 10 ml/kg body weight) from the 1st to the 21st day of life. A) MDA concentration in brainstem; B) carbonyl levels in brainstem; C) MDA concentration in heart; D) carbonyl levels in heart. Data are presented as mean \pm SEM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. Groups were compared by unpaired Student's t-test.

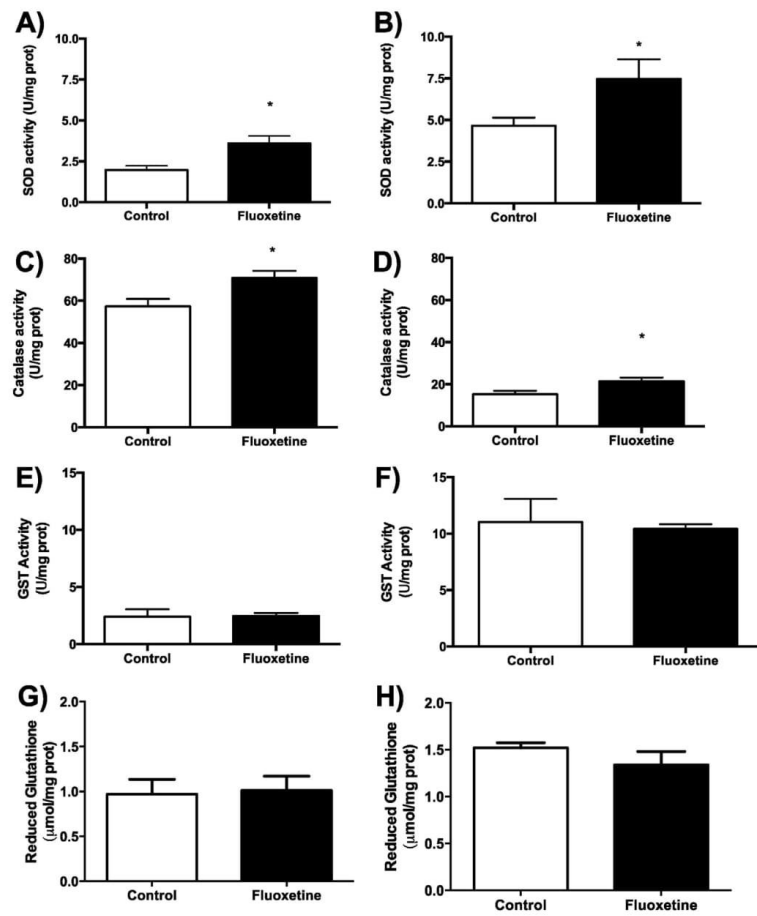


Fig. 5. Antioxidant defense analysis. Evaluation of the effects of chronic exposure to fluoxetine during nursing on oxidative balance in the brainstem and heart of female rats at 60 days of life. The pups were administered daily fluoxetine (Fx = 10 mg/kg body weight) or vehicle (0.9% NaCl, C = 10 ml/kg body weight) from the 1st to 21st day of life. A) Superoxide dismutase (SOD) activity in brainstem; B) superoxide dismutase (SOD) activity in heart; C) catalase (CAT) activity in brainstem; D) catalase (CAT) activity in heart; E) glutathione S-transferase (GST) activity in brainstem; F) glutathione S-transferase (GST) activity in heart; G) GSH levels in brainstem; H) GSH levels in heart. Data are presented as mean ± SEM. *p < 0.05. Groups were compared by unpaired Student's t-test.

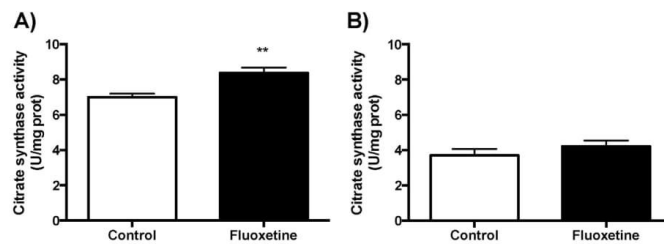


Fig. 6. Metabolic enzyme in brainstem and heart. Evaluation of effects of chronic exposure to fluoxetine during nursing on citrate synthase activity in the brainstem and heart of female rats at 60 days of life. The pups were administered daily fluoxetine (Fx = 10 mg/kg body weight, sc) or vehicle (0.9% NaCl, C = 10 ml/kg body weight, sc) from the 1st to 21st day of life. A) Citrate synthase (CS) activity in brainstem; B) citrate synthase (CS) activity in heart. Data are presented as mean ± SEM. **p < 0.01. Groups were compared by unpaired Student's t-test.

treatment improves antioxidant defense and decreases oxidative stress [47,48]. In addition to the observation related to oxidative stress, our study also showed that Fx increased the CS activity in brainstem and tendency in heart; in concordance with our observation, previous studies with Fx or imipramine (also a neurotransmitter reuptake inhibitor) showed that serotonin modulation increases CS activity in amygdala [49], corpus striatum [50], hypothalamus [18], and skeletal muscle [18].

5. Conclusion

5-HT system modulation at an early age did not affect the hemodynamics parameters, but improved the antioxidant defense and metabolic enzyme activity in cardiac-related tissues. To the best of our knowledge, the present data are the first findings to demonstrate that 5-HT modulation at an early age increases the antioxidant defense and metabolic enzyme activity in brainstem and heart in adult rats. Therefore, our results suggest that an intervention with serotonin reuptake inhibitors such as Fx does not induce abnormal cardiovascular physiology, most likely due to an improvement in antioxidant defenses and metabolic enzyme activity in tissues of the cardiovascular system.

Acknowledgments

The acquisition of the reagents that were used in this work was supported financially by the Foundation to Support Science and Research from Pernambuco State—Brazil (FACEPE grant APQ-no. 1026-4.09/12; 1365-2.07/10) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant no. 484452/2011-8). We are also grateful to FACEPE, CNPq and CAPES, which provided scholarships for GRFB, AAP, and AIS. The English version of this text was revised by Sidney Pratt, M.A.T. (The Johns Hopkins University), RSA dip (TEFL-University of Cambridge).

