



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO – POS NEURO – UFPE

TERCYA LÚCIDI DE ARAÚJO SILVA

**FLUOXETINA NEONATAL COMO MODULADOR POSITIVO DA
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL DE RATOS MACHOS:** será que a fluoxetina pode
mimetizar os efeitos dos estrógenos?

Recife

2018

TERCYA LÚCIDI DE ARAÚJO SILVA

**FLUOXETINA NEONATAL COMO MODULADOR POSITIVO DA
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL DE RATOS MACHOS:** será que a fluoxetina pode
mimetizar os efeitos dos estrógenos?

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

Área de concentração: Neurociências.

ORIENTADORA: Prof^(a). Dr^(a). Claudia Jacques Lagranha

CO-ORIENTADORA: Dr^(a). Aline Isabel da Silva

Recife

2018

Catálogo na Fonte

Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586f

Silva, Tercya Lúci de Araújo.

Fluoxetina neonatal como modulador positivo da bioenergética mitocondrial de ratos machos: será que a fluoxetina pode mimetizar os efeitos dos estrógenos? / Tercya Lúci de Araújo Silva. – 2018.

135 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Claudia Jacques Lagranha.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Fluoxetina. 2. Fosforilação oxidativa. 3. Proteína desacopladora 2. 4. Cérebro. I. Lagranha, Claudia Jacques (Orientadora). II. Título.

615.8 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2018-167)

TERCYA LÚCIDI DE ARAÚJO SILVA

**FLUOXETINA NEONATAL COMO MODULADOR POSITIVO DA
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL DE RATOS MACHOS:** será que a fluoxetina pode
mimetizar os efeitos dos estrógenos?

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

Aprovado em: 28 DE FEVEREIRO DE 2018.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. CLÁUDIA JACQUES LAGRANHA

Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. MARIANA PINHEIRO FERNANDES

Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. SANDRA LOPES DE SOUSA

Universidade Federal da Pernambuco (UFPE).

Dr. DIORGINIS JOSE SOARES FERREIRA

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF).

Dra.ISABELI LINS PINHEIRO

Universidade Federal de Pernambuco

À minha mãe, Lúcia Araújo, pela fé constante.

Aos meus irmãos Frederico Alexandre e Edjanyo Florêncio pelo companheirismo

As instituições do Coque CASINHA e NEIMFA, por mostrar-me o que é resiliência.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, Jesus Cristo, a espiritualidade e ao universo por apesar de guiar uma criatura tão teimosa, sempre a colocam em lugares de aprendizado e amor. Ao meu querido e eterno companheiro anjo da guarda, por me fortalecer, proteger e caminhar sempre ao meu lado.

À MINHA AMADA MÃE, por ser meu exemplo de coragem, perseverança e fé, na doença ou na saúde, por sempre acreditar em mim e apoiar os meus mais loucos sonhos na construção do meu saber. Por me ensinar, com seu próprio exemplo, que a gente sempre pode cair, mas nunca desistir.

Ao MEU AMADO irmão Fred, por sempre mostrar o lado bom e belo da vida e das pessoas, pela paciência em momentos tensos e tristes, pelas risadas nos momentos felizes. Pela emoção de caminhar ao teu lado na vida e saber que nos melhores e piores momentos eu terei sempre uma pessoa que conseguirá me amar, mesmo com todos os meus defeitos. A você meu irmão, companheiro, amigo, pai, crítico e fã, meus agradecimentos eternos!!

Ao meu irmão Edjanyo, pelas risadas quando observamos o quanto somos parecidos pelo aprendizado da vida. Sempre agradecerei a Deus por nos dar você de presente, aprendo muito com você, mas o primeiro aprendizado como irmã mais velha, foi a amar uma criança. Amo você meu irmão!

A todos os meus familiares, que mesmo não entendendo o afastamento pela escolha de aumentar o aprendizado, apoiaram ou respeitaram minhas decisões. Obrigada família!

Aos amigos construídos nesse novo e nosso mundo chamado Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Tanto no campus Recife, quanto no campus de Vitória de Santo Antão. Meu muito obrigado a todos que me ajudaram, me socorreram, me escutaram e que me ensinaram em momentos difíceis. Aos amigos que sorriram, brincaram, e que a gente se divertiu com nossas tentativas de elucidar nossas ignorâncias. Não citarei nomes com medo de esquecer alguém.

A minha mais nova família do Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício (LABMEX), digo família porque convivemos tanto que nos tornamos família, com todos nossos defeitos e complicações. A família LABMEX, muito obrigada!! A professora Mariana pelo carinho, conhecimento, amizade e respeito demonstrado. A professora Sandra Lopes, um ponto de carinho e amor da UFPE. Professora Sandra obrigada pelo apoio, conversas, conhecimento e tranquilidade passados com tanto carinho!! Aos meus irmãos mais próximos desta família (Rudá e Cassia) não tenho como agradecer a vocês dois por tanto apoio, amizade e explicações, kkkkkkk!

Aos amigos irmãos que construí, representados aqui por (David, Diorginis, Olávio, Tais, Deizi, Belisa, Sávio, Reginaldo, Concita, Wellington e muitos mais) obrigada pela troca de amor constante!

A minha Co-orientadora Aline por me receber e permitir que eu utilizasse seus pensamentos para desenvolver pesquisas. Principalmente obrigada por nos presentear com Breno, nosso mascote!!

A minha querida, respeitada, admirada e brava orientadora CLAUDIA JACQUES LAGRANHA! Ah professora como eu gosto da senhora! Obrigada por ABSOLUTAMENTE TUUUDOOO que a senhora fez e faz por mim! A senhora renovou em mim a vontade de ser professora novamente. Demonstrou que uma pessoa pode ser inteligente, exigente, correta e humana ao mesmo tempo. No momento em que eu só tinha fé e vontade de trabalhar a senhora me sacudiu, me reergueu e me colocou no verdadeiro caminho da ciência, me deu oportunidades de aprendizado únicas. Com seu jeito bravo e exigente de ser me mostrou que é palpável pesquisar, conhecer outras realidades no mundo e acima de tudo, que se pode sim fazer com que as pessoas evoluam em seus conhecimentos, pois cada um tem o seu, sem precisar humilhar nem destruir ninguém. Eu não tenho como lhe agradecer as oportunidades de evolução de aprendizado secular e de vida. MUITO OBRIGADA, ILUMINADA!!!

A todos os funcionários concursados e contratados do Centro acadêmico de Vitória e dos departamentos do Campus Recife por toda paciência e por fazer com que a logística dos nossos experimentos acontecesse.

Agradeço a todos os ratos que deram suas vidas para fazer com que a pesquisa aconteça neste país, a todos vocês queridos nosso muito obrigado.

A tudo que eu vivi neste doutorado eu só consigo agradecer em apenas duas páginas, kkkkkkkkkkkkkkkkk.

“Quando nos abrimos para a vida, a vida nos responde com bênçãos, imediatamente”.
(OLIVEIRA; WANDERLEY, 2015, p.29)

RESUMO

A disfunção nas mitocôndrias pode acarretar em distúrbios neuronais em diversas regiões, como por exemplo, no tronco encefálico; área importante pelo controle das funções cardiorrespiratórias e pela produção de serotonina no encéfalo. Dessa forma, alterações nessa área podem vir a induzir o aparecimento de diversas doenças, entre elas as cardiovasculares. Já é sabido que em fêmeas durante o período reprodutivo, o estrogênio, exerce ação protetora devido ao combate contra o estresse oxidativo exercida por esses hormônios. Alguns dados na literatura apontam que antidepressivos, como por exemplo, os inibidores de recaptação de serotonina (ISRS), podem acarretar prejuízos permanentes em componentes cerebrais, por aumentar o estresse oxidativo, podendo causar hipertensão e problemas cardiovasculares. Contudo, existe ainda discordância em relação aos efeitos dos ISRS quando utilizado no período neonatal, sobre a bioenergética mitocondrial no tronco encefálico de machos e fêmeas. Portanto, para o presente estudo, propomos e avaliamos em ratos Wistar, machos e fêmeas, aos 60 dias de vida, os efeitos da inibição da recaptação de serotonina, utilizando o fármaco fluoxetina (10 mg / Kg P.C., por via subcutânea), durante a lactação sobre a bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo no tronco encefálico. Foram avaliados os seguintes dados: peso corporal, consumo de oxigênio mitocondrial, capacidade de retenção de cálcio, produção de espécies reativas (ER), peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutatona-S-transferase, citrato sintase, estado REDOX e expressão gênica da proteína desacopladora (UCP) 2. Nas fêmeas (F) observamos menor peso corporal que os machos (M), tratados com fluoxetina (Fx) (M-Fx: 193,6±15,5g vs. F-Fx: 160,4±2,2g, $p < 0,0001$). Os M-Fx apresentaram maior resultado na razão de controle respiratório (RCR) (M Ct: 3,4±0,8 vs. M Fx: 9,3±1,0, $p < 0,01$; F-Ct: 6,0±0,7 vs F-Fx: 8,5±1,0). A produção de ER de oxigênio reduziu em M-Fx (M-Ct: 15,8±2,4 vs. M-Fx: 6,0±1,0 AUC, $p < 0,01$), porém essa redução se apresentou mais acentuada em fêmeas controle (F-Ct) (M-Ct: 15,8±2,4 vs. F-Ct: 8,1±1,0 AUC, $p < 0,05$). A citrato sintase aumentou 25% no grupo Fx (Ct: 10,0±0,6 vs Fx: 12,5±0,76 U/mg prot, $p < 0,05$). A expressão de UCP-2 aumentou em ambos os sexos, sendo mais expressiva em fêmeas (M-Ct: 1,0±0,4 vs M-Fx: 3,5±0,4, $p < 0,01$; F-Ct: 1,9±0,4 vs F-Fx: 9,3±0,1, $p < 0,01$). Os resultados mostram que a fluoxetina na lactação modula a bioenergética mitocondrial e o balanço oxidativo de uma maneira sexo dependente. Entretanto, apesar de observarmos uma melhora na bioenergética mitocondrial em machos tratados com fluoxetina, no balanço oxidativo as fêmeas avaliadas apresentaram melhor resultados devido a proteção do estrogênio.

Palavras-chave: Fluoxetina. Fosforilação oxidativa. Proteína desacopladora 2. Cérebro.

ABSTRACT

Mitochondrial dysfunction can lead to neuronal disruption in several regions, such as in the brainstem. Brainstem is an important area for the cardiorespiratory functions and the production of serotonin in the brain. In this sense, alterations in this area may lead to the induction of several diseases, such as cardiovascular. It is already known that females in the reproductive period, estrogens may exert protective action due to the fight against the oxidative stress. Some data in the literature indicate that antidepressants, such as serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), can promote permanent damage to brain components, by increasing oxidative stress, and may lead hypertension and cardiovascular problems. However, there is still disagreement regarding the effects of SSRIs when applied in the neonatal period, on mitochondrial bioenergetics and oxidative balance in the brainstem of males and females. Therefore, for the present study, we propose to evaluate in 60-day-old male and female Wistar rats the effects of inhibition of serotonin reuptake using the drug fluoxetine (10 mg / kg PC subcutaneously) during lactation on mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in the brainstem. The following data were evaluated: body weight, mitochondrial oxygen consumption, calcium retention capacity, reactive species (RS) production, lipid peroxidation, protein oxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathione-S-transferase and citrate synthase activity, REDOX status and UCP2 gene expression. In females (F), we observed lower body weight than males (M) treated with fluoxetine (Fx) (M-Fx: $193.6 \pm 15.5\text{g}$ vs. F-Fx: $160.4 \pm 2.2\text{g}$, $p < 0.0001$). The M-Fx presented higher results in the respiratory control ratio (RCR) M Ct: 3.4 ± 0.8 Vs. M Fx: 9.3 ± 1.0 , $p < 0.01$; F-Ct: 6.0 ± 0.7 vs. F-Fx: 8.5 ± 1.0 . The production of reactive oxygen species decreased in M-Fx (M-Ct: 15.8 ± 2.4 vs. M-Fx: 6.0 ± 1.0 AUC, $p < 0.01$), but the reduction was more accentuated in F-Ct. (M-Ct: 15.8 ± 2.4 vs. F-Ct: 8.1 ± 1.0 AUC, $p < 0.05$). Citrate synthase increased 25% in the Fx group (Ct: 10.0 ± 0.6 vs Fx: 12.5 ± 0.76 U / MG prot, $p < 0.05$). The expression of UCP-2 increased in both sexes, (M-Ct: 1.0 ± 0.4 vs M-Fx: 3.5 ± 0.4 , $p < 0.01$; F-Ct: 1.9 ± 0.4 vs F-Fx: 9.3 ± 0.1 , $p < 0.01$). The results show that fluoxetine during lactation modulates mitochondrial bioenergetics in a sex dependent manner. Although we observed an improvement in mitochondrial bioenergetics in males treated with fluoxetine, the effect in oxidative balance wasn't as potent as estrogens in females in the evaluated age.

Keywords: Fluoxetine. Oxidative phosphorylation. Uncoupling protein 2. Cerebrum.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Dissertação

Figura 1-	Desenvolvimento embrionário do sistema nervoso central.....	21
Figura 2-	Esquema da formação anatômica do tronco encefálico.....	21
Figura 3-	Divisão anatômica e lâminas do tronco encefálico.....	23
Figura 4-	Principais estruturas e divisões do bulbo.....	26
Figura 5-	Distribuição e localização dos núcleos da rafe no tronco encefálico.....	32
Figura 6-	Captação de L-triptofano e síntese de serotonina no sistema nervoso central.....	36
Figura 7-	Síntese de serotonina.....	36

Artigo 1

Figura 1-	Body weigh.....	106
Figura 2-	Mitochondrial oxigen consumption.....	106
Figura 3-	Mitochondrial function.....	107
Figura 4-	Mitochondrial swelling.....	108
Figura 5-	Oxidative stress biomarkers.....	108
Figura 6-	Antioxidant defenses.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Receptores serotoninérgicos e suas subdivisões.....	37
Tabela 2-	<i>Primers</i> usados para as análises de RT-PCR.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indoleacético.
5-HT	Serotonina ou 5-hidroxitriptamina.
5-HTP	5-hidroxitriptofano.
5-HTT ou SERT	Transportadores de Serotonina.
6-OHDA	6-hidroxidopamina.
8-OH-DPAT	Agonista do receptor 5-HT _{1A} .
ADTs	Antidepressivos tricíclicos.
AD	Doença de Alzheimer.
AICAR	5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide.
AMPK 5'	AMP-ativada proteína quinase.
AT1	Receptores de angiotensina II.
ATP	Trifosfato de adenosina.
A- β -25-35	Beta amilóide 25-35.
CAT	Catalase.
CAV	Centro Acadêmico de Vitória.
COBEA	Colégio brasileiro experimentação animal.
CS	Citrato sintase.
DNPH	2,4-dinitrophenil-hyrazina.
E1	Estrona.
E2	17- β -estradiol.
E3	Estriol.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
EPM	Erro padrão da média.
ER	Receptores de estrogênio nuclear.
ERN	Espécies reativas de nitrogênio.
ERO	Espécies reativas de oxigênio.
ERS	Estimulantes de recaptura de 5HT.
FSH	Hormônio folículo-estimulante.
GABA	Ácido gama aminobutírico.
GSH	Glutationa Reduzida.

GSH/GSSG	Glutathione Reduzida dividida pela Glutathione Oxidada.
GSSG	Glutathione Oxidada.
GST	Glutathione S-transferase.
H ₂ DCF-DA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio.
IA	Corrente transitória de potássio externa.
IMAO	Inibidores de monoaminooxidase.
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida.
ISRA	Inibidores de recaptação de 5HT e antagonistas ALFA-2.
ISRD	Inibidores seletivos de recaptação de dopamina.
ISRN	Inibidores seletivos de recaptação de noradrenalina.
ISRS	Inibidores seletivos de recaptação de serotonina.
ISRSN	Inibidores seletivos de recaptura de 5HT e noradrenalina.
KCl	Cloreto de Potássio.
LABMEX	Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício.
LH	Hormônio luteinizante.
L-NAME	N-nitro-L-arginina metilester.
LPS	Lipopolisacarídeos.
MAO	Monoamina Oxidase.
MAO-A	Monoamina A.
MAO-B	Monoamina B.
NaCl	Cloreto de Sódio.
NC	Nervos Cranianos.
NCBI	National Center for Biotechnology Information.
NEM	N-ethylmaleimida.
NO	Óxido nítrico.
NOS	Óxido nítrico sintase.
OPT	O-Phthaldialdehyde.
OVX	Ovariectomia.
REM	Rapid Eye Movement.
ROS	Espécies reativas de oxigênio.
RVLM	Medula rostral ventrolateral.
SAP	Pressão arterial sistólica.