References

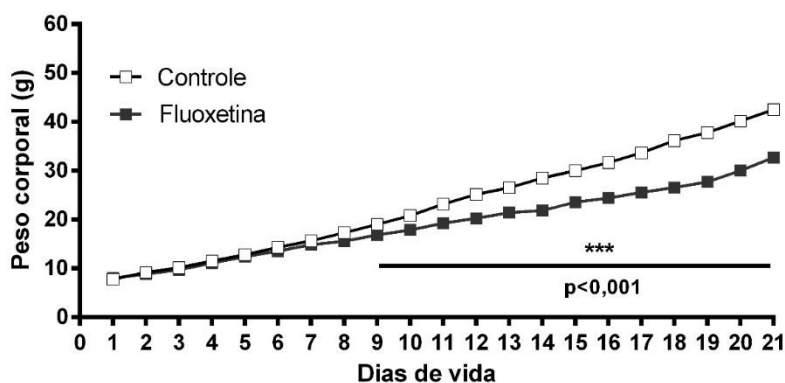
- [1] B.B. Brodie, P.A. Shore, A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 66 (3) (Mar 14 1957) 631–642.
- [2] G. Halliday, K. Baker, C. Harper, Serotonin and alcohol-related brain damage, *Metab. Brain Dis.* 10 (1) (Mar 1995) 25–30.
- [3] M.M. Rapport, A.A. Green, I.H. Page, Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization, *J. Biol. Chem.* 176 (3) (Dec 1948) 1243–1251.
- [4] C.M. Hildreth, J.R. Padley, P.M. Pilowsky, A.K. Goodchild, Impaired serotonergic regulation of heart rate may underlie reduced baroreflex sensitivity in an animal model of depression, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294 (1) (Jan 2008) H474–H480.
- [5] W.A. Wolf, D.M. Kuhn, W. Lovenberg, Blood pressure responses to local application of serotonergic agents in the nucleus tractus solitarius, *Eur. J. Pharmacol.* 69 (3) (Jan 29 1981) 291–299.
- [6] P.D. Feldman, F.J. Galiano, Cardiovascular effects of serotonin in the nucleus of the solitary tract, *Am. J. Phys.* 269 (1 Pt 2) (Jul 1995) R48–R56.
- [7] J.C. Callera, L.G. Bonagamba, C. Sevoz, R. Laguzzi, B.H. Machado, Cardiovascular effects of microinjection of low doses of serotonin into the NTS of unanesthetized rats, *Am. J. Phys.* 272 (4 Pt 2) (Apr 1997) R1135–R1142.
- [8] M.L. Cohen, R.W. Fuller, K.S. Wiley, Evidence for 5-HT₂ receptors mediating contraction in vascular smooth muscle, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218 (2) (Aug 1981) 421–425.
- [9] F.M. Lai, T. Tanikella, P. Cervoni, Characterization of serotonin receptors in isolated rat intramyocardial coronary artery, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256 (1) (Jan 1991) 164–168.
- [10] C.C. Crestani, R.F. Tavares, F.S. Guimarães, F.M. Correa, S.R. Joca, L.B. Resstel, Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats, *Eur. J. Pharmacol.* 670 (2–3) (Nov 30 2011) 527–533.
- [11] N.E. De Long, J.R. Hyslop, S. Raha, D.B. Hardy, A.C. Holloway, Fluoxetine-induced pancreatic beta cell dysfunction: new insight into the benefits of folic acid in the treatment of depression, *J. Affect. Disord.* 166 (Sep 2014) 6–13.
- [12] J. Zlatkovic, N. Todorovic, N. Tomanovic, M. Boskovic, S. Djordjevic, T. Lazarevic-Pasti, et al., Chronic administration of fluoxetine or clozapine induces oxidative stress in rat liver: a histopathological study, *Eur. J. Pharm. Sci.* 59 (Aug 1 2014) 20–30.
- [13] S. Chan, J. Chan, Brain stem NOS and ROS in neural mechanisms of hypertension, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (1) (Feb 18 2013) 146–163.
- [14] S.H. Chan, J.Y. Chan, Angiotensin-generated reactive oxygen species in brain and pathogenesis of cardiovascular diseases, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (10) (Oct 1 2013) 1074–1084.
- [15] J. Francis-Oliveira, B. Ponte, A.P. Barbosa, L.F. Verissimo, M.V. Gomes, G.G. Pelosi, et al., Fluoxetine exposure during pregnancy and lactation: effects on acute stress response and behavior in the novelty-suppressed feeding are age and gender-dependent in rats, *Behav. Brain Res.* 252 (Sep 1 2013) 195–203.
- [16] R. Davanzo, M. Copertino, A. De Cunto, F. Minen, A. Amaddeo, Antidepressant drugs and breastfeeding: a review of the literature, *Breastfeed. Med.* 6 (2) (Apr 2011) 89–98.
- [17] A.I. da Silva, G.R. Braz, A.A. Pedroza, L. Nascimento, C.M. Freitas, D.J. Ferreira, et al., Fluoxetine induces lean phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1 expression, *J. Bioenerg. Biomembr.* 47 (4) (Aug 2015) 309–318.
- [18] A.I. da Silva, G.R. Braz, R. Silva-Filho, A.A. Pedroza, D.S. Ferreira, R. Manhaes de Castro, et al., Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 40 (6) (Jun 2015) 565–574.
- [19] A.I. da Silva, L.C.M. Galindo, L. Nascimento, C.M. Freitas, R. Manhaes-de-Castro, C.J. Lagranha, 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.* 92 (4) (2014) 330–337.
- [20] A. Porta, E. Tobaldini, S. Guzzetti, R. Furlan, N. Montano, T. Gnechchi-Ruscone, Assessment of cardiac autonomic modulation during graded head-up tilt by symbolic analysis of heart rate variability, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293 (1) (Jul 2007) H702–H708.
- [21] M.A. Barros, J.L. De Brito Alves, V.O. Nogueira, A.G. Wanderley, J.H. Costa-Silva, Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 25 (1) (Jan 2015) 123–130.
- [22] J.P. Sabino, C.A. da Silva, R.F. de Melo, R. Fazan Jr., H.C. Salgado, The treatment with pyridostigmine improves the cardiorespiratory function in rats with chronic heart failure, *Auton. Neurosci.* 173 (1–2) (Jan 2013) 58–64.
- [23] S. Menazza, R. Wong, T. Nguyen, G. Wang, M. Gucsek, E. Murphy, CypD(–/–) hearts have altered levels of proteins involved in Krebs cycle, branch chain amino acid degradation and pyruvate metabolism, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 56 (Mar 2013) 81–90.
- [24] D.J. Ferreira, Y. Liu, M.P. Fernandes, C.J. Lagranha, Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring, *Nutr. Neurosci.* (Jun 2 2015).
- [25] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (May 7 1976) 248–254.
- [26] A. Ayala, M.F. Munoz, S. Arguelles, Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2014 (2014) 360438.
- [27] H.H. Draper, E.J. Squires, H. Mahmoodi, J. Wu, S. Agarwal, M. Hadley, A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials, *Free Radic. Biol. Med.* 15 (4) (Oct 1993) 353–363.
- [28] L. Nascimento, C.M. Freitas, R. Silva-Filho, A.C. Leite, A.B. Silva, A.I. da Silva, et al., The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 39 (8) (Aug 2014) 880–887.
- [29] M. Chevion, E. Berenshtein, E.R. Stadtman, Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage, *Free Radic. Res.* 33 (Suppl.) (Nov 2000) S99–108.
- [30] A.Z. Reznick, L. Packer, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, *Methods Enzymol.* 233 (1994) 357–363.
- [31] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4, Oxford UK, United Kingdom, 2007.
- [32] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (10) (May 25 1972) 3170–3175.
- [33] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [34] H.D. Cardoso, P.P. Passos, C.J. Lagranha, A.C. Ferraz, E.F. Santos Junior, R.S. Oliveira, et al., Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential fatty acids, *Front. Hum. Neurosci.* 6 (2012) 249.
- [35] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249 (22) (Nov 25 1974) 7130–7139.
- [36] P.J. Hissin, R. Hilf, A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.* 74 (1) (Jul 1976) 214–226.
- [37] G. Wiegand, S.J. Remington, Citrate synthase: structure, control, and mechanism, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 15 (1986) 97–117.
- [38] C. Le Page, P. Noirez, J. Courty, B. Riou, B. Swynghedauw, S. Besse, Exercise training improves functional post-ischemic recovery in senescent heart, *Exp. Gerontol.* 44 (3) (Mar 2009) 177–182.
- [39] W.T. Tseng, R.F. Chen, M.L. Tsai, C.T. Yen, Correlation of discharges of rostral ventrolateral medullary neurons with the low-frequency sympathetic rhythm in rats, *Neurosci. Lett.* 454 (1) (Apr 17 2009) 22–27.
- [40] N. Japundzic-Zigon, Physiological mechanisms in regulation of blood pressure fast frequency variations, *Clin. Exp. Hypertens.* 20 (4) (May 1998) 359–388.
- [41] C. Julien, The enigma of Mayer waves: facts and models, *Cardiovasc. Res.* 70 (1) (Apr 1 2006) 12–21.
- [42] A. Malliani, M. Pagani, F. Lombardi, S. Cerutti, Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain, *Circulation* 84 (2) (Aug 1991) 482–492.
- [43] E.E. Essick, F. Sam, Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 3 (3) (May–Jun 2010) 168–177.
- [44] M.C. Zimmerman, R.L. Davisson, Redox signaling in central neural regulation of cardiovascular function, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 84 (2–3) (Feb–Apr 2004) 125–149 [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review].

- [45] L.M. Cardoso, D.S. Colombari, J.V. Menani, G.M. Toney, D.A. Chianca Jr., E. Colombari, Cardiovascular responses to hydrogen peroxide into the nucleus tractus solitarius, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297 (2) (Aug 2009) R462–R469.
- [46] C.Y. Tsai, C.H. Su, V. Baudrie, D. Laude, J.C. Weng, A.Y. Chang, et al., Visualizing oxidative stress-induced depression of cardiac vagal baroreflex by MRI/DTI in a mouse neurogenic hypertension model, *NeuroImage* 82C (Jun 6 2013) 190–199.
- [47] H. Kim do, H. Li, K.Y. Yoo, B.H. Lee, I.K. Hwang, M.H. Won, Effects of fluoxetine on ischemic cells and expressions in BDNF and some antioxidants in the gerbil hippocampal CA1 region induced by transient ischemia, *Exp. Neurol.* 204 (2) (Apr 2007) 748–758.
- [48] I. Guner, M.O. Yaman, U. Aksu, D. Uzun, H. Erman, M. Inceli, et al., The effect of fluoxetine on ischemia–reperfusion after aortic surgery in a rat model, *J. Surg. Res.* 189 (1) (Jun 1 2014) 96–105.
- [49] H.M. Abelaira, G.Z. Reus, K.F. Ribeiro, G. Zappellini, G.K. Ferreira, L.M. Gomes, et al., Effects of acute and chronic treatment elicited by lamotrigine on behavior, energy metabolism, neurotrophins and signaling cascades in rats, *Neurochem. Int.* 59 (8) (Dec 2011) 1163–1174.
- [50] F.R. Agostinho, G.Z. Reus, R.B. Stringari, K.F. Ribeiro, A.K. Ferraro, J. Benedet, et al., Treatment with olanzapine, fluoxetine and olanzapine/fluoxetine alters citrate synthase activity in rat brain, *Neurosci. Lett.* 487 (3) (Jan 10 2011) 278–281.

5 RESULTADOS COMPLEMENTARES

5.1 Machos

Figura 1 – Peso corporal de ratos machos dos grupos controle (NaCl 0,9%) e tratados com fluoxetina (Fx 10mg/kg) durante o período de tratamento farmacológico (1°-21° dia pós-natal). N=8 por grupo, analisado pelo teste t student.



5.2 Fêmeas

Figura 2 – Peso corporal de ratas fêmeas dos grupos controle (NaCl 0,9%) e tratados com fluoxetina (Fx 10mg/kg) durante o período de tratamento farmacológico (1°-21° dia pós-natal). N=8 por grupo, analisado pelo teste t student.

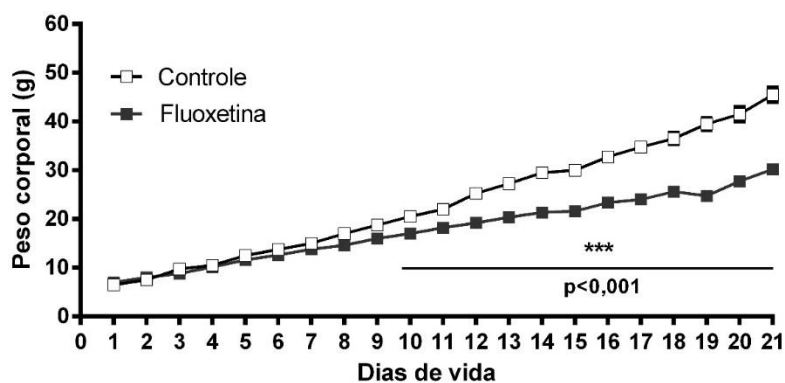


Figura 3 – Consumo de oxigênio mitocondrial com substratos do complexo II (glutamato e malato) do tecido cardíaco de ratas fêmeas dos grupos controle (NaCl 0,9%) e tratado com fluoxetina (Fx 10mg/kg), aos 60 dias de vida. A razão do controle respiratório (RCR) corresponde à divisão entre os estados de fosforilação e basal. N=5-7 por grupo, *p<0,05, analisados pelo ANOVA one way.

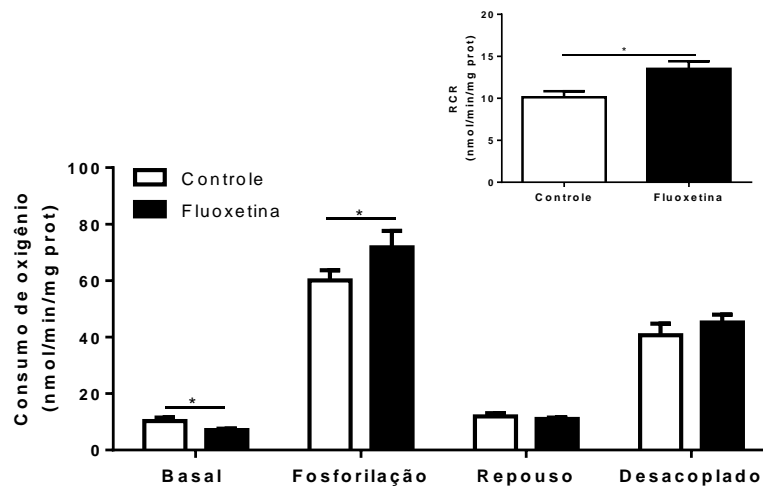


Figura 4 – Produção de espécies reativas mitocondriais com substratos do complexo II (glutamato e malato) do tecido cardíaco de ratas fêmeas dos grupos controle (NaCl 0,9%) e tratado com fluoxetina (Fx 10mg/kg), aos 60 dias de vida. N=6 por grupo, ** $p < 0,01$, analisados pelo teste t student.