Sc	Subcutânea.
SNA	Sistema Nervoso Autônomo.
SNC	Sistema Nervoso Central.
SNP	Sistema Nervoso Periférico.
SNS	Sistema Nervoso Segmentar.
SNSM	Sistema nervoso voluntário ou somático motor.
SOD	Superóxido dismutase.
SRY	Cromossomo Y.
TBARS	Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico.
TNB	2- ácido nitrobenzóico.
TPH	Triptofano hidroxilase.
TPM	Transição de permeabilidade da membrana mitocondrial.
TRH	Terapia de reposição hormonal a longo prazo.
TRP	Triptofano.
UCP-2	Uncoupling protein 2.
WAY100635	Antagonista do receptor 5-HT1A.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	EMBRIOLOGIA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	20
2.2	ANATOMIA DO TRONCO ENCEFÁLICO.....	22
2.2.1	Bulbo.....	24
2.2.2	Ponte.....	26
2.2.3	Mesencéfalo.....	28
3	NÚCLEOS DA RAFE DO TRONCO ENCEFÁLICO.....	31
4	SEROTONINA.....	35
4.1	METABOLIZAÇÃO DE SEROTONINA.....	38
4.2	INIBIDORES SELETIVOS DE RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA.....	39
5	MITOCÔNDRIAS.....	43
6	ESTROGÊNIOS.....	46
7	HIPÓTESE.....	53
8	OBJETIVOS.....	54
8.1	OBJETIVO GERAL.....	54
8.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
9	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
9.1	ANIMAIS.....	55
9.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	55
9.3	TRATAMENTO.....	55
9.4	VIAS DE MANIPULAÇÃO.....	56
9.5	MEDIDA DE PESO CORPORAL.....	56
9.6	COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E PROCESSAMENTO PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	56
9.7	DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	56
9.8	MEDIDA DO CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL.....	56
9.9	PRODUÇÃO MITOCONDRIAL DE ESPÉCIES REATIVAS.....	57
9.10	CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DE CÁLCIO.....	57
9.11	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CITRATO SINTASE (CS).....	58
9.12	MEDIDA DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO.....	58

	TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	
9.13	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CARBONILAS.....	58
9.14	ATIVIDADE ENZIMÁTICA: SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	58
9.15	ATIVIDADE ENZIMÁTICA: CATALASE (CAT).....	59
9.16	ATIVIDADE ENZIMÁTICA: GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST). ..	59
9.17	ESTADO REDOX (GSH/GSSG).....	59
9.18	AVALIAÇÃO DE NÍVEIS DE TIÓIS TOTAIS.....	60
9.19	EXPRESSÃO DO mRNA DE GENES UCP2 VIA RT-PCR.....	60
9.20	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
10	RESULTADOS.....	62
10.1	SEROTONIN TRANSPORTER INIBITION DURING NEONATAL PERIOD INDUCES SEX-DEPENDENT EFFECTS ON MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS IN THE RAT BRAINSTEM.....	62
11	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110
	REFERÊNCIAS.....	111
APÊNDICE A-	ARTIGO DE REVISÃO ACEITO NA LIFE SCIENCE (QUALIS B1).....	124
ANEXO A-	CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO ORIGINAL ENVIADO PARA EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE (QUALIS A2).....	134
ANEXO B-	OFÍCIO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE / 2012.....	135

1 INTRODUÇÃO

O conceito de que estímulos ambientais influenciam um organismo em desenvolvimento tendo a capacidade de afetar seus perfis de desenvolvimento de curto e longo prazo é apoiado por um crescente corpo de evidências experimentais e clínicas. As doenças metabólicas agrupam as patologias que mais matam no mundo, dentre elas está a obesidade, diabetes tipo II e hipertensão.

O desenvolvimento do sistema nervoso durante os períodos pré e pós-natal é particularmente vulnerável ao excesso ou deficiência de mediadores químicos. A serotonina por surgir muito precocemente durante o desenvolvimento e por atuar na morfogênese de inúmeros órgãos e tecidos, assume papel determinante na regulação de numerosas funções fisiológicas, dentre elas a regulação da pressão arterial. Estudos a cerca da utilização de inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS) apresentam dados muito controversos, alguns sugerem que a utilização dos ISRS pode promover alterações morfológicas, funcionais e neuroquímicas em componentes cerebrais que poderá acarretar em prejuízos permanentes ao passo que, outros artigos sugerem que a utilização dos ISRS pode promover alterações, sem que as mesmas sejam prejudiciais. A fluoxetina é um fármaco amplamente comercializado para o tratamento de distúrbios neurológicos, tais como a depressão e ansiedade e age na fenda sináptica dos neurônios inibindo de forma seletiva o transportador responsável pela recaptção da serotonina e desta forma, aumentando a concentração na fenda sináptica desse neurotransmissor.

Alguns autores relacionam as concentrações de serotonina no sistema nervoso ao estresse oxidativo celular e mostram resultados bastante divergentes a depender do período de manipulação e do tecido avaliado. O estresse oxidativo tem sido relacionado à grande número de doenças, incluindo a hipertensão, indicando que as espécies reativas de oxigênio participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a formação e continuidade das alterações presentes nestes processos. O tronco encefálico se torna um tecido muito sensível ao estresse oxidativo, devido aos baixos níveis de antioxidantes, altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e da grande necessidade de oxigênio nas reações neuroquímicas.

Dados da literatura sugerem que os machos de diversas espécies animais apresentam uma maior susceptibilidade à ação das espécies reativas de oxigênio, possivelmente por apresentarem uma menor defesa antioxidante. Essa diferença na capacidade de combate ao estresse oxidativo entre os gêneros é provavelmente devido à presença ou ausência dos

hormônios estrogênicos, visto que evidências experimentais e clínicas já mostraram que as fêmeas em período fértil apresentam uma maior proteção cardiovascular do que os machos na mesma faixa etária. Alguns dados do nosso laboratório sugerem que a fluoxetina modula positivamente a bioenergética mitocondrial em alguns tecidos centrais e periféricos de ratos machos, dessa forma é tentador especular que a fluoxetina poderia atuar de forma semelhante aos estrogênicos favorecendo a redução da produção de espécies reativas de oxigênio e elevando as defesas antioxidantes no tronco encefálico de ratos machos.

Diante do exposto, propomos neste trabalho que o bloqueio da proteína de recaptação da serotonina em períodos precoces do desenvolvimento promove adaptações neuroquímicas no sistema nervoso, que induzem alterações na bioenergética mitocondrial e balanço oxidativo favorecendo principalmente a melhora da defesa antioxidante nos machos tratados durante o desenvolvimento. Neste sentido levantamos as seguintes hipóteses: A exposição crônica ao inibidor seletivo de recaptação de serotonina promove redução nas concentrações de espécies reativas de oxigênio e aumenta a defesa antioxidante no tronco encefálico dos ratos machos em maior intensidade que no tronco encefálico das fêmeas.

Para testarmos nossas hipóteses tivemos como:

- **Objetivo Geral-** Avaliar em ratos machos e fêmeas aos 60 dias de vida, os efeitos da inibição crônica de recaptação da serotonina durante a lactação sobre os mecanismos de controle da bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo no tronco encefálico.
- **Objetivos Específicos-** Avaliar *in vivo*, o peso corporal e *post mortem*, aos 60 dias de vida o consumo de oxigênio mitocondrial, a capacidade da abertura do poro de transição de membrana mitocondrial, a produção de espécies reativas de oxigênio, a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, a atividade da enzima citrato sintase, superóxido dismutase, catalase, glutathione-S-transferase, estado REDOX e expressão gênica da UCP-2.

Esta tese deu origem a dois artigos científicos que foram submetidos à publicação. O primeiro intitulado “PROTECTIVE EFFECTS OF ESTROGEN AGAINST CARDIOVASCULAR DISEASE MEDIATED VIA REDUCTION OF OXIDATIVE STRESS IN THE BRAIN” foi aceito na revista *Life Science* (Qualis B1 em Medicina II). Este artigo teve como objetivo revisar os efeitos dos estrogênicos como agente neuroprotetor contra o estresse oxidativo em regiões do encéfalo. O segundo artigo intitulado “SEROTONIN TRANSPORTER INHIBITION AT NEONATAL PERIOD INDUCE SEX-DEPENDENT EFFECTS ON MITOCHONDRIAL BIOENERGETICS IN THE RAT BRAINSTEM” foi submetido à revista *European Journal of Neuroscience* (Qualis A2 em Medicina II). Nosso

artigo original teve como objetivo investigar os efeitos da exposição crônica ao inibidor seletivo de recaptação da serotonina durante a lactação sobre a bioenergética mitocondrial e estresse oxidativo no tronco encefálico de ratos jovens machos e fêmeas.

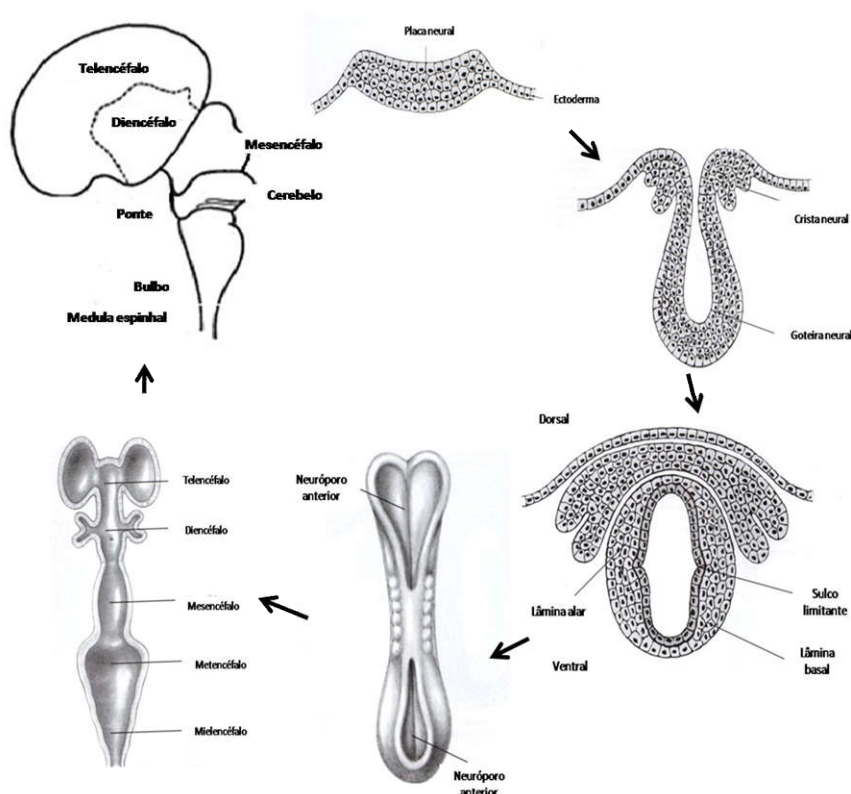
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EMBRIOLOGIA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Um fato importante dá-se pelo surgimento dos primeiros neurônios nas superfícies dos organismos, uma vez que a função primordial do sistema nervoso é relacionar o animal com o ambiente (MACHADO, 2006). O sistema nervoso se origina a partir do folheto mais externo do embrião, o ectoderma. As outras estruturas apresentadas pelo embrião nesse momento são o mesoderma (folheto medial) e endoderma (folheto interno). A notocorda é um cordão com eixo craniocaudal situado na região posterior do embrião, responsável pelo desenvolvimento da coluna vertebral. Tem função indutora na formação de um espessamento do ectoderma chamado placa neural. Esta placa está situada posteriormente à notocorda, ficará mais espessa e adquire uma invaginação que formará um sulco longitudinal denominado sulco neural esse sulco se aprofundará e formará a goteira neural (MACHADO, 2006; MENESES, 2011).

Posteriormente a goteira neural será fechada pelo processo de neurulação formando o tubo neural, que é responsável pela origem do sistema nervoso central, que será protegido pelo canal vertebral e neurocrânio. Ao nível da goteira para formar o tubo neural, existirá uma formação em cada lado, chamada crista neural (MENESES, 2011). A crista neural dará origem a elementos do sistema nervoso periférico, além de elementos não pertencentes ao sistema nervoso (MACHADO, 2006). O esquema de desenvolvimento do sistema nervoso encontra-se resumido na figura 1. Células neuroectodérmicas primitivas do tubo neural vão proliferar e diferenciar-se nos neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e células ependimárias (MENESES, 2011). A parede do tubo neural é dividida no plano transversal, pelo sulco limitante, que separa as lâminas em lâminas alares (dorsal e posterior), lâminas basais (anterior e ventral), lâmina do assoalho e lâmina do teto (MENESES, 2011). Das lâminas alares e basais derivam neurônios e grupos de neurônios (núcleos) ligados respectivamente à sensibilidade e à motricidade, situados na medula no tronco encefálico (MACHADO, 2006).

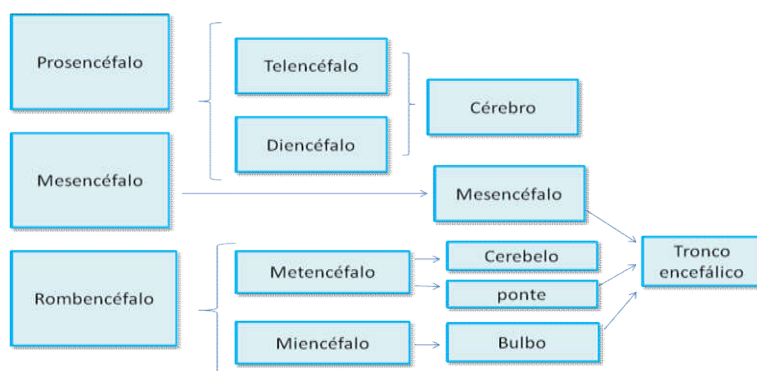
Figura1. Desenvolvimento embrionário do Sistema Nervoso Central. Formação do sistema nervoso central desde a placa neural até a completa divisão embrionária.



Fonte: adaptado de Meneses, 2011; Machado, 2006.

No arquencéfalo do tubo neural formam-se três dilatações denominadas: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. O prosencéfalo dará origem a: telencéfalo e diencéfalo. O mesencéfalo não se modifica e o rombencéfalo dará origem aos: metencéfalo e mielencéfalo, esses se desenvolverão e formarão cérebro, tronco encefálico e cerebelo (MACHADO, 2006) (Figura 2).

Figura 2. Esquema da formação anatômica do tronco encefálico.



Além da organização e divisão anatômica do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), este também é dividido em sistema nervoso voluntário ou somático motor (SNSM) e sistema nervoso autônomo (SNA), ou involuntário, ou visceral ou vegetativo (SNV) e subdividido em simpático e parassimpático. O SNC envia suas eferências neurais para o SNSM e SNV. Os neurônios motores superiores do cérebro enviam comandos para o SNV de onde os neurônios motores inferiores recebem comandos e esses se situam no Sistema Nervoso Segmentar (SNS). Os corpos celulares de todos os neurônios motores somáticos situam-se dentro do SNC (no corno ventral da medula espinhal, ou no tronco encefálico) (BEAR, 2002; MACHADO 2006; MENESES 2011).

O neurônio é formado por um corpo celular, da sua superfície projetam uma ou mais ramificações neurais, sendo algumas delas chamadas de dendritos, estas recebem impulsos eletrofisiológicos (informações) que são conduzidos em direção ao corpo celular e viajam pelos axônios. A matéria cinzenta do SNC é formada pelos corpos dos neurônios juntamente com as células da glia e a matéria branca corresponde aos axônios mais as células da glia. Os impulsos nervosos e químicos transmitidos de um neurônio para outro através de um axônio para um dendrito, são chamadas de sinapses. Uma cadeia de neurônio que se comunica é denominada de via. Um conjunto de axônio do caminho que se encontram no SNC é chamado de trato, fascículo, branquio, pedúnculo ou lemnisco. Quando o feixe deixa o SNC e se conecta com estruturas periféricas é chamado de nervo (FERNÁNDEZ-GIL *et al.*, 2010).

2.2 ANATOMIA DO TRONCO ENCEFÁLICO

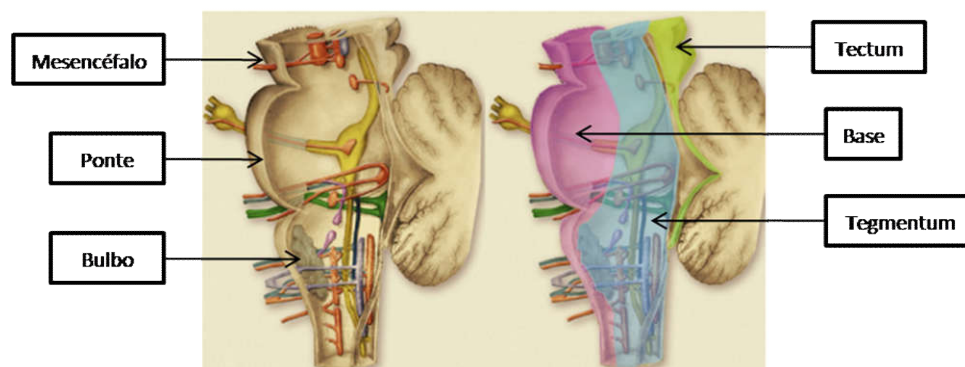
O tronco encefálico apresenta extrema importância para a sobrevivência de um animal, localizado entre os centros superiores e a medula espinhal, constitui uma das partes mais antigas do encéfalo levando em consideração o desenvolvimento do sistema nervoso durante o processo evolutivo (NICHOLLS; PATON, 2009). Representa em todos os vertebrados, dos mais simples aos mais evoluídos, uma organização primitiva fundamental, assegurando a atividade básica da totalidade do SNC (MENESES, 2011).