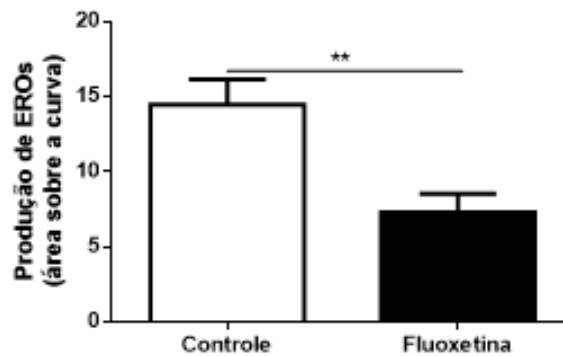
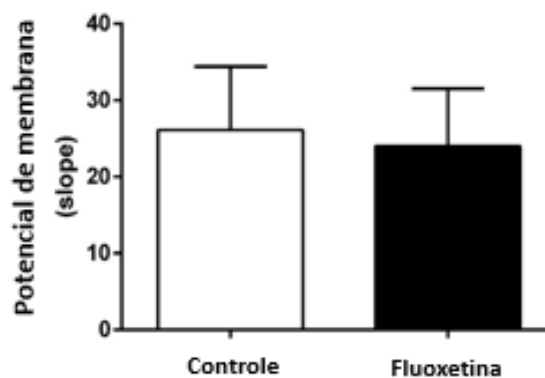


Figura 5 – Potencial de membrana mitocondrial com substratos do complexo II (glutamato e malato) do tecido cardíaco de ratas fêmeas dos grupos controle (NaCl 0,9%) e tratado com fluoxetina (Fx 10mg/kg), aos 60 dias de vida. N=3 por grupo.



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos nossos resultados podemos perceber que a manipulação do sistema serotoninérgico neonatal não induziu disfunção mitocondrial e oxidativa no coração de ratos machos e fêmeas juvenis, refutando nossa hipótese original. Acredita-se que o período de intervenção farmacológica tenha sido crucial para as adaptações observadas. A partir do exposto, podemos sugerir que o tratamento crônico com fluoxetina durante o período da lactação modula positivamente a bioenergética mitocondrial e balanço oxidativo no tecido cardíaco, independente de gênero. Mesmo diante dos achados pioneiros e relevantes para esse campo de estudo ainda não se tem clareza acerca dos efeitos mitocondriais promovidos pela serotonina e o potencial agregador dessas informações para o entendimento dos mecanismos patológicos correlacionados. Portanto, ainda se faz necessário o desenvolvimento de pesquisas que elucidem melhor a associação entre os insultos farmacológicos precoces e seus efeitos tardios, e que contribuam para um conhecimento mais amplo e direcionado à prática clínica.

REFERÊNCIAS

- ADAM-VIZI, V.; CHINOPOULOS, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, n. 12, p. 639-45, Dec 2006. ISSN 0165-6147 (Print)
0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17056127> >.
- AHMAD, S. M. Conserved signaling mechanisms in Drosophila heart development. **Dev Dyn**, Jun 09 2017. ISSN 1097-0177 (Electronic)
1058-8388 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28598558> >.
- AKBAR, M. et al. Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress. **Brain Res**, v. 1637, p. 34-55, Apr 15 2016. ISSN 1872-6240 (Electronic)
0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26883165> >.
- ALDRIGHI, J. M. et al. Effects of estradiol on myocardial global performance index in hypertensive postmenopausal women. **Gynecol Endocrinol**, v. 19, n. 5, p. 282-292, 2004. ISSN 1473-0766 (Electronic)
0951-3590 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28447533> >.
- ARNOLD, A. P. et al. Sex Hormones and Sex Chromosomes Cause Sex Differences in the Development of Cardiovascular Diseases. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 37, n. 5, p. 746-756, May 2017. ISSN 1524-4636 (Electronic)
1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28279969> >.
- AYME-DIETRICH, E. et al. Contribution of serotonin to cardiac remodeling associated with hypertensive diastolic ventricular dysfunction in rats. **J Hypertens**, v. 33, n. 11, p. 2310-21, Nov 2015. ISSN 1473-5598 (Electronic)
0263-6352 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26259125> >.
- BERGSTROM, R. F. et al. Clinical pharmacology and pharmacokinetics of fluoxetine: a review. **Br J Psychiatry Suppl**, n. 3, p. 47-50, Sep 1988. ISSN 0960-5371 (Print)
0960-5371 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3074865> >.
- BLENCK, C. L. et al. The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease. **Circ Res**, v. 118, n. 8, p. 1294-312, Apr 15 2016. ISSN 1524-4571 (Electronic)
0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27081111> >.
- BORTOLATO, M.; SHIH, J. C. Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: preclinical and clinical evidence. **Int Rev Neurobiol**, v. 100, p. 13-42, 2011. ISSN 0074-7742 (Print)
0074-7742 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971001> >.
- BRADLEY, P. B. The characterization of 5-HT receptors. Introduction. **Neuropharmacology**, v. 23, n. 12B, p. 1465-6, Dec 1984. ISSN 0028-3908 (Print)
0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6527746> >.

BUZNIKOV, G. A.; LAMBERT, H. W.; LAUDER, J. M. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. **Cell Tissue Res**, v. 305, n. 2, p. 177-86, Aug 2001. ISSN 0302-766X (Print) 0302-766X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11545255> >.

CHEAH, S. Y. et al. mRNA Expression and DNA Methylation Analysis of Serotonin Receptor 2A (HTR2A) in the Human Schizophrenic Brain. **Genes (Basel)**, v. 8, n. 1, Jan 04 2017. ISSN 2073-4425 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28054990> >.

CHO, C. H.; MEI, Q. B.; KAAAN, S. K. The intraperitoneal effects of 5-hydroxytryptamine on haemodynamics, gastric mucosal blood flow and platelet aggregation. **Eur J Pharmacol**, v. 256, n. 1, p. 9-15, Apr 11 1994. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8026564> >.

COTE, F. et al. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 23, p. 13525-30, Nov 11 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597720> >.

CRUMPTON, C. W. et al. Serotonin and the dynamics of the heart. **Ann N Y Acad Sci**, v. 80, p. 960-8, Sep 17 1959. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13813095> >.

CURTI, C. et al. Fluoxetine interacts with the lipid bilayer of the inner membrane in isolated rat brain mitochondria, inhibiting electron transport and F1F0-ATPase activity. **Mol Cell Biochem**, v. 199, n. 1-2, p. 103-9, Sep 1999. ISSN 0300-8177 (Print) 0300-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10544958> >.

DA SILVA, A. I. et al. Fluoxetine induces lean phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1 expression. **J Bioenerg Biomembr**, v. 47, n. 4, p. 309-18, Aug 2015. ISSN 1573-6881 (Electronic) 0145-479X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26129910> >.

DA SILVA, A. I. et al. Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 40, n. 6, p. 565-74, Jun 2015. ISSN 1715-5320 (Electronic) 1715-5312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25923579> >.

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. ISSN 1205-7541 (Electronic) 0008-4212 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24708216> >.

DAVANZO, R. et al. Antidepressant drugs and breastfeeding: a review of the literature. **Breastfeed Med**, v. 6, n. 2, p. 89-98, Apr 2011. ISSN 1556-8342 (Electronic) 1556-8253 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20958101> >.