Regula funções vitais como respiração, estado de alerta consciente e a temperatura corporal (BEAR, 2002). Se há lesão do tronco encefálico, os sistemas respiratórios e cardiovasculares podem falhar, levando a morte. O ritmo da inspiração e expiração é criado desde o período intrauterino até o momento da morte, por neurônios localizados no tronco encefálico (NICHOLLS; PATON, 2009). É a extensão mais baixa do cérebro conectado a medula espinhal e ao cerebelo, está situado ventralmente ao cerebelo (MACHADO, 2006).

Formado pelo Bulbo (medula oblonga), ponte e mesencéfalo (Figura 3), tem sua localização na fossa craniana posterior, limitado anteriormente peloclívis, a porção superior se conecta ao diencéfalo e a inferior com a medula espinhal (SNELL *et al.*, 2010). A matéria cinzenta é formada pelos corpos neuronais, é agrupada em aglomerados que formam os núcleos do tronco encefálico.

Axônios vindos de várias regiões formam a matéria branca, estes se conectam aos neurônios do córtex cerebral com a medula espinhal, o cerebelo e os núcleos do nervo craniano (FERNÁNDEZ-GIL, 2010). A estrutura interna do tronco é organizada por três lâminas, do dorsal ao ventral são: tecto, tegmentum e base. O tectum contém os corpos quadrigêmeos no mesencéfalo, o velum medular superior na ponte eo velum medular inferior na medula oblonga ou bulbo (Figura 3) (FERNÁNDEZ-GIL, 2010). Muitos dos núcleos do tronco encefálico recebem ou emitem fibras nervosas que entram na constituição dos nervos cranianos. Os doze pares de nervos cranianos têm conexões bilaterais no encéfalo e recebem uma nomenclatura em algarismos romanos. Os nervos cranianos oriundos do tronco encefálico são chamados por núcleos de substâncias cinzentas existentes no interior do bulbo, da ponte e do mesencéfalo. Dos doze pares de nervos cranianos, dez fazem conexão no tronco encefálico (MACHADO, 2006).

Figura 3. Divisão anatômica e lâminas do tronco encefálico. A lâmina de cor rosa é a base, cor azul o tegmentum, cor verde o tectum.



Fonte: Adaptado de Fernández-Gil (2010).

A lâmina ventral é a base que contém a via piramidal, com as vias corticobulbar e corticoespinhal. Na altura da ponte fica maior devido à presença dos núcleos pontinos, que recebem fibras que se projetam para o cerebelo, formando a via pontocerebelar (FERNÁNDEZ-GIL, 2010).

2.2.1 Bulbo

Apresenta o formato de um cone e sua extremidade menor se liga em forma continuada caudalmente com a medula. Não existe uma linha de demarcação nítida entre a medula e o bulbo, então se considera que o limite está num plano horizontal que passa imediatamente acima do filamento radicular mais cranial do primeiro nervo cervical, o que corresponde ao nível do forame magno do osso occipital. Sua limitação superior é um sulco horizontal, visível no contorno central do órgão, o sulco bulbo-pontino, que corresponde à margem inferior da ponte. Os sulcos longitudinais do bulbo delimitam as áreas inferiores (ventral), lateral e posterior (dorsal) do bulbo. A fissura mediana anterior termina cranialmente em uma depressão chamada forame cego. A pirâmide, uma eminência a cada lado da fissura é formada por um feixe compacto de fibras nervosas descendentes ligando as áreas motoras do cérebro aos neurônios motores da medula que também são denominados tractocórtico-espinhal ou tracto piramidal. Na parte caudal do bulbo, fibras deste tracto cruzam obliquamente o plano mediano em feixes interdigitados que obliteram a fissura mediana anterior e constituem a decussação das pirâmides (MACHADO, 2006).

O bulbo consiste em substância branca e cinzenta extremamente rearranjadas, esse rearranjo dá-se devido à expansão do tubo neural formando a vesícula do metencéfalo que se torna o quarto ventrículo. Existem três níveis na estrutura do bulbo (nível da decussação das pirâmides (decussação motora), nível da decussação dos lemniscos (decussação sensitiva) e nível das olivas). As pirâmides, localizada lateralmente à fissura mediana anterior, contêm dois tipos de fibras nervosas corticais descendentes, corticonucleares e corticoespinais, sendo o segundo tipo organizado somatotopicamente, e são limitadas pelo sulco lateral anterior. Esse feixe de fibras liga as áreas motoras do cérebro aos neurônios motores da medula espinal e é descrito como trato piramidal ou córtico espinal (FREITAS, 2016; MENESES, 2011).

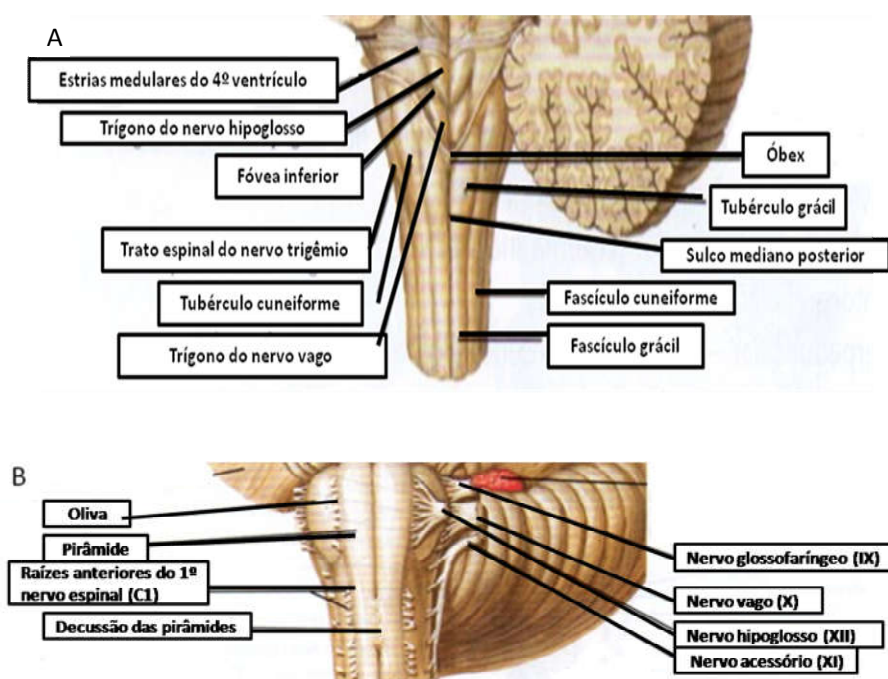
As placas basal e alar do Bulbo dão origem a núcleos específicos e a camada do manto circunjacente é ocupada por axônios que têm origem em outros níveis. Da placa basal os neurônios em amadurecimento originam o núcleo do hipoglosso, o núcleo motor dorsal do vago, núcleo salivatório inferior e núcleo ambíguo. Da placa alar originaram-se os nervos cranianos e seus componentes funcionais, incluindo o núcleo vestibular e coclear, trato solitário e o trigêmeo. Da região caudal do óbex da placa alar emana o núcleo grácil e cuneiforme. Na região rostral ao óbex, algumas células migram ventralmente e medialmente para formar o complexo olivar inferior (FREITAS, 2016).

Na superfície anterior do bulbo, um feixe de axônio se agrupa para formar as pirâmides (HAINES, 2006). Na região superior, o bulbo é conectado com a ponte e na inferior, com a medula espinhal. Tem forma de cone e sua extremidade basal é dirigida cranialmente onde compõe a parte inferior da fossa rombencéfálica (IV ventrículo). Na face anterior encontra-se a fissura mediana anterior que se continua inferiormente até a área da medula espinhal. Ao lado da fissura encontram-se as pirâmides, que são compostas de feixes de fibras axonais chamados de tratos córtico espinais que têm origem nas grandes células de Betz no giro pré-central do lobo frontal do córtex cerebral (FREITAS, 2016). Em sua área inferior, as pirâmides ligam-se na parte mais caudal do bulbo onde cerca de 90% das fibras axonais cruzam para o lado oposto, formando as chamadas decussação das pirâmides. Na área posterior lateral entre a fissura mediana anterior e a antero-lateral, observamos os núcleos olivares inferiores subjacentes (AFIFI; BERGMAN, 2005).

As radículas do nervo hipoglosso emergem da fissura entre a pirâmide e a oliva. Os pedúnculos cerebelares inferiores, que ligam o bulbo ao cerebelo, encontram-se após as olivas. As raízes dos nervos glossofaríngeo e vago, juntamente com as raízes cranianas do nervo acessório emergem na fissura entre a oliva e pedúnculo cerebelar (SNELI *et al.*, 2010). A face posterior do bulbo é imaginariamente dividida entre duas metades (superior e inferior). A metade superior forma a parte inferior do assoalho da fossa rombencefálica. A metade inferior é contínua com a face posterior da medula espinhal que possui um sulco mediano posterior (FREITAS, 2016). Ao lado do sulco existe uma tumefação alongada que é o tubérculo grácil, o tubérculo cuneiforme localiza-se lateralmente ao tubérculo grácil (AFIFI; BERGMAN, 2005). Para facilitação de um maior entendimento da distribuição das estruturas que compõem o bulbo, observe as figuras 4: A e B.

As estruturas que formam o bulbo são responsáveis por várias ações dos músculos e órgãos do corpo dos mamíferos, dentre elas estão: sensibilidade dolorosa, térmica e tátil da face, fronte e mucosas do nariz e boca, percepção de gustação, atua na ação do trato gastrointestinal, pulmonar e seio carotídeo, inervação do óptico para estimulação da glândula lacrimal e movimentos do olho, inerva músculos esqueléticos somáticos da língua, utilizado para a coordenação fina da postura e movimentos dos músculos individuais das extremidades, inclusive sensibilidade dolorosa e térmica, inervação visceral, recebe aferências do córtex e da ponte e modula processamento cerebelar, formação e renovação do líquido cérebro espinal. A formação reticular está envolvida na vigília. Os núcleos da rafe no bulbo sintetizam serotonina (NETTER, 2007).

Figura 4. A e B principais estruturas do bulbo e suas divisões do bulbo.



Fonte: Adaptado de Netter (2007).

2.2.2 Ponte

O segmento médio do tronco encefálico (parte caudal do bulbo e a parte rostral do mesencéfalo) está situado superiormente entre o bulbo e o mesencéfalo (HAINES, 2006). Limitada superiormente pelos pedúnculos cerebrais e sulco pedúnculo pontino, lateralmente pelos pedúnculos cerebelares médios e inferiormente pelo sulco bulbo pontino. Sua face posterior é coberta pelo cerebelo (FREITAS, 2016).

Os núcleos pontinos são pequenos aglomerados de neurônios dispersos em toda base da ponte que recebem projeções do córtex pelas fibras do trato cortiço pontino. As fibras transversais da ponte ou fibras pontocerebelares são constituídas pelos axônios dos neurônios dos núcleos pontinos (MENESES, 2011). As placas alar e basal se estendem da parte rostral do bulbo até a ponte em desenvolvimento. Os núcleos motores dos nervos cranianos (trigêmeos, abducente, facial e salivatório superior) originam-se da placa basal e localizam-se medialmente ao sulco limitante da ponte (HAINES, 2006). Está composta pelos núcleos sensoriais dos nervos cranianos que são: porções dos núcleos dos trigêmeos e a parte vestibulo coclear e a parte rostral do núcleo do trato solitário. O tegumento da ponte é a parte posterior da ponte onde estão contidos os núcleos sensoriais e motores bem como a formação reticular e vários tratos ascendentes e descendentes (FREITAS, 2016). No desenvolvimento

da área anterior da ponte existe uma invasão de um grande número de feixes de fibras corticais descendentes, onde algumas terminam na ponte e outras passam para locais mais caudais. Neurônios imaturos da placa alar migram para a área anterior da ponte onde formarão os núcleos basais, juntamente com seus axônios, fibras descendentes chegando ou passando por esta área, formam coletivamente a região basal da ponte (AFIFI; BERGMAN, 2005).

A face anterior forma uma saliência como protuberância pontina, em sua linha mediana encontra-se o sulco e a artéria basilar. Do sulco bulbopontino emergem o nervo abducente (VI). Do ângulo pontocerebelar entre a parte inferior da ponte e a parte superior do bulbo e cerebelo surgem os nervos faciais (VII) e vestibulonuclear (VIII). Dois componentes do nervo trigêmeo (a grande raiz sensitiva e a grande raiz motora) emergem da região súperolateral da ponte. Os colículos faciais, localizados lateralmente ao sulco mediano, que representam superficialmente o local onde as fibras do nervo facial contornam os núcleos dos nervos abducentes antes de emergirem do tronco, compõem a face posterior da ponte que forma a porção superior do assoalho do quarto ventrículo (FREITAS, 2016).

Microscopicamente a ponte possui duas porções: a parte basilar da ponte e o tegmento. A parte basilar trata-se de uma protuberância pontina que contém núcleos da ponte e feixes nervosos multidirecionais, feixes estes pertencentes a três classes de fibras: corticoespinhais, corticonucleares, corticopontocerebelares. Na região basilar do tegmento encontra-se o lemnisco medial, na direção média lateral. As fibras oriundas do núcleo cuneiforme localizam-se medialmente, as fibras do núcleo grácil são mais laterais. O trato espinhal do nervo trigêmeo estende-se lateralmente ao lemnisco medial.

O trato espinotalâmico é lateral ao trato espinhal do nervo trigêmeo. Na região basilar do tegmento está o sistema lemniscal sensitivo, o qual inclui os lemniscos medial e trigeminal, e o trato espinotalâmico. As fibras do corpo trapezóide originam-se dos núcleos cocleares, atravessam o tegmento e agrupam-se na região lateral da ponte para formar o lemnisco lateral. O trato tegmental central se origina nos núcleos da base e no mesencéfalo e se projeta para o complexo olivar inferior. Existem outros tratos que se estendem pelo tegmento da ponte, são eles: rubroespinhal, espinocerebelar anterior (FREITAS, 2016). Supõe-se que as vias respiratórias automáticas iniciam-se no córtex límbico e envolvam estruturas diencefálicas, o sistema reticular do tronco encefálico, a porção lateral e posterior da ponte, os núcleos bulbares e mediadores da respiração automática e os neurônios respiratórios da medula espinhal (AFIFI; BERGMAN, 2005).

Na porção superior da ponte, estendendo-se posteriormente ao tegmento está localizado o *locusceruleus* a principal fonte de inervação noradrenérgica para a maioria das

regiões do sistema nervoso central, divide-se em quatro subnúcleos: central, superior, subcerúleo e um pequeno núcleo inferior e posterior. Dois feixes de projeção emergem do núcleo: feixe ascendente dorsal para o hipotálamo, hipocampo, neocórtex e cerebelo e feixe descendente para a medula espinhal. Contém células pigmentadas próximas à substância cinzenta periventricular da parte superior do quarto ventrículo (FREITAS, 2016; NETTER, 2008).

A formação reticular da ponte é a denominação para um aglomerado de neurônios que se estende da região caudal do bulbo até a região rostral do mesencéfalo e são contínuos com a zona incerta do subtálamo e com os núcleos medianos intralaminares e reticular do tálamo. Atualmente sabe-se que a formação reticular está organizada em grupos nucleares definidos como conexões aferentes e eferentes. A formação reticular compreende um sistema neural com muitos influxos e com um sistema multissináptico de condução de impulso (FREITAS, 2016). A formação reticular projeta-se diretamente no núcleo do nervo abducente, levando impulsos para: núcleos vestibulares, colículo superior, campos oculares frontais, núcleo dorsal do nervo craniano-III. Também supre: Nervo abducente ipsilateral, nervo oculomotor contralateral via fascículo longitudinal medial, interneurônios nucleares do nervo abducente para o músculo reto medial (NETTER, 2008).

Dentre os grupos nucleares da formação reticular encontram-se o núcleo reticular mediano (núcleos da rafe), paramediano e lateral. Esses núcleos são responsáveis pela síntese de serotonina (Figura5) (NETTER, 2008; FREITAS, 2016). A ponte atua não só na síntese de serotonina como também influencia na respiração. Acredita-se que vias respiratórias automáticas iniciam-se no córtex límbico e envolvam estruturas diencefálicas, o sistema reticular do tronco encefálico, a porção lateral ou posterior da ponte, os núcleos bulbares mediadores da respiração automática e os neurônios respiratórios da medula espinhal (AFIFI;BERGMAN, 2005).

2.2.3 Mesencéfalo

O mesencéfalo se origina como uma das três vesículas cerebrais primárias. Neurônios imaturos, que surgem da zona ventricular para penetrar e formar a zona intermediária dá origem as placas alar e basal, que são contínuas com as placas alar e basal do rombencéfalo. A camada marginal circundante contém os axônios em desenvolvimento das células localizadas em outros níveis do eixo neuronal. O aqueduto cerebral é estreito em relação ao quarto ventrículo; portanto, as placas basais e alar se localizam anterior e

posteriormente a esta estrutura, assim como na medula espinhal e na medula oblonga. Os neurônios imaturos da placa alar dão origem à lâmina quadrigeminal, onde se originam os colículos superior e inferior. Os imaturos também migram para áreas anteriores do mesencéfalo em desenvolvimento para formar o núcleo rubro e a substância negra. Os da placa basal originam neurônios somáticos eferentes dos núcleos oculomotor e troclear, além de originar as células motoras viscerais associadas ao complexo oculomotor (FREITAS, 2016). Ao se diferenciar, as placas basais e alar formam um fascículo proeminente chamado pedúnculo cerebral (HAINES et al., 2006).

Em geral, são identificadas três subdivisões em secções do mesencéfalo, o teto, tegmento e parte basilar, porção mais rostral do tronco encefálico. Origina os III e IV nervos cranianos, conduz tratos ascendentes e descendentes e contém núcleos que são essenciais para a função motora. Caudalmente é contínuo com a ponte e rostralmente une-se ao diencéfalo. O arqueduto cerebral, a cavidade do mesencéfalo é contínua rostralmente com o terceiro ventrículo (FREITAS, 2016). O teto (substância cinzenta e branca) do mesencéfalo é localizado posteriormente ao arqueduto do mesencéfalo e à substância cinzenta central e contém os colículos superiores e inferiores (lâmina quadrigeminal) (FREITAS, 2016; NETTER, 2007). O pilar do cérebro é separado do tegmento pela massa de neurônios pigmentados, a substância negra. O tegmento do mesencéfalo é localizado centralmente. Seu arqueduto é circundado pela substância cinzenta central do mesencéfalo que separa o teto do tegmento, sendo a continuação anterior do tegmento da ponte. No pedúnculo cerebral a parte posterior é o tegmento e os pilares do cérebro são a parte anterior, que corresponde à metade do mesencéfalo, excluindo o teto (NETTER, 2007).

O termo base do pedúnculo é usado para se referir à parte basilar do mesencéfalo. O termo pilar do cérebro atribui-se ao feixe maciço de fibras corticofugais situado na face anterior do mesencéfalo (FREITAS, 2016). A região do colículo superior é conhecida como pré-teto. Os colículos inferiores são divididos em três núcleos principais: central, pericentral e periférico. A região pré-tetal é imediatamente superior ao colículo superior ao nível da comissura posterior. Esta comissura é a região de transição do mesencéfalo para o diencéfalo. O órgão subcomissural é a placa endimária modificada no teto do arqueduto do mesencéfalo, imediatamente abaixo da comissura posterior (NETTER, 2007). O núcleo central é o maior núcleo retransmissor da via acústica. O núcleo pericentral recebe apenas influxo monoaural contralateral e proporciona audição direta. O núcleo periférico está relacionado principalmente a reflexos acústico-motores. O colículo inferior apresenta conexões aferentes e eferentes (AFIFI; BERGMAN, 2005). O sulco basilar é uma depressão

anterior na linha mediana. O nervo locomotor (nervo craniano-III) emerge da fossa interperpendicular entre os pilares do cérebro. O nervo troclear (nervo craniano [NC]-IV) sai do mesencéfalo posteriormente, cruza no véu medular superior e se dirige anteriormente ao tronco encefálico. O núcleo visceral (NC-III) é o núcleo pré-ganglionar parassimpático e origina as fibras parassimpáticas não-cruzadas. Colículo superior recebe impulsos do trato óptico. Colículo inferior recebe impulso dos núcleos coclear e se de outros núcleos auditivos acessórios (NETTER, 2007).

Em relação ao suprimento sanguíneo do tronco encefálico, o bulbo é irrigado pelas artérias vertebral, espinhal anterior, espinhal posterior, cerebelar inferior posterior. A ponte recebe sangue da artéria basilar. Os grupos de vasos que fornecem o suprimento para ponte são: paramedianos e circunferenciais curto e longo (artéria cerebelar inferior anterior, artéria do labirinto e a artéria cerebelar superior). O mesencéfalo apresenta sua irrigação de forma complexa. Recebe suprimento da artéria basilar, através dos ramos paramedianos, dos ramos das artérias cerebelar superior e cerebelar posterior (FREITAS, 2016).

Além das estruturas descritas anteriormente encontram-se também, ao longo do tronco encefálico, os núcleos da rafe, estruturas importantes para distribuição das vias da serotonina (STAHL, 2000).

3 NÚCLEOS DA RAFE DO TRONCO ENCEFÁLICO

Em 1964, Dahlstron e Fuxe demonstraram que estes núcleos constituem a principal fonte de serotonina para o sistema nervoso central, formando circuitos locais na formação reticular e enviando projeções para diversas regiões encefálicas. Formam uma coleção de neurônios distribuída ao longo da linha sagital mediana do tronco encefálico, desde o núcleo interperpendicular no mesencéfalo até a decussação das pirâmides no bulbo (TORK, 1985). Núcleos da rafe, especialmente da ponte e bulbo, enviam fibras serotoninérgicas para todo o córtex cerebelar. Participa da formação reticular, sua junção constitui uma estreita placa de neurônios sagitalmente orientados na linha média do tronco encefálico. Recebem aferências do córtex cerebral, hipotálamo e formação reticular. Cada axônio se ramifica extensivamente e avança uma grande proporção do SNC, enviando aferências para a medula espinal (provenientes dos núcleos caudais), córtex cerebral e demais regiões (provenientes dos núcleos rostrais) (MENESES, 2007).

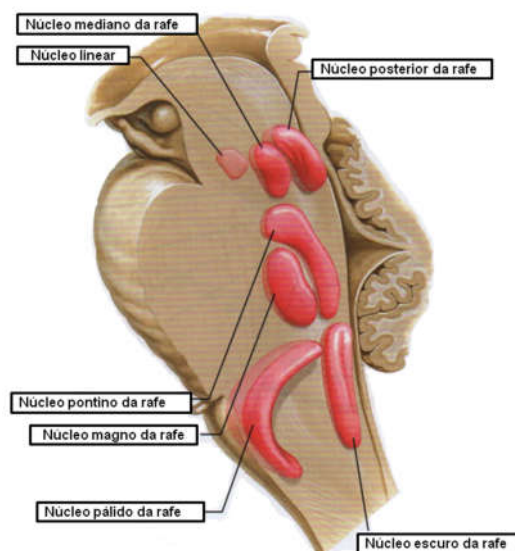
É parte dos núcleos do tronco encefálico que também inclui os grupos nucleares reticulares paramedianos, medial e lateral que contêm serotonina. Situado ao longo da linha mediana do bulbo, ponte e mesencéfalo. O grupo inferior está envolvido nos mecanismos da dor, grupo superior envolvido com a vigília, o estado de alerta e com o sono. O núcleo central inferior aparece na junção pontebulbar e na parte inferior da ponte, representa a parte rostral do núcleo magno da rafe. Núcleo pontino da rafe está localizado superiormente ao núcleo central inferior, recebe impulsos vestibulares e está envolvido na geração dos movimentos oculares sacádicos. O núcleo mediano da rafe encontra-se na extensão superior do núcleo pontino da rafe, junto com o núcleo posterior, origina as principais fibras ascendentes serotoninérgicas. O núcleo posterior da rafe localiza-se de cada lado da linha mediana, posteriormente ao fascículo longitudinal medial, une-se com o núcleo tegmental posterior, também origina as principais fibras ascendentes serotoninérgicas (NETTER, 2007). São denominados núcleos linear, dorsal, mediano, pontino, magno, pálido e obscuro (Figura 5) (TORK, 1985).

Apesar de apresentar populações heterogêneas de neurônios, o principal neurotransmissor sintetizado nesses núcleos é a serotonina, mesmo se apresentando co-localizada com outras substâncias neuro-ativas, com morfologia, projeções e características neuroquímicas distintas (FRAZÃO, 2004). Os neurônios serotoninérgicos exercem suas funções de acordo com a distribuição celular dos seus receptores (HORNUNG, 2003). Os núcleos da rafe também têm importâncias diferenciadas, de acordo com as substâncias

expressadas. No núcleo linear, além dos neurônios serotoninérgicos, encontram-se neurônios expressores de tirosina hidroxilase, substância P e da proteína EP3R (HOLLIDAY *et al.*, 1990; NAKAMURA *et al.*, 2000). O núcleo pontino está intimamente relacionado com os vasos sanguíneos. Foi sugerido que os neurônios desta estrutura apresentam papel neuro-secretor, atuam como quimiossensores para substâncias circulantes no sangue, modula o fluxo sanguíneo, pressão arterial e tônus das paredes vasculares (SCHEIBEL *et al.*, 1975).

O maior núcleo é o Dorsal, contém aproximadamente 40% das células serotoninérgicas de todo o encéfalo, neurônios que expressam a substância P, catecolaminas, inorfina, angiotensina, encefalina, neurotensina, proteína EP3R e ácido gama aminobutírico (GABA) (BAKER *et al.*, 1991b; GENES *et al.*, 1982; BJÖRKLUND e HÖKFELT, 1985; BJÖRKLUND *et al.*, 1990; NAKAMURA *et al.*, 2000; ISHIDA *et al.*, 2001). Ele envia projeções para outro núcleo da rafe, estruturas do mesencéfalo e tronco encefálico, estruturas da medula espinhal, núcleo facial, núcleo prepósito do hipoglosso, núcleo do hipoglosso, núcleo caudado e putâmen, amígdala, substância negra e hipocampo (VERTES e KOCSIS, 1994; IMAI *et al.*, 1986). Está relacionado com o sono REM, regulação de funções autonômicas via projeções para o complexo parabraquial, assim como também modulação de funções moto-sensoriais via projeções para os nervos cranianos (VERTES e KOCSIS, 1994).

Figura 5. Distribuição e localização dos núcleos da rafe no tronco encefálico.



Fonte: Adaptado de Netter (2007).

Na medula oblonga ou bulbo se encontra o principal local de concentração do sistema serotoninérgico (5-HT), chamado sistema caudal, sistema medular ou B1-3 dos neurônios clássicos do tronco encefálico. É também reconhecido como um componente chave do sistema de controle do cérebro (AZMITA, 1999; KINNEY *et al.*, 2009; LOVICK, 1997; MASON, 2001). Esse sistema é importante para o controle da homeostase da regulação respiratória, autonômica, controle da via aérea superior, modulação do complexo de Bötzing, auto-ressuscitação, respostas quimiorreceptivas centrais e hipercapnia e hipóxia, controle cardiovascular, dor, função motora e termorregulação. O complexo de Bötzing é um grupo de neurônio localizado na medula ventrolateral sendo responsável pela gênese do ritmo respiratório central, na medula este grupo é localizado caudalmente ao núcleo facial e ventral do núcleo ambíguo (BRADLEY *et al.*, 2002; CORCORAN *et al.*, 2009; CUMMINGS *et al.*, 2010; DEPUY *et al.*, 2011; DERGCHEVA *et al.*, 2009; ERICKSON *et al.*, 2007; ERICKSON e SPOSATO, 2009; TAYLOR *et al.*, 2005; TRYBA *et al.*, 2006). Por estar interligado com outras regiões cerebrais e sistemas neurotransmissores que influenciam homeostase, incluindo locais hipotalâmicos e límbicos, o sistema caudal serotoninérgico é de grande importância para respostas cardiovasculares, térmicas e outras homeostáticas (BERTHOUD *et al.*, 2005; HORIUCHI *et al.*, 2006; MORRISON e NAKAMURA, 2011).

Existem diferenças entre as funções homeostáticas do domínio caudal e rostral de 5-HT na parte superior da ponte e no mesencéfalo, essa distinção acontece devido a diferentes perfis moleculares, origens de desenvolvimento e vias de migração (HORNUNG, 2003; TORK E HORNUNG, 1990; JENSEN *et al.*, 2008; WYLIE *et al.*, 2010). Evidências sugerem que o domínio rostral desempenha um papel de quimiossensibilidade ao CO₂ previamente atribuído aos neurônios medulares da 5-HT (BUCHANAN E RICHESON, 2010; SERVESON *et al.*, 2003) e que a deficiência do sistema caudal conduz a desequilíbrios na regulação respiratória cardiovascular e/ou metabólica, inclusive em resposta de estresse, na faixa etária pediátrica, principalmente nos primeiros dias e meses após o nascimento (KINNEY *et al.*, 2011).

A sede dos corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos está na área do tronco encefálico chamado núcleos da rafe. As projeções serotoninérgicas da rafe ao córtex frontal podem ser importantes para regular o humor, da rafe aos gânglios podem ajudar a controlar movimentos, bem como obsessões e compulsões, da rafe às áreas límbicas podem estar envolvidas na ansiedade e no pânico, da rafe ao hipotálamo podem regular o apetite e comportamento alimentar, dos centros do sono, como o próprio nome diz regulam o sono e principalmente o sono lento (STAHL, 2000). Os neurônios serotoninérgicos que descem pela

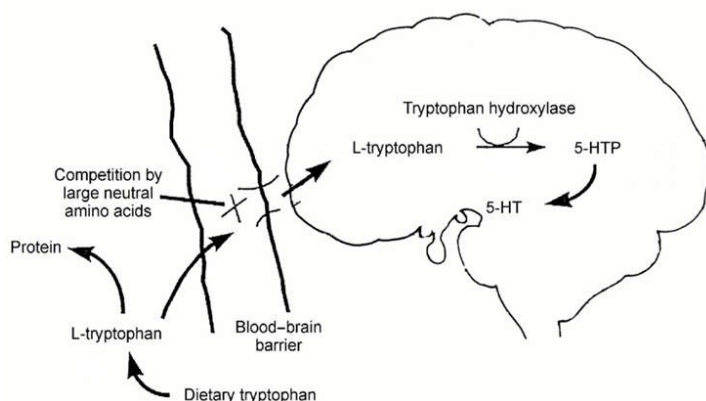
medula espinal podem ser responsáveis por controlar certos reflexos espinhais que fazem parte da resposta sexual, como orgasmo e ejaculação. A zona de gatilho do quimiorreceptor no tronco encefálico pode mediar o vômito, especialmente através de receptores 5-HT₃. Os receptores 5-HT₃ e 5-HT₄ periféricos no intestino podem regular o apetite, bem como outras funções gastrointestinais, como a motilidade gastrointestinal (STAHL, 2000).

4 SEROTONINA

Em 1930, Erspamer se interessou por uma substância amina vasoconstritora que foi encontrada em células enterocromafins dos intestinos e peles de coelhos, moluscos e sapos, que foi denominada por ele de enteramina (ERSPAMER e GHIRETTI, 1951). Desde então ela teve um lugar relativamente extenso na literatura. Irvine Page, Maurice Rapport e Arda Green a estudaram intensamente em 1948 quando a isolaram e classificaram-na (RAPPORT, GREEN, PAGE, 1948). Porém, em 1952 estabeleceu-se que a serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), seria a mesma substância indol denominada de enteramina, que Erspamer teria descoberto em 1930, apresentando maiores concentrações na mucosa gastrointestinal e plaquetas, mas também encontrada no sistema nervoso central (SNC) (ERSPAMER E ASERO, 1952; ERSPARMER, 1986). Essa amina biogênica exerce importante papel em inúmeros processos fisiológicos e comportamentais, isso dá-se devido ao fato de que mesmo sendo sintetizada por um pequeno grupo de neurônios no tronco encefálico, existe uma grande distribuição de terminais de axônio contendo 5-HT em todo o sistema nervoso (DI GIOVANI, 2013).

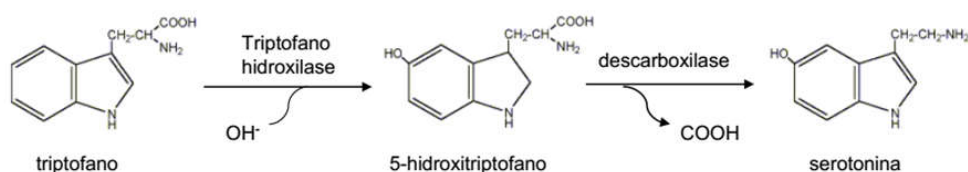
A produção de 5-HT ocorre nas células cromafins e nos neurônios, mas não nas plaquetas (RANG *et al.*, 1995). O triptofano (TRP) é um fator importante na síntese de 5-HT no cérebro. Apenas 5% do TRP e proteínas do plasma são liberados, disponíveis e transportados para o SNC, através da barreira hematoencefálica por um transporte de proteína ativo, pelo qual outros cinco aminoácidos disputam (LNAAS: valina, leucina, isoleucina, fenilalanina e tirosina). No cérebro, o TRP é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), sendo o 5-HTP descarboxilado pela enzima descarboxilase de ácido aromático para 5-hidroxitriptamina (5-HT) (BELL; ABRAMS; NUTTI, 2001), como descrito nas Figuras 6 e 7. As duas isoformas de TPH atuam em ambientes diferenciados: a Tph1 atua predominantemente em tecido periférico e a Tph2 tem ação predominante no tecido da região central (SAKOWSKI *et al.*, 2006; WALTHER *et al.*, 2003).

Figura 6. Captação de L-triptofano e síntese de serotonina no Sistema Nervoso Central.



Fonte: Adaptado de (BELL; ABRAMS; NUTTI, 2001).

Figura 7. Síntese de serotonina.



Fonte: Adaptado de (MARTINS, 2008).