- DAVIS, R. L. et al. Risks of congenital malformations and perinatal events among infants exposed to antidepressant medications during pregnancy. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**, v. 16, n. 10, p. 1086-94, Oct 2007. ISSN 1053-8569 (Print) 1053-8569 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17729378> >.
- DE SOUZA, S. L. et al. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. **Physiol Behav**, v. 82, n. 2-3, p. 375-9, Sep 15 2004. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15276801> >.
- DEMOULIN, J. C. et al. 5-HT₂-receptor blockade in the treatment of heart failure. A preliminary study. **Lancet**, v. 1, n. 8231, p. 1186-8, May 30 1981. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6112531> >.
- DOBBING, J. Undernutrition and the developing brain. The relevance of animal models to the human problem. **Am J Dis Child**, v. 120, n. 5, p. 411-5, Nov 1970. ISSN 0002-922X (Print) 0002-922X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5474747> >.
- DRENCKHAHN, J. D. et al. Compensatory growth of healthy cardiac cells in the presence of diseased cells restores tissue homeostasis during heart development. **Dev Cell**, v. 15, n. 4, p. 521-33, Oct 2008. ISSN 1878-1551 (Electronic) 1534-5807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854137> >.
- DUTSCHMANN, M. et al. The potency of different serotonergic agonists in counteracting opioid evoked cardiorespiratory disturbances. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1529, p. 2611-23, Sep 12 2009. ISSN 1471-2970 (Electronic) 0962-8436 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651661> >.
- ERNSTER, L.; SCHATZ, G. Mitochondria: a historical review. **J Cell Biol**, v. 91, n. 3 Pt 2, p. 227s-255s, Dec 1981. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7033239> >.
- FERREIRA, D. J.; SELLITTI, D. F.; LAGRANHA, C. J. Protein undernutrition during development and oxidative impairment in the central nervous system (CNS): potential factors in the occurrence of metabolic syndrome and CNS disease. **J Dev Orig Health Dis**, v. 7, n. 5, p. 513-524, Oct 2016. ISSN 2040-1752 (Electronic) 2040-1744 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27270104> >.
- FERREIRA, D. J. S.; LAGRANHA, C. J. Desequilíbrio oxidativo: um mecanismo bioquímico associado a Desordens Cardiovasculares induzidas no início da vida. **Neurobiologia**, v. 76, n. 1-2, p. 50-60, 2013. ISSN 1807-9865.
- FOSKETT, J. K.; MADESH, M. Regulation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by MICU1 and MICU2. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 449, n. 4, p. 377-83, Jul 11 2014. ISSN 1090-2104 (Electronic) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24792178> >.
- 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 01 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)
0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23764459> >.

FURTADO, M. B.; COSTA, M. W.; ROSENTHAL, N. A. The cardiac fibroblast: Origin, identity and role in homeostasis and disease. **Differentiation**, v. 92, n. 3, p. 93-101, Sep 2016. ISSN 1432-0436 (Electronic)
0301-4681 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27421610> >.

FURTADO, M. B. et al. View from the heart: cardiac fibroblasts in development, scarring and regeneration. **Development**, v. 143, n. 3, p. 387-97, Feb 01 2016. ISSN 1477-9129 (Electronic)
0950-1991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26839342> >.

GARRETT, S. M. et al. Agonism of the 5-hydroxytryptamine 1F receptor promotes mitochondrial biogenesis and recovery from acute kidney injury. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 350, n. 2, p. 257-64, Aug 2014. ISSN 1521-0103 (Electronic)
0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24849926> >.

GENET, N. et al. Signaling Pathways Linked to Serotonin-Induced Superoxide Anion Production: A Physiological Role for Mitochondria in Pulmonary Arteries. **Front Physiol**, v. 8, p. 76, 2017. ISSN 1664-042X (Print)
1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28232807> >.

GERSHON, M. D. Serotonin and its implication for the management of irritable bowel syndrome. **Rev Gastroenterol Disord**, v. 3 Suppl 2, p. S25-34, 2003. ISSN 1533-001X (Print)
1533-001X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12776000> >.

GO, A. S. et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 127, n. 1, p. e6-e245, Jan 01 2013. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239837> >.

GONZALEZ-FRANQUESA, A.; PATTI, M. E. Insulin Resistance and Mitochondrial Dysfunction. **Adv Exp Med Biol**, v. 982, p. 465-520, 2017. ISSN 0065-2598 (Print)
0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28551803> >.

GRANDI, A. M. et al. Influence of age and sex on left ventricular anatomy and function in normals. **Cardiology**, v. 81, n. 1, p. 8-13, 1992. ISSN 0008-6312 (Print)
0008-6312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1477859> >.

GRUBER, C. J. et al. Production and actions of estrogens. **N Engl J Med**, v. 346, n. 5, p. 340-52, Jan 31 2002. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821512> >.

GUNTER, T. E. et al. Calcium and mitochondria. **FEBS Lett**, v. 567, n. 1, p. 96-102, Jun 01 2004. ISSN 0014-5793 (Print)
0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15165900> >.

GUNTHER, T. et al. Targeting multiple opioid receptors - improved analgesics with reduced side effects? **Br J Pharmacol**, Apr 05 2017. ISSN 1476-5381 (Electronic) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28378462> >.

GUSTAFSSON, B. I. et al. Long-term serotonin administration induces heart valve disease in rats. **Circulation**, v. 111, n. 12, p. 1517-22, Mar 29 2005. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781732> >.

GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. **Free Radic Res Commun**, v. 19, n. 3, p. 141-58, 1993. ISSN 8755-0199 (Print) 8755-0199 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8244084> >.

HALFORD, J. C.; BLUNDELL, J. E. The 5-HT_{1B} receptor agonist CP-94,253 reduces food intake and preserves the behavioural satiety sequence. **Physiol Behav**, v. 60, n. 3, p. 933-9, Sep 1996. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8873272> >.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Lett**, v. 281, n. 1-2, p. 9-19, Apr 09 1991. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1849843> >.

HANDY, D. E.; LOSCALZO, J. Redox regulation of mitochondrial function. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, n. 11, p. 1323-67, Jun 01 2012. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22146081> >.

HAUSO, O. et al. Long-term serotonin effects in the rat are prevented by terguride. **Regul Pept**, v. 143, n. 1-3, p. 39-46, Oct 04 2007. ISSN 0167-0115 (Print) 0167-0115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17391782> >.

HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 71, n. 4, p. 533-54, Apr 2002. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11888546> >.

HROUDOVA, J.; FISAR, Z. In vitro inhibition of mitochondrial respiratory rate by antidepressants. **Toxicol Lett**, v. 213, n. 3, p. 345-52, Sep 18 2012. ISSN 1879-3169 (Electronic) 0378-4274 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842584> >.

HUYBRECHTS, K. F.; PALMSTEN, K.; AVORN, J. Antidepressant use in pregnancy and the risk of cardiac defects. **N Engl J Med**, v. 370, n. 12, p. 2397-2407, June 19, 2014 2014. Disponível em: < <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1312828#t=article> >.

IEDA, M. Heart Development, Diseases, and Regeneration- New Approaches From Innervation, Fibroblasts, and Reprogramming. **Circ J**, v. 80, n. 10, p. 2081-8, Sep 23 2016. ISSN 1347-4820 (Electronic) 1346-9843 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27599529> >.

JENKINS, T. A. et al. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. **Nutrients**, v. 8, n. 1, Jan 20 2016. ISSN 2072-6643 (Electronic)

2072-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26805875> >.

JEZEK, P.; HLAVATA, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 12, p. 2478-503, Dec 2005. ISSN 1357-2725 (Print)

1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103002> >.

KAJSTURA, J. et al. Myocyte turnover in the aging human heart. **Circ Res**, v. 107, n. 11, p. 1374-86, Nov 26 2010. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21088285> >.

KALIN, M. F.; ZUMOFF, B. Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. **Steroids**, v. 55, n. 8, p. 330-52, Aug 1990. ISSN 0039-128X (Print)

0039-128X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2237942> >.

KALUDERCIC, N. et al. Monoamine oxidase B prompts mitochondrial and cardiac dysfunction in pressure overloaded hearts. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 2, p. 267-80, Jan 10 2014. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23581564> >.