Após sua síntese, a serotonina é armazenada em vesículas, nos neurônios pré-sinápticos, onde ocorrerá a exocitose sináptica. Sua liberação acontece no terminal de neurônios pré-sinápticos serotoninérgicos, sendo introduzida automaticamente na fenda sináptica. Após a recaptação da serotonina da fenda sináptica pelo transportador (5HTT ou SERT), sua sinalização é interrompida. É metabolizada via desaminação oxidativa pela enzima monoamina oxidase (MAO, principalmente MAO-A), cujo produto é a 5-hidroxiindole-3-acetaldeído, que será oxidado pela aldeído desidrogenase em ácido 5-hidroxi-indoleacético (5-HIAA)(LAM et al., 2010).

A família de receptores de serotonina inclui sete tipos: Entre 5-HT1 a 5-HT7. O 5-HT1 é subdividido em subtipos do A ao F, o 5-HT2 subdividido do A ao C, o 5-HT3, subdividido do A ao E, e o 5-HT5 subdivididos do A e B. Os únicos que não são subdivididos são 5-HT4, 5-HT6, 5-HT7 como descrito na tabela 1 (DI GIOVANI, 2013; CHOIS *et al.*, 1997; HOYER, CLARKE *et al.*, 1994; HOYER, HANNON *et al.*, 2002; FIORICA-HOWELLS *et al.*, 2000; BUZNICOV *et al.*, 2001; LAM *et al.*, 2010). Os receptores de 5-HT

são acoplados a proteína G, com exceção do 5-HT3 (KROEZE *et al.*, 2002). Nas células pós-sinápticas os receptores são amplamente distribuídos no córtex, hipocampo, septo, amígdala e hipotálamo (GUTKNECHT *et al.*, 2012; OGREN *et al.*, 2008).

Tabela 1. Receptores serotoninérgicos e suas subdivisões.

RECEPTORES DE SEROTONINA	SUBDIVISÕES
5-HT1	5-HT1A
	5-HT1B
	5-HT1C
	5-HT1D
	5-HT1E
	5-HT1F
5-HT2	5-HT2A
	5-HT2B
	5-HT2C
5-HT3	5-HT3A
	5-HT3B
	5-HT3C
	5-HT3D
	5-HT3E
5-HT4	-
5-HT5	5-HT5A
	5-HT5B
H-HT6	-
5-HT7	-

Fonte: Adaptado (LAM *et al.*, 2010).

A principal fonte de serotonina é materna, e sua participação na regulação do desenvolvimento de filamentos de animais antes do início da neurogênese, desempenha um papel no desenvolvimento antes de atuar como neurotransmissor, afetando morfogênese craniofacial, gastrointestinal e cardiovascular em algumas espécies (MOISEIWITSCH JR, 2000; CHOIS *et al.*, 1997).

A 5-HT atua na formação das redes do cérebro durante o desenvolvimento, está relacionada com a fisiologia básica, funções essenciais, controle cognitivo, regulação emocional, respostas autonômicas, atividade motora de forma abrangente, entre outras. Envolvida em atividades morfogênicas básicas durante o desenvolvimento cerebral, além de auxiliar na capacidade adaptativa, incluindo modulação e proliferação de células neurais, ou seja, ela modula funções neurais desde a formação do cérebro até depois do amadurecimento do mesmo. Alterações na sinalização da serotonina influenciam a fisiopatologia de distúrbios de desenvolvimento neurológico, desde psicoses esquizofrênicas, autismo e distúrbios de atenção e hiperatividade, ao longo da vida (LESCH; WAIDER, 2012). Atua não só na formação e na realização das sinapses, como também na regulação de moléculas de adesão celular (um dos principais componentes na conexão entre neurônios pré e pós-sinápticos), extremamente implicada na plasticidade cerebral, tanto no cérebro em desenvolvimento quanto adulto (DALVA *et al.*, 2007; LESCH, 2009; WAIDER, 2012; YAMAGATA *et al.*, 2003).

Além dessas funções, ainda estão associadas ao sistema 5-HT o envolvimento em aprendizagem e memória. Como também ligado ao estresse crônico, a traços de personalidade e emocionalidade negativa (STRONBEL *et al.*, 2003).

4.1 METABOLIZAÇÃO DE SEROTONINA

A velocidade da síntese da 5-HT é limitada através da ação da enzima TPH, sendo regulada por retroalimentação inibitória devido à ação dos auto-receptores, onde o 5-HT_{1D} é o principal (GOLAN, 2009). Há dois processos que equilibram a quantidade de serotonina na fenda sináptica: primeiro a recaptação da serotonina, e segundo pela sua degradação através das enzimas. Nestes processos existem várias moléculas envolvidas na regulação dos níveis de serotonina no cérebro, porém as mais estudadas são os transportadores de serotonina (5-HTT ou SERT) e a monoamina oxidase (MAO), a primeira transporta serotonina do espaço extracelular de volta para o botão sináptico, e a segunda é a principal enzima responsável pela degradação da serotonina (NIKLAS NORDQUIST & LARS ORELAND, 2010). As monoaminooxidasas A (MAO-A) e B (MAO-B) são enzimas que catalisam a desaminação oxidativa de monoaminas endógenas (YOU DIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006).

4.2 INIBIDORES SELETIVOS DE RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA

Os antidepressivos têm em comum a capacidade de aumentar rapidamente a disponibilidade sináptica de um ou mais neurotransmissores através da ação em diversos receptores e enzimas específicas (STAHL, 1997). Podem ser classificados de acordo com a estrutura química ou as propriedades farmacológicas. De acordo com a estrutura química cita-se, a cíclica (presença de anéis benzênicos), característica dos antidepressivos heterocíclicos (tricíclicos e tetracíclicos). Os antidepressivos tricíclicos (ADTs) são compostos por dois grandes grupos: aminas terciárias e secundárias. Atualmente os antidepressivos são classificados em função da ação farmacológica, pois os de nova geração não compartilham estruturas comuns (MORENO, MORENO, 1999). De acordo com essa classificação citam-se: inibidores de monoaminoxidase (IMAO), inibidores não-seletivos de recaptura de monoaminas (ADTs), inibidores seletivos de recapturação de serotonina (ISRS), inibidores seletivos de recaptura de 5HT/NE (ISRSN), inibidores de recapturação de 5HT e antagonistas ALFA-2 (IRSA), estimulantes de recaptura de 5HT (ERS), inibidores seletivos de recaptura de NE (ISRN), inibidores seletivos de recapturação de DA (ISRD), antagonistas de alfa-2 adrenorreceptores (MORENO, MORENO, 1999).

Até os anos 80 havia duas classes de antidepressivos, os tricíclicos (ADTs) e os inibidores de monoaminoxidase (IMAOs) (STAHL, 1997). A partir de 1987, os Inibidores Seletivos de Recapturação de Serotonina (ISRS) lançaram uma nova era no desenvolvimento de drogas psicotrópicas (CARLSSON, 1999). Os ISRS potenciam a atividade da 5-HT, através da inibição do transportador de recapturação de serotonina (TELLES-CORREIA *et al.*, 2007). O aumento nos níveis de neurotransmissores por inibição da MAO ou bloqueio das bombas de recapturação de monoaminas resulta na sub-sensibilização de receptor, cujo efeito está relacionado com o início da melhora clínica (STAHL, 1997).

Como um marco na psicofarmacologia, os inibidores seletivos de recapturação de serotonina (ISRS) representam um grande passo na evolução terapêutica, por que a partir deles foi estabelecido que a 5-HT exerce um papel fisiopatológico significativo em distúrbios afetivos e em transtornos de ansiedade (KUHN, 1985), além de sua capacidade de maior seletividade e perfil reduzido de efeitos adversos, os ISRS estão entre os antidepressivos mais frequentemente prescritos na clínica médica (CARLSSON, 1999; GOLAN *et al.*, 2009).

Fazem parte do grupo dos ISRS o citalopran, fluvoxamina, paroxetina, sertralina, escitalopram e fluoxetina, este último foi o primeiro a ser introduzido e que continua sendo um dos mais largamente prescritos. São utilizados para o tratamento da depressão, ansiedade,

transtorno obsessivo compulsivo, síndrome do pânico e de estresse pós-traumático (GOLAN *et al.*, 2009).

Os receptores neuronais mais envolvidos nas ações desses antidepressivos são os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} e 5-HT₃. A estimulação diferenciada dos receptores muda os efeitos antidepressivos, como exemplo cita-se: a estimulação de 5-HT_{1A} exerce efeitos ansiolíticos e antidepressivos, já a estimulação do 5-HT_{2A} tem efeitos antidepressivos, anti-obsessivos, de controle do comportamento alimentar compulsivo, efeitos ansiogênicos, a curto prazo, mas com redução de sintomas ansiosos como o pânico a longo prazo, redução da libido e alterações no comportamento sexual. Quando 5-HT_{2C} são estimulados têm efeitos ansiogênicos e atua na regulação do peso e do sistema dopaminérgico. A estimulação do 5-HT₃ estimula os efeitos gastrintestinais (náuseas e vômitos) destes fármacos (STAHL, 2004; STAHL; GRADY, 2003; STHAL, 2003; VASWANI; LINDA; RAMESH, 2003).

Os ISRS possuem perfis farmacocinéticos variados, que incluem meia vida, farmacocinética linear e não-linear, efeito de idade na sua depuração e no seu potencial de inibir isoenzimas metabolizadoras de medicamentos (citocromo P450) (GOODNICK; GOLDSTEIN, 1998). Essas diferenças farmacológicas e farmacocinéticas sustentam as diferenças clínicas dos ISRS. A potência da inibição de recaptação de serotonina varia de acordo com o ISRS utilizado.

A fluoxetina é um bloqueador de recaptação de serotonina (5HT) altamente ativo *in vitro* e *in vivo*. O desenvolvimento da fluoxetina baseou-se no fato de possuir uma estrutura química estreitamente relacionada à difenidramina, que possui propriedades inibidoras da recaptação da 5HT e da noradrenalina (CARLSSON, 1999). A sua seletividade para o SERT, a falta de afinidade para os receptores de neurotransmissores e a retenção de seletividade após o metabolismo para a norfluoxetina tornam a fluoxetina uma ferramenta útil para explorar aumentos induzidos farmacologicamente na neurotransmissão de 5HT (FULLER *et al.*, 1991). Lembrando ainda que a Fluoxetina quando metabolizada, gera metabólito (norfluoxetina) de ação prolongada e farmacologicamente ativa (GOODNICK; GOLDSTEIN, 1998).

Por essas razões, a fluoxetina é amplamente utilizada em pesquisas que avaliam seus efeitos em diferentes células do corpo, em várias idades e em diferentes espécies. Pesquisadores demonstraram que a serotonina neuronal modulada pela fluoxetina aumenta o movimento mitocondrial dos neurônios do hipocampo de ratos *in vitro*. Ao administrar um antagonista do receptor do 5-HT_{1A}, os autores observaram a inibição do movimento mitocondrial, porém ao adicionar a fluoxetina, promoveu o movimento mitocondrial e sugeriu

que serotonina pode mediar a distribuição de energia dentro dos neurônios responsivos (CHEN *et al.*, 2007).

Djordjevic *et al.* (2012) tentando compreender os mecanismos da plasticidade e os processos apoptóticos para a terapia de distúrbios psiquiátricos relacionados ao estresse, avaliaram as alterações moleculares no córtex pré-frontal, após o isolamento social crônico de ratos machos adultos jovens. Os resultados indicaram que a fluoxetina influencia a plasticidade no córtex pré-frontal dos animais, mas não consegue evitar o início da apoptose (DJORDJEVIC *et al.*, 2012). Em outro estudo com desipramina e fluoxetina, em ratos machos de 7 a 10 semanas de idade foi avaliado o metabolismo energético do cérebro. O tratamento *in vivo* levou a modificações no metabolismo energético do córtex cerebral, tais como: aumento da atividade da citocromo oxidase nas mitocôndrias somáticas, diminuição das atividades do malato, succinato desidrogenase e glutamato piruvato transaminase das mitocôndrias sinápticas (VILA, R.F *et al.*, 2016).

O grupo de pesquisa composto por membros do Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e do Exercício (LABMEX), da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), vem desenvolvendo pesquisas sobre a atuação da fluoxetina na bioenergética mitocondrial em tecido central e periférico em idades diferenciadas que geraram dissertações, teses e artigos. Os estudos deste grupo, já apontaram que o uso da fluoxetina durante o desenvolvimento modula de forma positiva a bioenergética mitocondrial e combate o estresse oxidativo.

Da Silva *et al.*, (2015a), observaram que ratos machos adultos tratados com fluoxetina durante a lactação, aumentavam a respiração mitocondrial, sem alterações na permeabilidade do poro mitocondrial, como também a não indução de estresse oxidativo no hipotálamo e no músculo esquelético. Sugerindo assim que, a fluoxetina pode modular positivamente a bioenergética mitocondrial nestes tecidos, perdurando até a vida adulta, e que isso pode contribuir para mudanças permanentes no equilíbrio energético desses animais. Em outro estudo, neste mesmo ano, esse grupo avaliou o estresse oxidativo no hipotálamo e no hipocampo de ratas tratadas com fluoxetina durante a lactação e observaram que o fármaco não resulta em diferença no comportamento alimentar, mas diminui a ansiedade, juntamente com a redução do estresse oxidativo, com aumento na atividade das enzimas antioxidante no hipocampo, sugerindo assim que a proteção ao estresse oxidativo nas células neurais durante o desenvolvimento do cérebro contribui para o efeito ansiolítico da serotonina (Da Silva *et al.*, 2015b).

Braz et al. (2016) avaliando parâmetros cardíacos relacionados à hemodinâmica e ao metabolismo de ratos fêmeas, com 60 dias de vida tratadas com fluoxetina durante a lactação, observou que além de redução de peso nos ratos tratados com fluoxetina, não apresentaram diferenças na pressão arterial, frequência cardíaca (HR), tônus simpático e vagal, ou frequência cardíaca intrínseca. Porém, ao avaliar estresse oxidativo no coração e no tronco encefálico, observou que houve diminuição nos níveis de carbonilas oxidadas de 60,3% no tronco encefálico e de 58,2% no coração dos animais tratados com fluoxetina. Também observaram que o tratamento com fluoxetina induzia um aumento na atividade de algumas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase-SOD (82,7%) e catalase-CAT (23,7%) do tronco encefálico, e a SOD (60,6%) e CAT (40,7%) do coração de ratos tratados. Sugerindo assim que tratamento com fluoxetina em idade precoce não induz prejuízo hemodinâmico, mas modula positivamente o balanço oxidativo em tecidos relacionados ao controle cardiovascular.

5 MITOCÔNDRIAS

Organela onipresente encontrada em quase todas as células eucarióticas. Fornece energia química necessária para as atividades biossintéticas e motoras das células (FAWCETT, 1981). As mitocôndrias são organelas responsáveis pela conversão de energia de oxi-redução para a forma de energia química, necessária para os eventos celulares (INADA *et al.*, 2008), através de β -oxidação de ácidos graxos, Ciclo de Krebs e da cadeia respiratória (BRAND E NICHOLLS, 2011). É o principal sítio celular responsável pela síntese de ATP, associada à oxidação de coenzimas ($\text{NADH}^+ \text{H}^+$ e FADH_2) (NELSON E COX, 2000), sendo também considerada a organela central em processos de sinalização, injúria e morte celular, devido a ação de proteínas e moduladores metabólitos (INADA *et al.*, 2008).

O equilíbrio energético é de extrema importância para o funcionamento bioquímico e fisiológico das células neuronais. Desta forma, qualquer alteração nas estruturas e nas funções das mitocôndrias pode acarretar em danos irreversíveis no funcionamento e até mesmo na morfologia das células neurais.

O trifosfato de adenosina (ATP) é a molécula energética de extrema importância para a manutenção energética e função celular. Nas células neuronais existe uma extensa rede de axônios e dendritos onde as mitocôndrias exercem um papel crucial na distribuição desta energia, devido a sua movimentação nessas áreas dos neurônios. Portanto, foi proposto que alterações neste tráfico devido a disfunções mitocondriais podem estar relacionadas a muitas doenças neuro-degenerativas tais como: Parkinson, Alzheimer, Esclerose lateral amiotrófica, entre outras (BENDISKE *et al.*, 2002; REYNOLDS *et al.*, 2004; TRIMMER e BORLAND, 2005). O transporte mitocondrial é fundamental para a função neuronal adequada (HOLLENBECK & SAXTON, 2005; CHEN, S. *et al.*, 2007).

Por meio dos complexos protéicos, 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 FADH_2 , derivados das reações metabólicas do ciclo de Krebs e da β -oxidação de ácidos graxos (JEZEK & 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 ressíntese de ATP (SKULACHEV, 1980; NELSON & COX, 2008).

Durante a redução monoelétrica do oxigênio à H_2O , na cadeia transportadora de elétrons, há a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), iniciado com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e derivados de sua metabolização por enzimas antioxidantes, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^{\cdot}$) (SIES, 1991; ADAM-VIZI & CHINOPOULOS, 2006). Considerando a formação de EROS em níveis fisiológicos, estima-se que 2-5% do oxigênio consumido da cadeia respiratória seja convertido em EROs. Entretanto, a produção em excesso das EROs causa um desequilíbrio oxidativo favorecendo o acúmulo dessas moléculas em detrimento a capacidade antioxidante de detoxificação dessa superprodução.

Estudos relatam que a serotonina está envolvida na regulação do movimento mitocondrial nas células do túbulo de malpighi em insetos, mobiliza o transporte do receptor NMDA podendo regular o tráfico de proteínas nos neurônios corticais dos ratos (BRADLEY e SATIR, 1981; YUEN *et al.*, 2005). 5-HT também promove o transporte axonal das mitocôndrias nos neurônios ativando a via Akt-GSK3 β , principalmente através do receptor 5-HT1A. Dados da literatura já apontam que as mitocôndrias tendem a acumular-se nas regiões ativas dos neurônios como, por exemplo, os cones de crescimento dos neurônios em desenvolvimento e na protrusão de espinhas neuronais ativas (MORRIS e HOLLENBECK, 1993; LI *et al.*, 2004b).

CHEN, S *et al.* (2007), especularam que alguns dos efeitos conhecidos da serotonina no sistema nervoso podem estar envolvidos na regulação da distribuição de ATP nos neurônios, controlando o tráfico axonal de mitocôndrias em neurônios maduros do hipocampo *in vitro*. Em seu trabalho, os axônios foram monitorados duas horas antes e duas horas depois da administração de 5-HT, um agonista (8-OH-DPAT) e um antagonista (WAY100635) do receptor 5-HT1A. As mitocôndrias foram avaliadas por sua mobilidade, sendo observadas por sua velocidade média e a direção dos seus movimentos. Antes do tratamento, cerca de 70% das mitocôndrias eram estacionárias ou movidas em oscilação de baixa amplitude. Após administração de 5-HT, houve um aumento de 15% na população com movimentação direcional e diminuição de 16% na população com movimentação oscilante, não havendo alteração na população estacionária. Posteriormente ao tratamento com o agonista do receptor 5-HT1A (8-OH-DPAT), houve diminuição de 16% na população de oscilante e aumento de 16% na população com mudança direcional, também sem alteração na população estacionária.

Ao administrar o antagonista de 5-HT_{1A} (i.e. WAY100635), a ausência de 5-HT causou a inibição do movimento mitocondrial direcional, além de não movimentação das mitocôndrias anteriormente móveis sem afetar a população de mitocôndrias oscilantes. Após o tratamento com 8-OH-DPAT, a velocidade média desta população aumentou 115%, em contraste, a administração de WAY100635 resultou em uma diminuição de 43% na velocidade média de todas as mitocôndrias de movimento direcional. Esses resultados sugerem que nos neurônios do hipocampo, a 5-HT modula o transporte mitocondrial nos axônios principalmente através do subtipo do receptor 5-HT_{1A}, podendo assim contribuir significativamente com a disponibilidade de ATP em determinadas áreas do cérebro.

6 ESTROGÊNIOS

Durante um período de reprodução de 30 a 40 anos, começando pela menarca e terminando com a menopausa, as mulheres produzem de forma cíclica uma série de esteróides, proteínas e hormônios polipéptidos curtos, importantes para o início e manutenção da capacidade reprodutiva e o desenvolvimento de características sexuais secundárias. Embora classicamente associados ao seu papel no ciclo reprodutivo feminino, os estrogênios são cada vez mais reconhecidos por suas ações protetoras contra doenças crônicas e degenerativas que afetam o sistema cardiovascular (MURPHY, 2011) e outros sistemas e órgãos que não estão diretamente relacionados à reprodução. Este papel não reprodutivo para os estrogênios pode estar subjacente às vantagens há muito reconhecidas que as mulheres têm sobre os homens na manutenção de sua saúde geral e na obtenção de maior longevidade.

O termo "estrogênio" refere-se a um pequeno grupo de hormônios esteróides importantes no controle do ciclo reprodutivo. Os três principais estrogênios são estrona (E1), 17- β -estradiol (E2) e estriol (E3) que diferem um do outro no número de grupos hidroxil ou cetonas (RYAN, 1982) presentes, mas que exibem em graus variados, os mesmos efeitos sobre órgãos reprodutivos alvo e características sexuais secundárias. O 17- β -estradiol é o estrogênio predominante durante os anos reprodutivos, tanto na sua concentração sérica total quanto na atividade estrogênica geral. A maior parte do estrogênio circulante nas mulheres em período de pré-menopausa é produzida pelos ovários, em grande parte como resultado da secreção das células da granulosa dos folículos em desenvolvimento, e durante a gravidez é complementada pela secreção de estrogênio da placenta. Os estrogênios também são produzidos em pequenas quantidades por vários tecidos periféricos como fígado, glândula adrenal, glândulas mamárias, tecido adiposo e cérebro. Semelhante às células da granulosa ovariana, a expressão da enzima aromatase nesses tecidos permite a conversão local de esteróides C-19, como o androstenediol em estrogênios, embora em níveis muito mais baixos do que no ovário (NELSON, 2001; BARAKAT, 2016).

No período perimenopausal e durante a menopausa, há uma redução maciça na produção de estrogênios devido ao esgotamento dos folículos ovarianos e consequentemente, uma falha das gonadotrofinas (hormônio folículo-estimulante, FSH) e hormônio luteinizante; LH) (FRIEDLANDER, 2002) para manter níveis elevados de circulação do estradiol. Com a eliminação dos estrogênios ováricos na menopausa, a produção extra-ovárica de estrogênios torna-se predominante e o principal estrogênio plasmático durante esse período é a estrona, um estrogênio menos potente que o 17- β -estradiol (MEALEY, 2003).

Uma extensa literatura foi acumulada nas últimas duas décadas apontando para os benefícios neuroprotetivos do estrogênio e apoiando o uso clínico de estrogênio ou compostos estrogênicos no tratamento da doença de Alzheimer, acidente vascular cerebral e outros distúrbios cerebrais crônicos e agudos (ENGLER-CHIURAZZI 2016; WANG, 2002; WANG, 2008; SHIH, 2009; PIERCE, 2009; SUBRAMANIAN, 2011; WU, 2012; ENGLER-CHIURAZZI, 2017).

No entanto, vários trabalhos recentes servem para ilustrar a complexidade do campo e a ampla gama de mecanismos possíveis que foram sugeridos para subjugar a ação neuroprotetiva do hormônio. Estudos clínicos mostraram que a incidência da doença de Alzheimer (AD) é similar entre homens e mulheres, no entanto, na idade avançada, as mulheres parecem ter uma maior incidência de AD do que os homens (PIKE, 2017). O aumento da proporção de AD em mulheres idosas pode ser devido à sua maior expectativa de vida, mas também pode resultar do declínio nos níveis de hormônio esteróide sexual que começa em torno da menopausa (IMTIAZ, 2017), como o declínio precipitado no estradiol sérico elimina o estado "protetor" que existia anteriormente no cérebro feminino, permitindo que os processos neurodegenerativos comecem. Além disso, foi demonstrado que a suplementação de estrogênio em mulheres pós-menopausa ajuda a manter a memória e a cognição no que poderia ser considerado como uma restauração parcial do efeito protetor do E2 no cérebro (GILLIES, 2010).

No entanto, as numerosas investigações sobre os efeitos clínicos da terapia de reposição hormonal a longo prazo (TRH) mostram o aumento no risco de desenvolver câncer, sugerindo que o uso seguro e efetivo de estrogênios como neuroprotetores exigem uma cuidadosa análise dos efeitos nocivos do hormônio e dos benéficos através do tempo, dosagem, método de entrega e o direcionamento seletivo da terapia com estrogênio (por exemplo, usando agonistas de receptor específicos do ER e compostos estrogênicos, como fitoestrógenos) (KEANEY, 2016).

Bellanto et al.(2013) mostraram em um estudo que mulheres que receberam terapia de reposição de estrogênio, o mesmo desempenha um papel importante na regulação do equilíbrio REDOX ao aumentar a expressão de enzimas antioxidantes e restaurar o estado antioxidante geral. Em um estudo prospectivo baseado na população no Japão, os pesquisadores descobriram que as mulheres que começaram a menopausa antes dos 40 anos de idade apresentaram maior risco de sofrer um acidente vascular encefálico do que aquelas que começaram a menopausa após esse tempo (BABA, 2010). Estudos como este suportam o

conceito de que o estrogênio desempenha um papel clinicamente significativo na proteção das mulheres contra doenças cérebro-vasculares estimulando as respostas antioxidantes.

Os mecanismos subjacentes ao efeito protetor mediado pelo papel de modulador antioxidante dos estrogênios contra doenças cardíacas e vasculares foram explorados em vários estudos experimentais que, em conjunto, mostram uma regulação complexa da genética das células cerebrais e função pelo estrogênio. Alguns desses estudos, como o de Marinis et al (2013), enfatizam o papel clássico do estrogênio com um sinal de hormônio esteróide através de receptores de estrogênio nuclear (ER) que regulam a transcrição de genes responsivos a estrogênio. Especificamente, esses autores atribuíram os efeitos benéficos do E2 na redução da apoptose induzida por H_2O_2 no hipocampo e na redução da inflamação em astrócitos corticais primários para a indução de um gene e proteína específicos (neuroglobina) por E2 (DE MARINIS, 2013). Outros estudos apontam para a regulação de genes adicionais compatíveis com E2. Patki et al (2013), observou no hipocampo de ratas com deficiência de E2 por ovariectomia (OVX), que o estresse oxidativo foi aumentado neste órgão e isso, por sua vez, levou a aumento da pressão arterial e ansiedade, acompanhado de incapacidade de aprendizagem e perda de memória (PATKI et al.; 2013),.

Trabalhando também com o hipocampo de ratas OVX, Bernal-Mondragon et al (2013), injetaram beta amiloide 25-35 ($A\beta$ -25-35) no órgão duas semanas após a ovariectomia e descobriram que o estresse oxidativo gerado pela administração de $A\beta$ -25-35 era suficiente para prejudicar o olfato, mas que o defeito olfativo poderia ser evitado administrando E2 antes e depois da injeção de $A\beta$ -25-35. Os autores sugeriram que o efeito protetor do estradiol foi mediado através da regulação da bioenergética mitocondrial (BERNAL-MONDRAGON et al., 2013). Na mesma linha, Rao et al. (2011), ao avaliar o efeito protetor do E2 contra a isquemia, observaram um aumento na atividade da enzima antioxidante SOD1 em neurônios corticais, juntamente com uma redução no dano cerebral induzido por isquemia inversamente proporcional a atividade da SOD1 em ratas fêmeas tratadas com E2 por duas semanas (RAO et al., 2011). Pesquisadores usando um modelo de ratas OVX observaram redução significativa na função cognitiva, diminuição dos níveis de NADH, citocromo C redutase e citocromo C oxidase, estado REDOX e diminuição significativa da atividade das enzimas SOD e CAT no cérebro, comparado com os controles não-OVX (SANDHIR, 2014). Pourganji et al. (2014), avaliando os efeitos da retirada de estrogênio no estado oxidativo do cérebro, usando ratas OVX e ratas OVX estimulados com lipopolisacarídeos (LPS), encontraram níveis elevados de MDA e uma diminuição do tiol total nos animais tratados com o LPS e OVX em comparação com o controle, sugerindo que

níveis normais de E2 oferecem um efeito protetor contra o dano oxidativo induzido por inflamação no hipocampo (POURGANJI et al., 2014).

A especificidade regional do efeito protetor de E2 também é indicada pelos estudos de Harish et al. (2011) que apresentaram níveis mais elevados de GSH em áreas específicas do cérebro feminino (córtex frontal, cerebelo, bulbo, hipocampo e substância nigra) em comparação com homens da mesma idade. Em estudos experimentais com ratas OVX aos 5 e 10 meses de idade, várias das mesmas regiões (córtex, cerebelo e hipocampo), além do corpo estriado, apresentaram altos níveis de estresse oxidativo que foi reduzido aos níveis de controle ou ainda menor com tratamento com E2 (MARTINS, 2012). Outros estudos sugerem diferenças duradouras ou permanentes na função mitocondrial entre machos e fêmeas devido à exposição a diferentes ambientes de estrogênio na maturidade sexual ou a diferenças hereditárias ao nível do cromossomo (MARTINS, 2012).

Pesquisadores descobriram que os neurônios mesencefálicos em cultura, obtidos de camundongos machos são mais vulneráveis a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), uma neurotoxina que destrói os terminais catecolaminérgicos utilizados em um modelo experimental de doença de Parkinson, do que os neurônios mesencefálicos obtidos de camundongos fêmeas. Os autores atribuíram as diferenças de vulnerabilidade ao gênero em 6-OHDA para uma maior produção de ROS em mitocôndrias masculinas em comparação com as femininas, possivelmente devido à regulação E2 *in vivo* da transcrição de genes mitocondriais e nucleares que causa aumento da atividade da corrente elétrica e redução da oxidação estresse e apoptose (MISIAK, 2010). Tao et al. (2012), além disso, usando o mesmo modelo *in vitro* da doença de Parkinson, demonstrou que os neurônios mesencefálicos masculinos são mais vulneráveis do que os neurônios femininos à citotoxicidade induzida por rotenona e que o E2 tem um efeito moderadamente protetor nos neurônios de ambos os sexos. Curiosamente, os autores postulam um mecanismo, geralmente não usual, subjacente a essas diferenças baseadas no gênero, sugerindo que a região determinante do testículo no cromossomo Y (SRY) aumenta a regulação da monoamina oxidase A e diminui a regulação do receptor- β do estrogênio, reduzindo assim a resistência ao estresse oxidativo - morte celular induzida em neurônios derivados de machos em comparação com fêmeas.

Vários estudos analisaram os efeitos diretos do E2 sobre a bioenergética neuronal em áreas específicas do cérebro. Em um estudo avaliando o efeito de E2 no controle do sensor de energia, 5'AMP-ativada proteína quinase (AMPK), no complexo vagal dorsal caudal, Alenazi et al. (2015) demonstraram que vários genes são diferencialmente expressos na presença de E2 e que os produtos desses genes convergem em caminhos de ativação de AMPK que são

semelhantes aos utilizados pelo AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide), um clássico Ativador de AMPK. Outra investigação sobre o efeito de E2 no complexo vagal dorsal caudal por Tamrakar e Briski (2017) mostrou que o E2 induz um aumento na expressão de enzimas do ciclo glicolítico, Krebs, fosforilação oxidativa e beta-oxidação em neurônios A2 metabolo-sensoriais durante a hipoglicemia recorrente. Além disso, os autores observaram que E2 impediu o declínio inadaptado em componentes da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais durante a hipoglicemia recorrente. Tais ações de proteção de E2 sobre os muitos componentes da geração de energia nestes neurônios poderiam contribuir para a resiliência energética ao insulto metabólico nas fêmeas em comparação com os machos (TAMRAKAR, 2017).

Estudos utilizando hibridização e imunohistoquímica têm demonstrado que, dentro dos neurônios do RVLM, ER é detectável tanto como uma transcrição do mRNA (SHUGHRUE, 1997) como a proteína (SHUGHRUE, 1997; SHUGHRUE, 2001; WANG, 2006), tornando esta região uma forte candidata para a transdução da ligação de estrogênio em efeitos sobre homeostasia e doença cardiovascular. A importância do E2 na modulação do reflexo do baroreceptor foi mostrada em estudos realizados tanto em mulheres (SALEH, 1999) quanto em ratas fêmeas OVX suplementadas com estrogênio (SALEH, 2000), em que uma injeção periférica de E2 aumentou a sensibilidade do baroreceptor, uma condição que leva a uma função cardiovascular melhorada. Esses efeitos foram diminuídos em ratos machos e fêmeas por meio de uma injeção central de um antagonista seletivo de ER (SALEH, 1999; SALEH, 2000). Wang e He (2002) estudaram os efeitos do E2 sobre a atividade elétrica dos neurônios do RVLM e mostraram que a injeção intracarótida de E2 diminuiu a taxa de disparo dos neurônios RVLM sem alterar a pressão arterial ou a frequência cardíaca. No entanto, o pré-tratamento com L-NAME, um inibidor de óxido nítrico (NO) sintase atenuou significativamente o efeito inibitório de E2 na taxa de disparo de RVLM, enquanto a 3-morfolinosidnmina, um doador de NO - SIN-1, potencializou o efeito. Esses resultados sugerem fortemente que os efeitos de E2 no RVLM envolvem ativação de NOS e liberação de NO e além disso, as ações do E2 são mediadas através de um mecanismo de sinalização não-transcricional (WANG e HE, 2002).

Um grupo de pesquisadores mostrou um papel particularmente importante para o receptor ER- β nos neurônios RVLM na produção dos efeitos cardioprotetores do E2 descrito acima. Especificamente, o autor mostrou que enquanto tanto E2 como um agonista seletivo do receptor ER β diminuem a pressão arterial sistólica (SAP) e os componentes do espectro vasomotor SAP de uma maneira dependente da dose, um agonista do receptor ER α não tem

efeito (SHIH, 2009). Além disso, o autor mostrou que os efeitos cardiovasculares de ER β no RVLM são dependentes da estimulação iNOS e liberação de óxido nítrico (NO) (SHIH, 2009). Wu et al. (2012), além disso, mostrou que a ligação ER ao ER β no RVLM evoca os seus efeitos pressóricos através de ações não genômicas em vez de ações genômicas, especificamente, ativando a via intracelular PI3K-Akt (WU et al., 2012).