KANG, J.; PERVAIZ, S. Mitochondria: redox metabolism and dysfunction. **Biochem Res Int**, v. 2012, p. 896751, 2012. ISSN 2090-2255 (Electronic). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593827> >.

KHALIQ, S. et al. Relationship of brain tryptophan and serotonin in improving cognitive performance in rats. **Pak J Pharm Sci**, v. 19, n. 1, p. 11-5, Jan 2006. ISSN 1011-601X (Print)

1011-601X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632446> >.

KIKUCHI, K.; POSS, K. D. Cardiac regenerative capacity and mechanisms. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 28, p. 719-41, 2012. ISSN 1530-8995 (Electronic)

1081-0706 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23057748> >.

KIM, C. et al. Risk of Incident Coronary Heart Disease Events in Men Compared to Women by Menopause Type and Race. **J Am Heart Assoc**, v. 4, n. 7, Jul 01 2015. ISSN 2047-9980 (Electronic)

2047-9980 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26133958> >.

KNOWLTON, A. A.; KORZICK, D. H. Estrogen and the female heart. **Mol Cell Endocrinol**, v. 389, n. 1-2, p. 31-9, May 25 2014. ISSN 1872-8057 (Electronic)

0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462775> >.

KOOPMAN, W. J. et al. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. **Antioxid Redox Signal**, v. 12, n. 12, p. 1431-70, Jun 15 2010. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19803744> >.

- KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett**, v. 495, n. 1-2, p. 12-5, Apr 20 2001. ISSN 0014-5793 (Print)
0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11322939> >.
- KRIEGEBAUM, C. et al. [Serotonin now: Part 1. Neurobiology and developmental genetics]. **Fortschr Neurol Psychiatr**, v. 78, n. 6, p. 319-31, Jun 2010. ISSN 1439-3522 (Electronic)
0720-4299 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20340067> >.
- KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, Oct 16 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18923511> >.
- LAGRANHA, C. J. et al. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. **Circ Res**, v. 106, n. 11, p. 1681-91, Jun 11 2010. ISSN 1524-4571 (Electronic)
0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413785> >.
- LAM, D. D. et al. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 97, n. 1, p. 84-91, Nov 2010. ISSN 1873-5177 (Electronic)
0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20837046> >.
- LEINWAND, L. A. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. **J Clin Invest**, v. 112, n. 3, p. 302-7, Aug 2003. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897194> >.
- LEON-PONTE, M.; AHERN, G. P.; O'CONNELL, P. J. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. **Blood**, v. 109, n. 8, p. 3139-46, Apr 15 2007. ISSN 0006-4971 (Print)
0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158224> >.
- LI, F. et al. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. **J Mol Cell Cardiol**, v. 28, n. 8, p. 1737-46, Aug 1996. ISSN 0022-2828 (Print)
0022-2828 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8877783> >.
- LI, M. et al. Thyroid hormone action in postnatal heart development. **Stem Cell Res**, v. 13, n. 3 Pt B, p. 582-91, Nov 2014. ISSN 1876-7753 (Electronic)
1873-5061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25087894> >.
- LI, Y. et al. Mitochondrial dysfunction induced by sertraline, an antidepressant agent. **Toxicol Sci**, v. 127, n. 2, p. 582-91, Jun 2012. ISSN 1096-0929 (Electronic)
1096-0929 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22387747> >.
- LINDER, A. E. et al. Serotonin receptors in rat jugular vein: presence and involvement in the contraction. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 334, n. 1, p. 116-23, Jul 2010. ISSN 1521-0103 (Electronic)
0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20378714> >.

- LOPEZ-MUNOZ, F.; ALAMO, C. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 14, p. 1563-86, 2009. ISSN 1873-4286 (Electronic) 1381-6128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442174> >.
- LUCAS-HERALD, A. K. et al. Genomic and non-genomic effects of androgens in the cardiovascular system: clinical implications. **Clin Sci (Lond)**, v. 131, n. 13, p. 1405-1418, Jul 1 2017. ISSN 1470-8736 (Electronic) 0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28645930> >.
- MANNER, J. Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. **Anat Rec**, v. 259, n. 3, p. 248-62, Jul 01 2000. ISSN 0003-276X (Print) 0003-276X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861359> >.
- MARTEL, F. Recent advances on the importance of the serotonin transporter SERT in the rat intestine. **Pharmacol Res**, v. 54, n. 2, p. 73-6, Aug 2006. ISSN 1043-6618 (Print) 1043-6618 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16750380> >.
- MASAND, P. S.; GUPTA, S. Selective serotonin-reuptake inhibitors: an update. **Harv Rev Psychiatry**, v. 7, n. 2, p. 69-84, Jul-Aug 1999. ISSN 1067-3229 (Print) 1067-3229 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471245> >.
- MATOTT, M. P.; KLINE, D. D. Activation of 5-hydroxytryptamine 7 receptors within the rat nucleus tractus solitarius modulates synaptic properties. **Brain Res**, v. 1635, p. 12-26, Mar 15 2016. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26779891> >.
- MCCORMACK, J. G.; DENTON, R. M. Mitochondrial Ca²⁺ transport and the role of intramitochondrial Ca²⁺ in the regulation of energy metabolism. **Dev Neurosci**, v. 15, n. 3-5, p. 165-73, 1993. ISSN 0378-5866 (Print) 0378-5866 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7805568> >.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu Rev Biochem**, v. 52, p. 711-60, 1983. ISSN 0066-4154 (Print) 0066-4154 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6137189> >.
- MESCHIN, P. et al. p11 modulates calcium handling through 5-HT(4)R pathway in rat ventricular cardiomyocytes. **Cell Calcium**, v. 58, n. 6, p. 549-57, Dec 2015. ISSN 1532-1991 (Electronic) 0143-4160 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26427584> >.
- MEYER, M. R.; BARTON, M. Estrogens and Coronary Artery Disease: New Clinical Perspectives. **Adv Pharmacol**, v. 77, p. 307-60, 2016. ISSN 1557-8925 (Electronic) 1054-3589 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27451102> >.
- MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v. 41, n. 3, p. 445-502, Aug 1966. ISSN 1464-7931 (Print) 0006-3231 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5329743> >.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n. 4, p. 471-83, Jun 2002. ISSN 0149-7634 (Print)
0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204193> >.

MUTO, T. et al. Protective effects of fluvoxamine against ischemia/reperfusion injury in isolated, perfused guinea-pig hearts. **Biol Pharm Bull**, v. 37, n. 5, p. 731-9, 2014. ISSN 1347-5215 (Electronic)
0918-6158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789996> >.

NAKAMARU-OGISO, E. et al. Novel biochemical manipulation of brain serotonin reveals a role of serotonin in the circadian rhythm of sleep-wake cycles. **Eur J Neurosci**, v. 35, n. 11, p. 1762-70, Jun 2012. ISSN 1460-9568 (Electronic)
0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22625848> >.

NASCIMENTO, L. et al. The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 39, n. 8, p. 880-7, Aug 2014. ISSN 1715-5320 (Electronic)
1715-5312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905448> >.

NEBIGIL, C. G. et al. Serotonin is a novel survival factor of cardiomyocytes: mitochondria as a target of 5-HT_{2B} receptor signaling. **FASEB J**, v. 17, n. 10, p. 1373-5, Jul 2003. ISSN 1530-6860 (Electronic)
0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738797> >.