Além de sua modulação dos níveis de NO, o E2 tem sido demonstrado em vários estudos que afetam a função cardiovascular, regulando a transcrição de canais de potássio específicos voltados para a tensão que controlam a corrente transitória de potássio externa (IA) (SAITO, 2009). Saito et al. (2009) observaram o efeito transcricional nas células cardíacas ventriculares, observando que Kv4.3 e Kv1.5, mas não Kv4.2, foram regulados pelo tratamento com E2. Lee et al. (2013), por outro lado, mostraram que o E2 reduz significativamente a expressão do mRNA Kv4.2, mas não o Kv4.3 nos neurônios do RVLM, resultando em uma baixa regulação das densidades das correntes transitórias de potássio externas (IA) e hiperpolarização desses neurônios. Uma vez que os receptores ER, particularmente ER β , são altamente expressos nos neurônios PVN-RVLM (STERN, 2003), parece provável que a regulação dos canais de potássio nesta área constitua um mecanismo subjacente importante para os efeitos benéficos do E2 na função cardiovascular. Outra via suspeita para traduzir os efeitos do E2 no RVLM relacionado a redução de pressão envolve efeitos inibitórios diretos do hormônio na geração ROS em neurônios do RVLM que de outra forma, promoviam um aumento da atividade simpática e conseqüentemente induziriam um estado hipertensivo (KISHI, 2004; OLIVEIRA-SALES, 2008).

Wang et al. (2008), em estudos que associam gênero com risco de doença cardiovascular, mostraram que o RVLM feminino expressa um maior número de receptores de angiotensina II (AT1), mas um menor nível de p47 phox (a subunidade catalítica de NADPH oxidase responsável pela formação de ROS) do que o RVLM masculino, resultando em fluxo de Ca²⁺ alterado através de canais de Ca-tipo L que poderiam traduzir nos efeitos protetores de E2 na pressão sanguínea. Pierce et al. (2009) também estudaram a distribuição dos receptores AT1 e a expressão de p47phox em neurônios pré-simpáticos no RVLM e descobriram que os neurônios femininos possuíam uma concentração significativamente maior de AT1 da membrana e uma expressão significativamente menor de phox p47 na célula membrana e citosol, e sugeriu que esta distribuição poderia estar subjacente às diferenças de gênero observadas na produção de ROS (PIERCE et al., 2009).

Com tudo que pudemos trazer de dados da literatura, nosso estudo teve como foco principal verificar se em machos ocorria uma modulação positiva na bioenergética

mitochondrial do tronco encefálico, induzida pelo tratamento com fluoxetina, de forma similar aos efeitos benéficos observados pelos estrogênios em fêmeas.

7 HIPÓTESE

O presente estudo teve como hipótese que a exposição crônica, no período de 1 a 21 dias, ao inibidor seletivo de recaptação de serotonina em machos promove redução da produção de espécies reativas de oxigênio e aumenta a defesa antioxidante no tronco encefálico de forma semelhante aos efeitos induzidos pelo estrogênio observado nas fêmeas.

8 OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da manipulação serotoninérgica durante a lactação (1º ao 21º dia de vida) sobre a bioenergética mitocondrial, balanço oxidativo e expressão da proteína desacopladora mitocondrial 2 no tronco encefálico de ratos machos e fêmeas aos 60 dias de vida.

8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, no tronco encefálico de machos e fêmeas tratados ou não com fluoxetina:
 - I. Capacidade funcional da mitocôndria:
 - 1. Consumo de oxigênio mitocondrial
 - 2. Capacidade de captação de cálcio
 - II. A produção de espécies reativas mitocondriais;
 - III. Atividade da enzima do ciclo de Krebs (Citrato sintase-CS);
 - IV. Atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dimutase-SOD, catalase-CAT, glutathione-S-transferase-GST);
 - V. Avaliação do Estado REDOX (níveis de Glutathione Reduzida – GSH e Glutathione Oxidada – GSSG);
 - VI. Níveis de grupamentos tióis totais;
 - VII. A expressão gênica de UCP 2.

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. As fêmeas selecionadas (n=8) entre 220-250g foram abrigadas em biotério sob condições padrão de temperatura, iluminação e umidade com água e comida (dieta Labina – Purina S/A) *ad libitum* (VAN ZUTPHEN, 1993). Foram promovidos períodos alternados e regulares de luz e escuridão (12/12 horas), posteriores ao período de adaptação (15 dias) para sincronizar o ciclo circadiano. Após a adaptação, as ratas quando em período estral, foram acasaladas na proporção 1 fêmea para 1 macho. No 1º dia após o nascimento, foram selecionados oito neonatos machos de modo aleatório estando o seu peso entre 6 e 8 gramas, para composição dos grupos experimentais. A manipulação e os cuidados com os animais seguiram as recomendações do COBEA e aprovação do Comitê de Ética em Estudos com Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (23076.015276/2012-56).

9.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

No período de lactação foram formados dois grupos experimentais segundo o tratamento: **Grupo Controle** e **Grupo Fluoxetina**, que foram tratados diariamente com solução salina e fluoxetina, respectivamente, do 1º ao 21º dia pós-natal. Após o desmame os grupos receberam dieta padrão de biotério.

9.3 TRATAMENTO

Farmacológico – Foi utilizado fluoxetina (ISRS) (Sigma), na concentração de 10 mg/Kg de peso corporal (p.c.) (MILLER *et al.*, 2008). A droga foi obtida na forma de cloridrato de fluoxetina e dissolvida em veículo controle, uma solução salina (NaCl) a 0,9%.

Controle – Foi utilizado 10ml/kg p.c. de solução de Cloreto de Sódio (NaCl) à 0,9%.

9.4 VIAS DE MANIPULAÇÃO

O tratamento foi administrado por via Subcutânea (sc) e o horário de manipulação dos animais foi no início do ciclo escuro (8:00 h). O horário de manipulação farmacológica foi mantido durante todo o experimento em concordância com o horário do segundo e maior pico de liberação da serotonina no hipotálamo (SANCHEZ *et al.*, 2008).

9.5 MEDIDA DE PESO CORPORAL

O peso corporal dos filhotes dos filhotes foi mensurado diariamente (g) durante o período de lactação e também aos 60º dias de vida. O peso foi registrado no início do ciclo claro/escuro através da balança eletrônica digital (Marte, modelo S-100 com sensibilidade de 0.01g) (DA SILVA *et al.*, 2015).

9.6 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO E PROCESSAMENTO PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Aos 60 dias de vida os animais, foram decapitados por guilhotina e submetidos à cirurgia para retirada do tronco encefálico. O mesmo foi homogeneizado em tampão de extração (Tris base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; contendo um coquetel de inibidores de protease com a mistura contendo 225mmol/L mannitol, 75 mmol/L sucrose, 1mmol/L EGTA, 4 mmol/L HEPES (pH 7.2). Para quantificação protéica e avaliação da atividade enzimática, as amostras foram centrifugadas a 1.000 rpm, a 4° C, por 10 minutos e utilizou-se o sobrenadante para dosagem proteica.

9.7 DOSAGEM DE PROTEÍNA

A concentração de proteína da suspensão do tecido foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância foi considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

9.8. MEDIDA DO CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL

O consumo de oxigênio mitocondrial foi medido polarograficamente utilizando um eletrodo do tipo OXIGRAPH conectado a um oxígrafo (Hansatech Instrument), em uma

câmara de vidro fechada (1 mL) e termostatizada (28°C), equipada com agitador magnético (ROBINSON; COOPER, 1970), utilizando mitocôndrias isoladas (0,5 mg de proteína/mL). Esse tipo de eletrodo compreende um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos numa solução eletrolítica (geralmente KCl). A superfície do cátodo é revestida por uma fina membrana de teflon ou polietileno, que são permeáveis ao oxigênio. Quando uma pequena voltagem é aplicada entre os eletrodos, a platina torna-se negativa em relação à prata, tornando-se polarizada. O oxigênio é então reduzido a peróxido de hidrogênio na superfície da platina, funcionando comoceptor de elétrons.

A corrente gerada pela diferença dos eletrodos é relacionada estequiometricamente à concentração de O₂ na superfície do cátodo. Os impulsos elétricos foram transmitidos ao oxígrafo, onde foi realizada a leitura.

9.9. PRODUÇÃO MITOCONDRIAL DE ESPÉCIES REATIVAS

A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) pelas mitocôndrias isoladas foi determinada fluorimetricamente através da oxidação do H₂DCF-DA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína, 5 μM) (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), utilizando mitocôndrias isoladas (0,5 mg de proteínas/mL). A fluorescência foi monitorada ao longo do tempo em um espectrofluorímetro (Fluostar Omega, USA). Usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente, com largura de fenda de 5 nm (LEBEL *et al.*, 1942; GARCIA-RUIZ *et al.*, 1997) Os resultados foram expressos em unidades de fluorescência (U.F.).

9.10 CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DE CÁLCIO

O acompanhamento espectrofotométrico da redução da absorbância a 520 nm foi feito em espectrofotômetro modelo Libra S12 da empresa BICHROM utilizando mitocôndrias isoladas (1 mg de proteína/mL) com ou sem o desafio de cloreto de cálcio a 20 μM. Essa técnica também pode ser utilizada para avaliar o fenômeno de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (TPM), o qual resulta em inchamento da organela (VERCESI *et al.*, 1988).

9.11 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CITRATO SINTASE (CS)

A atividade enzimática foi determinada conforme descrito por da SILVA et al., 2015). Resumidamente, foi feita uma reação contendo (em mM) 100 Tris-HCl (pH 8,2), 1 MgCl_2 , 1 EDTA, 0,2 5,5-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) ($\epsilon = 13,6 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 3 acetil-CoA, 5 oxaloacetato e 0,3 mg / ml de homogeneizado. A atividade da CS foi medida avaliando a taxa de alteração na absorbância a 412 nm, durante 3 min (intervalos de leitura de 30 s), os resultados foram expressos em U/mg prot.

9.12 MEDIDA DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Para a quantificação da peroxidação lipídica, foi realizada a dosagem do TBARS através da técnica colorimétrica de Buege & Aust (BUEGE and AUST, 1978). Colocou-se uma alíquota do homogenizado (0,3 mg / mL), de ácido tricloroacético a 10% e de ácido tiobarbiturico que reage com os produtos da lipoperoxidação para formar um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e em seguida resfriada. Na sequência, foi adicionado n-butanol e as amostras agitadas por 30 segundos, com o objetivo de extrair o pigmento formado. O material foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, sendo então a fase com o n-butanol utilizada para a leitura da absorbância a 535nm, utilizando cubetas de quartzo. Os resultados foram expressos em μmoles de TBARS por mg de proteína.

9.13 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CARBONILAS

Para analisarmos o grau de oxidação das proteínas, foi quantificado os níveis de carbonilas segundo Levine (Levine et al., 1990). Os grupos carbonilas reagem com o 2,4-dinitrophenil-hyrazina (DNPH). Utilizando o homogenato com concentração 0,3 mg de amostra por ml, junto ao ácido tricloroacético a 30%. O DNPH a 10nM e a guanidina 6M foram diluídos em HCL 2,5M em temperatura ambiente. Os valores de absorbância foram obtidos a 380 nm e expressos em μmoles de carbonilas/mg de proteína.

9.14 ATIVIDADE ENZIMÁTICA: SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada através do método de auto-oxidação da adrenalina, podendo ser medido em espectrofotômetro a 480nm. Em uma cubeta de quartzo de 1mL, adicionou-se tampão fosfatocom pH 10,2, amostra (0,3 mg / ml). A absorbância foi registrada

por um período de aproximadamente 3 minutos em temperatura de 37°C. Os resultados foram expressos em U/ mg de proteína (Misra & Fridovich, 1972).

9.15 ATIVIDADE ENZIMÁTICA: CATALASE (CAT)

A atividade da catalase foi medida através da avaliação do consumo de peróxido de hidrogênio pelo decréscimo na absorção a 240 nm, absorbância por 3 minutos. 0.3 mol/L H_2O_2 foram adicionado a uma mistura contendo 0.3mg/mL de um meio de reação e 50mmol/L contendo tampão fosfato,(pH=7,4) e H_2O_2 . Os resultados foram expressos em U/mg de proteína (AEBI, 1989).

9.16 ATIVIDADE ENZIMÁTICA: GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A atividade da GST foi quantificada com o total de 0,3 mg/mL de proteína, onde a mesma se combina com o produto tóxico CDNB e com a GSH para que a bomba de glutatona o jogue para fora da célula, quantificando assim sua atividade. Uma unidade é a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de DNP-SG por minuto a 30 °C, usando 1mM de concentração de GSH e CDNB (HABIG, 1974).

9.17 ESTADO REDOX (GSH/GSSG)

O meio de ensaio foi composto por tampão fosfato 0,1M (pH 8,0) contendo EDTA (5mM) e amostra (0,3 mg/ mL de proteínas), o qual foi incubado com o-Phthaldialdehyde (OPT) (1mg/mL) em temperatura ambiente por 15 minutos. Depois de incubado, o ensaio teve sua fluorescência verificada em um comprimento de excitação e emissão de 350nm e 420nm, respectivamente. Para a determinação dos níveis de GSH, as amostras foram comparadas a uma curva padrão de GSH com conhecidas concentrações.

Para a determinação dos níveis de GSSG, as amostras foram primeiramente incubadas com N-ethylmaleimida (NEM) (0,04M) por 30 minutos a temperatura ambiente seguido da adição do tampão NaOH (0,1M) ao meio. Após esse procedimento, as amostras também foram incubadas com o-Phthaldialdehyde (OPT) (1mg/mL) em temperatura ambiente por 15 minutos e tiveram sua fluorescência comparada a uma curva de concentrações conhecidas de GSSG. O estado REDOX foi determinado pela razão GSH/GSSG com previamente descrito (HISSIN e HILF, 1976).

9.18 AVALIAÇÃO DE NÍVEIS DE TIÓIS TOTAIS

A quantificação dos grupos tióis foi baseada na redução do 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic ácido) (DTNB, 10mM) por tióis, gerando um derivado de cor amarela (TNB). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 412nm. Os valores foram expressos em mmol/mg de proteínas (AKSENOV & MARKSBERY, 2001).

9.19 EXPRESSÃO DO mRNA DE GENES UCP2 VIA RT-PCR

- A extração de RNA

O RNA total foi obtido pelo método de extração com isotiocianato de guanidina usando o reagente Trizol. Inicialmente os tecidos foram lisados usando Triol, depois de 5 minutos de incubação, à temperatura ambiente, foi acrescentado clorofórmio e foram centrifugados a 1200g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, adicionados de isopropanol gelado e depois incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e realizada nova centrifugação a 12000 g por 10 minutos. O RNA formado foi então lavado com etanol a 75% e centrifugado a 7000g por 5 minutos. O sedimento do RNA (pellet) foi então ressuspensão em água livre de RNase e armazenado. A quantificação do RNA foi realizada em duplicata diluindo as amostras 1:50 em água isenta de RNase. A absorbância da amostra foi determinada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas). Para a análise da pureza de RNA, o valor da absorbância obtido a 260nm foi dividido pelo obtido a 280 nm e a amostra que apresentavam a razão de 260/280 igual ou superior a 1.8, foram utilizadas (indicativo de alto grau de pureza) (LAGRANHA *et al.*, 2007).

- Desenho das sequências dos “primers”

As sequências dos primers foram obtidas utilizando o programa “Primer-BLAST” a partir das sequências completas dos genes, através das informações contidas no banco gênico do National Center for Biotechnology Information (NCBI) acesso via internet a partir do número de acesso para cada gene.

Tabela 2. *Primers* usados para as análises de RT-PCR.

Gene	Forward primer (5'- 3')	Reverse primer (5'- 3')
UCP2	TACTCTCCTGAAAGCCAACC	GCTGCTATAGGTGACAAAC
B2M	TGACCGTGATCTTTCTGGTG	ACTTGAATTTGGGGAGTTTTCTG

As reações foram realizadas para cada grupo de “*primers*” e todos os parâmetros foram avaliados utilizando concentrações constantes de RNA e seguindo as normas do fabricante do Kit SuperScriptIII® SYBR® GREEN One-StepqRT-PCR (Invitrogen, USA). Usando também a expressão do gene B2M como o gene normalizador para cada amostra e a quantificação da expressão foi de acordo com o cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK e SCHMITTGEN 2001; PFAFFL, 2001).

9.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados segundo a normalidade da distribuição. Os dados que apresentaram-se dentro da distribuição gaussiana foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). Estes dados foram analisados pelo teste ANOVA-2way. Foi adotado o nível de significância de 5% em todos os casos. A construção do banco de dados e as análises estatísticas foram desenvolvidas no programa Excel (versão 2007, Microsoft, USA) e Graphpad Prisma 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), respectivamente.