NEBIGIL, C. G. et al. Overexpression of the serotonin 5-HT_{2B} receptor in heart leads to abnormal mitochondrial function and cardiac hypertrophy. **Circulation**, v. 107, n. 25, p. 3223-9, Jul 01 2003. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810613> >.

NEBIGIL, C. G.; MAROTEAUX, L. Functional consequence of serotonin/5-HT_{2B} receptor signaling in heart: role of mitochondria in transition between hypertrophy and heart failure? **Circulation**, v. 108, n. 7, p. 902-8, Aug 19 2003. ISSN 1524-4539 (Electronic)
0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925446> >.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5^a ed. New York: 2008. 1158p ISBN 071677108X.

NEMBHARD, W. N. et al. Maternal and infant genetic variants, maternal periconceptional use of selective serotonin reuptake inhibitors, and risk of congenital heart defects in offspring: population based study. **British Medical Journal**, v. 356, p. j832, 2017. Disponível em: < <http://www.bmj.com/content/356/bmj.j832.long> >.

NONACS, R.; COHEN, L. S. Assessment and treatment of depression during pregnancy: an update. **Psychiatr Clin North Am**, v. 26, n. 3, p. 547-62, Sep 2003. ISSN 0193-953X (Print)
0193-953X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563097> >.

OH, C. M.; PARK, S.; KIM, H. Serotonin as a New Therapeutic Target for Diabetes Mellitus and Obesity. **Diabetes Metab J**, v. 40, n. 2, p. 89-98, Apr 2016. ISSN 2233-6079 (Print)
2233-6079 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27126880> >.

ONG, S. B.; HAUSENLOY, D. J. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. **Cardiovasc Res**, v. 88, n. 1, p. 16-29, Oct 01 2010. ISSN 1755-3245 (Electronic) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631158> >.

PEREZ-CABALLERO, L. et al. Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. **Expert Opin Drug Discov**, v. 9, n. 5, p. 567-78, May 2014. ISSN 1746-045X (Electronic) 1746-0441 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24738878> >.

POON, C. C. et al. Mitochondrial monoamine oxidase-A-mediated hydrogen peroxide generation enhances 5-hydroxytryptamine-induced contraction of rat basilar artery. **Br J Pharmacol**, v. 161, n. 5, p. 1086-98, Nov 2010. ISSN 1476-5381 (Electronic) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20977458> >.

PRATELLI, M. et al. Perturbation of Serotonin Homeostasis during Adulthood Affects Serotonergic Neuronal Circuitry. **eNeuro**, v. 4, n. 2, Mar-Apr 2017. ISSN 2373-2822 (Electronic) 2373-2822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28413824> >.

QUINTANILLA, R. A. et al. Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease. **Mol Neurodegener**, v. 8, p. 45, Dec 11 2013. ISSN 1750-1326 (Electronic) 1750-1326 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24330821> >.

RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A.; PAGE, I. H. Crystalline Serotonin. **Science**, v. 108, n. 2804, p. 329-30, Sep 24 1948a. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17748034> >.

_____. Serum vasoconstrictor, serotonin; chemical inactivation. **J Biol Chem**, v. 176, n. 3, p. 1237-41, Dec 1948b. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18098575> >.

RECKELHOFF, J. F. Gender differences in the regulation of blood pressure. **Hypertension**, v. 37, n. 5, p. 1199-208, May 2001. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358929> >.

RENSON, J.; WEISSBACH, H.; UDENFRIEND, S. Hydroxylation of tryptophan by phenylalanine hydroxylase. **J Biol Chem**, v. 237, p. 2261-4, Jul 1962. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14491501> >.

RUBATTU, S.; STANZIONE, R.; VOLPE, M. Mitochondrial Dysfunction Contributes to Hypertensive Target Organ Damage: Lessons from an Animal Model of Human Disease. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1067801, 2016. ISSN 1942-0994 (Electronic) 1942-0994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27594970> >.

SANTIN, Y. et al. Oxidative Stress by Monoamine Oxidase-A Impairs Transcription Factor EB Activation and Autophagosome Clearance, Leading to Cardiomyocyte Necrosis and Heart

Failure. **Antioxid Redox Signal**, v. 25, n. 1, p. 10-27, Jul 01 2016. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26959532> >.

SANTO-DOMINGO, J.; WIEDERKEHR, A.; DE MARCHI, U. Modulation of the matrix redox signaling by mitochondrial Ca(2+). **World J Biol Chem**, v. 6, n. 4, p. 310-23, Nov 26 2015. ISSN 1949-8454 (Print)

1949-8454 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26629314> >.

SBROGGIO, M. et al. ERK1/2 activation in heart is controlled by melusin, focal adhesion kinase and the scaffold protein IQGAP1. **J Cell Sci**, v. 124, n. Pt 20, p. 3515-24, Oct 15 2011. ISSN 1477-9137 (Electronic)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22010199> >.

SELIM, A. M. et al. Plasma Serotonin in Heart Failure: Possible Marker and Potential Treatment Target. **Heart Lung Circ**, v. 26, n. 5, p. 442-449, May 2017. ISSN 1444-2892 (Electronic)

1443-9506 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27746058> >.

SIES, H. Role of reactive oxygen species in biological processes. **Klin Wochenschr**, v. 69, n. 21-23, p. 965-8, Dec 15 1991. ISSN 0023-2173 (Print)

0023-2173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1798292> >.

SILVERBERG, G. D. et al. Time course of serotonin-induced vasoconstriction.

Neurosurgery, v. 4, n. 6, p. 539-42, Jun 1979. ISSN 0148-396X (Print)

0148-396X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/481715> >.

SKULACHEV, V. P. Membrane electricity as a convertible energy currency for the cell. **Can J Biochem**, v. 58, n. 3, p. 161-75, Mar 1980. ISSN 0008-4018 (Print)

0008-4018 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6245772> >.

SMITH, O. A. Reflex and central mechanisms involved in the control of the heart and circulation. **Annu Rev Physiol**, v. 36, p. 93-123, 1974. ISSN 1545-1585 (Electronic)

0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400657> >.

SOUZA, M. E. et al. Effect of fluoxetine on rat liver mitochondria. **Biochem Pharmacol**, v. 48, n. 3, p. 535-41, Aug 03 1994. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8068040> >.

SULLIVAN, T. R., JR. et al. Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model. **J Clin Invest**, v. 96, n. 5, p. 2482-8, Nov 1995. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7593638> >.

TAHSILI-FAHADAN, P.; GEOCADIN, R. G. Heart-Brain Axis: Effects of Neurologic Injury on Cardiovascular Function. **Circ Res**, v. 120, n. 3, p. 559-572, Feb 03 2017. ISSN 1524-4571 (Electronic)

0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28154104> >.