10 RESULTADOS

10.1 Artigo Original submetido a *European Journal of Neuroscience* (QualisA2)

European Journal of Neuroscience



Serotonin transporter inhibition during neonatal period induces sex-dependent effects on mitochondrial bioenergetics in the rat brainstem

Journal:	European Journal of Neuroscience
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva, Tercya Lucidi; Universidade Federal de Pernambuco, Neuropsychiatry and Behavioral Science Graduate Program Braz, Glauber; UFPE, Biochemistry and Exercise Biochemistry Silva, Severina Cassia; UFPE-CAV, Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry Pedroza, Anderson Apolonio; UFPE-CAV, Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry Freitas, Cristiane; UFPE-CAV, Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry da Silva, Aline Isabel; Universidade Federal de Pernambuco, Neuropsychiatry and Behavioral Science Graduate Program Lagranha, Claudia; UFPE-CAV, 1Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry
Key Words:	Fluoxetine, oxidative phosphorylation, UCP 2, brain

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 Serotonin transporter inhibition during neonatal period induces sex-dependent effects on
2 mitochondrial bioenergetics in the rat brainstem

3

4 Tercya Lucidi Araujo Silva^a, Glauber Rudá Feitoza Braz^a, Severina Cassia de Andrade
5 Silva^b, Anderson Apolônio da Silva Pedroza^b, Cristiane de Moura Freitas^b, Aline Isabel
6 da Silva^a; Claudia Jacques Lagranha^{a,b*}

7

8 ^a *Neuropsychiatry and Behavioral Science Graduate Program, Federal University of*
9 *Pernambuco, Recife, Brazil.*

10 ^a *Biochemistry and Physiology Graduate Program, Federal University of Pernambuco,*
11 *Recife, Brazil;*

12

13 Running title: Gender differences on fluoxetine treatment

14 *Corresponding author: Rua Alto do Reservatório, s/n – CEP: 55608-680 – Núcleo de
15 Educação Física e Ciências do Esporte – Bela Vista – Vitória de Santo Antão, PE –
16 Brasil. Tel./Fax: +00 55 81 35233351. lagranha@hotmail.com.

17 Total number of pages: 43; number of figures: 6

18 Total number of words in: (i) the whole manuscript: 10.204; (ii) the Abstract: 176

19 **Keywords:** Fluoxetine; oxidative phosphorylation; UCP 2; brain;

Abstract

21

22 The serotonin reuptake is mainly regulated by the serotonin transporters
23 (SERTs), which are abundantly found in the raphe nuclei, located in the brainstem.
24 Previous studies have shown that dysfunction in the SERT have been associated with
25 several disorders, including depression and cardiovascular diseases. In this manuscript,
26 we aimed to investigate how gender and a serotonin selective reuptake inhibitor (SSRI)
27 could affect mitochondrial bioenergetics and oxidative stress in the brainstem of male
28 and female rats. Fluoxetine, our chosen SSRI, was used during the neonatal period (i.e.
29 from post-natal day 1 to post-natal day 21 - PND1 to PND21) in both male and female
30 animals. Thereafter, experiments were conducted in adult rats (60 days old). Our results
31 demonstrate that during lactation, fluoxetine treatment modulates the mitochondrial
32 bioenergetics in a sex-dependent manner, such as improving mitochondria function in
33 the mitochondria of male rats. These findings can be useful in clinical settings, as the
34 information can be used to tailor prevention education programs, and possibly assist
35 clinicians to prevent neurogenic cardiac dysfunction, a condition more prevalent in
36 males than females.

37

38

39

40

41

42

43

44

45 **1. Introduction**

46 It is well known that only 2% of total body serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) is produced in the central nervous system (Halliday *et al.*, 1995). However, this
47 neurotransmitter has an essential role in several functions, including: neurogenesis,
48 neuronal differentiation, synaptogenesis, regulation of stress, anxiety and food intake
49 (Rapport *et al.*, 1948; Whitaker-Azmitia *et al.*, 1996; Whitaker-Azmitia, 2001; Heisler
50 *et al.*, 2007; Lam & Heisler, 2007; Lam *et al.*, 2008). The majority, if not the total
51 amount, of serotonin produced in central the nervous system comes from neurons in the
52 raphe nuclei located inside of the brainstem, which also assist in the regulation of
53 autonomic functions (Henderson *et al.*, 2000).

54 The serotonin reuptake is mainly regulated by the serotonin transporters
55 (SERTs), which are greatly found in the raphe nuclei (Descarries *et al.*, 1982). Previous
56 studies have shown that dysfunction in the serotonin reuptake transporter (SERT) gene
57 has been associated with several disorders, including depression (Caspi *et al.*, 2003;
58 Gainetdinov & Caron, 2003) and cardiovascular diseases (Cote *et al.*, 2004). SERT is
59 the target of several serotonin selective reuptake inhibitors (SSRIs), and according to
60 Benmansour *et al.* (2002), SERT expression is down-regulated in the presence of SSRIs
61 (Benmansour *et al.*, 2002). Although these findings are controversial, Maciag *et al.*
62 (2006) demonstrated that chronic treatment with citalopram (i.e. another SSRI) in adult
63 rats didn't induce differences in the expression of SERT (Maciag *et al.*, 2006).
64 However, recent research has indicated that neonatal exposure to fluoxetine, another
65 SSRI, increases SERT gene expression and protein content in the hypothalamus of
66 animals at 21 and 40 days of life (Pinheiro *et al.*, 2017). Additionally, adult rats treated
67 with fluoxetine during a 3-day period did not display any alteration on the SERT gene
68 expression in any of the dorsal raphe nucleus located in the midbrain (Gomez & Garcia-

70 Garcia, 2017). Therefore, these data indicate that the serotonergic system is highly
71 sensitive and can be modulated by several factors and/or experimental conditions.

72 Furthermore, though the brainstem is small, this crucial brain structure is
73 receiving greater attention due to its central role in controlling arterial blood pressure.
74 The modulation of sympathetic neurons has been shown to be crucial for maintaining
75 vasomotor tone (Marina *et al.*, 2011; Marina *et al.*, 2015). According to the Center for
76 Disease Control and Prevention (CDC) associated with the U.S. Department of Health
77 & Human Services, high blood pressure substantially increases the risk for heart disease
78 and stroke (CDC & Centers for Disease Control and Prevention, 2015). High blood
79 pressure was also considered the primary or a contributing cause of death for more than
80 410,000 Americans in 2014, as well as the leading cause of death in the USA (CDC &
81 Centers for Disease Control and Prevention, 2015). According to the American Heart
82 Association (Go AS, 2013), although a greater percentage of men than women have
83 high blood pressure at the age of 45, between the ages of 45 – 64 years, the gender-
84 related effect on blood pressure is largely eliminated. In addition, after 65 years of age,
85 there is a higher prevalence of elevated blood pressure in women than in men (Go AS,
86 2013). Interestingly, this reversal of gender-related risk for high blood pressure after the
87 age of 64 can be due to the decline in the amount of steroid hormones that women
88 usually experience after menopause (i.e. the menopause effect) (Lisabeth & Bushnell,
89 2012; Kim *et al.*, 2015).

90 Previous studies have shown that low expression of SERT is linked with
91 increased risk of weight gain and the occurrence of type 2 diabetes (Sookoian *et al.*,
92 2008; Iordanidou *et al.*, 2010); comorbidities often associated with the presence of high
93 blood pressure (Bozkurt *et al.*, 2016). Recently, a study from Zha *et al* (2017) revealed
94 that the deficiency of SERT leads to adiposity and abnormal glucose metabolism

95 through estrogen suppression *in vivo*. These authors postulate that estrogen suppression
96 provides a novel causal relationship between the deficiency of SERT and the
97 development of metabolic abnormalities (Zha *et al.*, 2017).

98 On the basis of all the aforementioned findings, we therefore hypothesized that
99 SSRI inhibition during brain development has gender-related effects on male and
100 female rats, as well as improves mitochondrial bioenergetics in male rats. To test our
101 hypothesis, we evaluated the effects of a treatment with fluoxetine (10mg/kg BW)
102 during the neonatal period (i.e. from post-natal day 1 to post-natal day 21 - PND1 to
103 PND21) in male and female adult rats (60 days old). In summary, this experimental
104 design was chosen to demonstrate potential gender-related effects of this treatment on
105 mitochondrial function and oxidative status on the rat brainstem.

106

107 2. Material and Methods

108 2.1 Animals

109 Six female *Wistar* rats were mated (2 female:1 male) and maintained at room
110 temperature of 23 ± 1 °C, on a light-dark cycle of 12:12h, with free access to water and
111 food. The pregnancy was determined through the spermatozoa presence in a vaginal
112 smear. Twenty-four hours after birth, male and female rat pups were randomly assigned
113 to groups containing 8 pups per litter. All experiments were carried out in accordance
114 with the National Institute of Health guide for animal experimentation and endorsed by
115 the Ethical Committee of the Bioscience Center of the Federal University of
116 Pernambuco (23076.015276/2012-56).

117

118 2.2 Pharmacological treatment and experimental groups

119 To avoid the influence of the circadian rhythm on the results, the fluoxetine or
120 saline solutions were administered at the same time of day; between 7:00 and 8:00 a.m.,
121 for the duration of study. Both experimental groups received one single subcutaneous
122 injection of 10 ml/kg bw/day, with either fluoxetine (10mg/kg bw/day dissolved in
123 saline solution; Fx group), or vehicle solution (NaCl 0.9%; Ct group). The fluoxetine or
124 saline solutions were administered from the 1st to 21st postnatal day (i.e., suckling
125 period) (Sanchez *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2014).

126

127 **2.3 Body weight evaluation**

128 Body weights were measured at 7th, 14th and 21st day of life, as well as
129 immediately before euthanasia at 60 days of age. Body weights were recorded using an
130 analytical scale (S-400 with a capacity of 400 grams and a readability of 0.01 grams).
131 (da Silva *et al.*, 2014; da Silva *et al.*, 2015a; da Silva *et al.*, 2015b; Braz *et al.*, 2016a;
132 Braz *et al.*, 2016b; Pinheiro *et al.*, 2017)

133

134 **2.4 Necropsy procedures and Tissue preparation**

135 The rats were sacrificed by decapitation at 60 days of age. Immediately after
136 decapitation, the brainstems were removed in less than 30 seconds. Half of the
137 experimental groups' brainstems were used for immediate mitochondrial assays, and the
138 second half of the group's brainstems were stored in -80°C for further biochemical,
139 molecular biology or DNA analysis.

140

141 **2.5 Mitochondrial isolation**

142 At 60 days of age, the animals were sacrificed by decapitation, and brainstems
143 were quickly removed as aforementioned. To perform the mitochondrial isolation, the

144 brainstem samples were then homogenized in an ice-cold mitochondrial buffer,
145 containing 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 4 mM HEPES and 1 mM EGTA (pH
146 7.2), and submitted to differential centrifugations, as previously described (da Silva *et*
147 *al.*, 2015a; Ferreira *et al.*, 2016). The pellet was re-suspended in a buffer containing 250
148 mM sucrose and 5 mM HEPES (pH 7.2). An aliquot of mitochondria was used for
149 spectrophotometric determination of protein content, according to the Bradford assay
150 (Bradford, 1976).

151

152 **2.6 Mitochondrial oxygen consumption**

153 The analysis of mitochondrial respiration was performed in a 600 SL chamber
154 connected to a Clark-type oxygen electrode (Hansatech Instruments, Pentney King's
155 Lynn, UK) at 28 °C. Mitochondria were incubated at 0.500 mg protein/mL, in a
156 respiration buffer containing 120 mM KCl, 5 mM MOPS, 1 mM EGTA, 5 mM KH₂PO₄
157 and 0.2% BSA. Mitochondrial respiration was measured with complex I (10 mM
158 glutamate/2 mM malate) substrates, 0.5 mM ADP, 1.2 mM oligomycin and 1 mM
159 CCCP (da Silva *et al.*, 2015a; Ferreira *et al.*, 2016). The results were expressed as nmol
160 O₂/min/mg protein.

161

162 **2.7 Mitochondrial reactive species production**

163 The mitochondrial RS production was measured using a fluorescent probe
164 DCFDA (5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl
165 ester). Freshly isolated mitochondria (0.100 mg protein/mL) were incubated in a
166 respiration buffer (pH 7.2 at 28 °C) with complex I substrates and 5 µM DCFDA. The
167 fluorescence was monitored during 5 min of gentle shaking at 485 nm excitation and
168 525 nm emission via fluorescence spectrophotometry (FLUOStar, OMEGA, USA). The

169 results were expressed according to the calculation of the slope from the linear portion
170 of the area under the curve (da Silva *et al.*, 2015b; Ferreira *et al.*, 2016).

171

172 **2.8 Mitochondrial swelling**

173 Mitochondrial swelling was determined as previously described (Blattner *et al.*
174 2001). The opening of the mitochondrial pores causes mitochondrial swelling, which is
175 measured spectrophotometrically as a decrease in absorbance at 520 nm. Isolated
176 mitochondria were added to buffer (120 mmol KCl, 4 mmol HEPES, 5 mmol KH_2PO_4 ,
177 and 0.2% BSA, pH 7.4) with a final protein concentration of 0.100 mg protein/ml. Pore
178 opening was induced by addition of CaCl_2 (20 μmol) and evaluated using complex I
179 substrates (da Silva *et al.*, 2015b).

180

181 **2.9 Tissue preparation for oxidative balance and antioxidant analysis**

182 Brainstems were quickly removed from the freezer and homogenized in 50 mM
183 TRIS and 1 mM EDTA (pH 7.4) cold buffer with addition of 1 mM sodium
184 orthovanadate and 200 $\mu\text{g/mL}$ phenylmethanesulfonyl fluoride. The homogenates were
185 centrifuged at 1180g for 10 min at 4 °C. The resultant supernatant was used for the
186 subsequent analysis after determination of protein concentration, using the Bradford
187 method (Bradford, 1976).

188

189 **2.10 Measurement of Citrate Synthase (CS) activity**

190 CS activity was analyzed according to the methodology described by Le Page *et*
191 *al.* (2009). The analyses were performed in a reaction mixture, containing 100 mM Tris-
192 HCl (pH 8.2), 1 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0.2 mM 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)
193 ($\epsilon = 13.6 \text{ mmol/mL.cm}^{-1}$), 3 mM Acetyl-CoA, 5 mM oxaloacetate and 300 μg of

194 protein (Le Page *et al.*, 2009). The CS activity was measured by assessing the rate of
195 change in absorbance at 412 nm over a 3-minute period. Then, the results were
196 expressed as U/mg protein (da Silva *et al.*, 2015b).

197

198 **2.11 Evaluation of lipid peroxidation**

199 The lipid peroxidation was evaluated through the utilization of the calorimetric
200 technique of Buege and Aust (1978) for detection of the levels of thiobarbituric acid
201 reactive substances (TBARS) (Buege & Aust, 1978). Equal amounts of 30%
202 trichloroacetic acid (w/v) and 3 mM of Tris-HCl buffer were added to the sample
203 (300µg protein). After centrifugation, 2,500g for 10 min, the supernatant was mixed
204 with 0.73% thiobarbituric acid and boiled for 15 min. The pink pigment yielded was
205 measured spectrophotometrically at 535 nm, at room temperature. The results were
206 expressed as nmol of MDA/mg protein (Braz *et al.*, 2016a; Ferreira *et al.*, 2016).

207

208 **2.12 Evaluation of protein oxidation**

209 The protein oxidation was performed per Levine *et al* (1990). The samples were
210 centrifuged 664g with 30% trichloroacetic acid (w/v) for 15 min. 10 mM 2,4-
211 dinitrophenylhydrazine (DNPH) was added to the samples (300 µg of protein) and
212 immediately incubated in a dark room for 1 hour. The mix was centrifuged again at
213 1,180g, followed by the addition of 6 M Guanidine hydrochloride to the pellet and 30
214 min at RT incubation. The samples were measured at 370 nm. Then, the results were
215 expressed as nmol of Carbonyl/mg protein (Levine *et al.*, 1990).

216

217 **2.13 Superoxide dismutase (SOD) activity**

218 SOD activity was evaluated through the inhibition of epinephrine auto-oxidation
219 method described by Misra and Fridovich (1972). Briefly, 150 mM of epinephrine was
220 added into a reaction mix containing 100 mM carbonate buffer (pH 10.2), 5 mM EDTA
221 and 300 µg of protein. Then, the enzymatic kinetics were analyzed during a 2 minute
222 period at 480 nm (Misra & Fridovich, 1972). The results were expressed as U/mg
223 protein (Braz *et al.*, 2016a; Ferreira *et al.*, 2016).

224

225 **2.14 Catalase (CAT) activity**

226 CAT determination was performed in accordance with the Aebi's protocol
227 (1984), wherein the enzymatic kinetics of H₂O₂ decomposition was analyzed for 3 min
228 at 240 nm. The assay contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 300 mM H₂O₂ and
229 300 µg of protein (Aebi, 1984). The results were expressed as U/mg protein (Braz *et al.*,
230 2016a; Ferreira *et al.*, 2016).

231

232 **2.15 Glutathione-S-transferase (GST) activity**

233 The activity of GST was measured with a total of 300 µg of protein, as described
234 by Habig (1974). The principle of the assay is based on the determination through
235 absorbance spectroscopy of the conjugation of 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene
236 (CDNB) with 1 mM reduced glutathione (GSH) in a 100-mM potassium phosphate
237 buffer (pH 6.5). Absorbance was measured at 340 nm at 30 °C. One enzyme unit
238 conjugates 10 nmol of CDNB with GSH per minute (Habig *et al.*, 1974). The results
239 were expressed as U/