- TIRADENTES, R. V. et al. Effects of acute administration of selective serotonin reuptake inhibitors on sympathetic nerve activity. **Braz J Med Biol Res**, v. 47, n. 7, p. 554-9, Jul 2014. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25003632> >.
- UDHAYABANU, T. et al. Riboflavin Responsive Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. **J Clin Med**, v. 6, n. 5, May 05 2017. ISSN 2077-0383 (Print) 2077-0383 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28475111> >.
- UNSOLD, B. et al. Melusin protects from cardiac rupture and improves functional remodelling after myocardial infarction. **Cardiovasc Res**, v. 101, n. 1, p. 97-107, Jan 01 2014. ISSN 1755-3245 (Electronic) 0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130190> >.
- UYGUR, A.; LEE, R. T. Mechanisms of Cardiac Regeneration. **Dev Cell**, v. 36, n. 4, p. 362-74, Feb 22 2016. ISSN 1878-1551 (Electronic) 1534-5807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26906733> >.
- VANTREASE, J. E. et al. 5-HT_{1A} receptors of the nucleus tractus solitarius facilitate sympathetic recovery following hypotensive hemorrhage in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 309, n. 2, p. H335-44, Jul 15 2015. ISSN 1522-1539 (Electronic) 0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25980022> >.
- VENTURA-CLAPIER, R. et al. Bioenergetics of the failing heart. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 7, p. 1360-72, Jul 2011. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20869993> >.
- VERCESI, A. E. et al. Ca²⁺-dependent NAD(P)⁺-induced alterations of rat liver and hepatoma mitochondrial membrane permeability. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 154, n. 3, p. 934-41, Aug 15 1988. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3136771> >.
- VILLENEUVE, C. et al. p53-PGC-1 α pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 1, p. 5-18, Jan 01 2013. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22738191> >.
- VITE, A.; LI, J.; RADICE, G. L. New functions for alpha-catenins in health and disease: from cancer to heart regeneration. **Cell Tissue Res**, v. 360, n. 3, p. 773-83, Jun 2015. ISSN 1432-0878 (Electronic) 0302-766X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25673211> >.
- WALTHER, D. J.; BADER, M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. **Biochem Pharmacol**, v. 66, n. 9, p. 1673-80, Nov 01 2003. ISSN 0006-2952 (Print) 0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563478> >.
- WANG, Q. et al. 5-HTR₃ and 5-HTR₄ located on the mitochondrial membrane and functionally regulated mitochondrial functions. **Sci Rep**, v. 6, p. 37336, Nov 22 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic)

2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27874067> >.

WATTS, S. W. et al. Serotonin and blood pressure regulation. **Pharmacol Rev**, v. 64, n. 2, p. 359-88, Apr 2012. ISSN 1521-0081 (Electronic)
0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22407614> >.

WEBER, K. T. et al. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. **Nat Rev Cardiol**, v. 10, n. 1, p. 15-26, Jan 2013. ISSN 1759-5010 (Electronic)
1759-5002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23207731> >.

WEISSMAN, A. M. et al. Pooled analysis of antidepressant levels in lactating mothers, breast milk, and nursing infants. **Am J Psychiatry**, v. 161, n. 6, p. 1066-78, Jun 2004. ISSN 0002-953X (Print)
0002-953X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15169695> >.

WENG, R. et al. Metabolomics Approach Reveals Integrated Metabolic Network Associated with Serotonin Deficiency. **Sci Rep**, v. 5, p. 11864, Jul 08 2015. ISSN 2045-2322 (Electronic)
2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26154191> >.

WESTLUND, K. N. et al. Localization of distinct monoamine oxidase A and monoamine oxidase B cell populations in human brainstem. **Neuroscience**, v. 25, n. 2, p. 439-56, May 1988. ISSN 0306-4522 (Print)
0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3399053> >.

WHO. **Global Status Report on noncommunicable diseases 2014**. World Health Organization. Switzerland, p.1-302. 2014

WICHMAN, C. L. et al. Congenital heart disease associated with selective serotonin reuptake inhibitor use during pregnancy. **Mayo Clin Proc**, v. 84, n. 1, p. 23-7, 2009. ISSN 1942-5546 (Electronic)
0025-6196 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121250> >.

WONG, D. T. et al. A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. **Life Sci**, v. 15, n. 3, p. 471-9, Aug 01 1974. ISSN 0024-3205 (Print)
0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4549929> >.

YANG, S. G.; MLCEK, M.; KITTNAR, O. Estrogen can modulate menopausal women's heart rate variability. **Physiol Res**, v. 62 Suppl 1, p. S165-71, 2013. ISSN 1802-9973 (Electronic)
0862-8408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24329696> >.

YU, H. T. et al. Oxidative damage of mitochondrial respiratory chain in different organs of a rat model of diet-induced obesity. **Eur J Nutr**, Jun 01 2017. ISSN 1436-6215 (Electronic)
1436-6207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28573457> >.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiol Rev**, v. 94, n. 3, p. 909-50, Jul 2014. ISSN 1522-1210 (Electronic)
0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24987008> >.

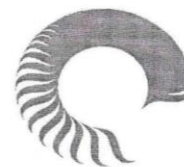
APÊNDICE A - ARTIGOS NÃO REFERENTES À DISSERTAÇÃO, PUBLICADOS NO PERÍODO DO MESTRADO

- ✓ Sousa SM, **Braz GR**, Freitas CM, Santana DF, Sellitti DF, Fernandes MP, Lagranha CJ. Oxidative injuries induced by maternal low-protein diet in female brainstem. *Nutritional Neuroscience*. **2017** DOI: 10.1080/1028415X.2017.1325974
- ✓ **Braz GR**, Emiliano AS, Sousa SM, Pedroza AA, Santana DF, Fernandes MP, da Silva AI, Lagranha CJ. Maternal low-protein diet in female rat heart: possible protective effect of estradiol. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 7:1-9; **2017**.
- ✓ Macêdo PF, de Melo JS, Costa LA, **Braz GR**, de Sousa SM, Lagranha CJ, Hornsby MB. Fish oil and treadmill exercise have age-dependent effects on episodic memory and oxidative state of the hippocampus. *Appl Physiol Nutr Metab*, 42:1-10, **2017**;
- ✓ Ferreira, DJ; Da Silva Pedroza, AA; **Braz, GR**; Da Silva Filho, RC; Lima, TA; Fernandes, MP; Doi, SQ; Lagranha, CJ. Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response to maternal protein restriction. *Brain Res*, 1642:553-61, **2016**;
- ✓ **Braz, GR**; Ferreira, DS; Pedroza, AA; Da Silva, AI; Sousa, SM; Pithon-Curi, TC; Lagranha, C. Effect of moderate exercise on peritoneal neutrophils from juvenile rats. *Appl Physiol Nutr Metab*, 40(9):959-62, **2015**;
- ✓ Da Silva Pedroza, AA; Lopes, A.; Mendes da Silva, RF.; **Braz, GR**; Nascimento, LP; Ferreira, DS; Dos Santos, ÂA.; Batista-de-Oliveira-Hornsby, M; Lagranha, CJ. Can fish oil supplementation and physical training improve oxidative metabolism in aged rat hearts? *Life Sciences*, 137:133-41, **2015**;
- ✓ Da Silva, AI; **Braz, GR**; Pedroza, AA; Nascimento, L; Freitas, CM; Ferreira, DJ; Manhães de Castro, R; Lagranha, CJ. Fluoxetine induces lean phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1 expression. *J Bioenerg Biomemb*, 47(4):309-18, **2015**.

ANEXO A - COMITÊ 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, 02 de maio de 2012.

Ofício nº 434/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Raul Manhães de Castro**
Departamento de Nutrição
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.015276/2012-56

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, **“INIBIÇÃO DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO: UM ESTUDO DO BALANÇO ENERGÉTICO E DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL”**.

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.

Origem dos animais: Departamento de Nutrição-UFPE;
Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: Machos e Fêmeas;
número de animais previsto no protocolo: 8 ratas lactantes e 64 filhotes;
Peso: Ratas 240-260g e filhotes 6-7g; Idade: Ratas adultas e seus filhotes.

Atenciosamente,


Prof. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA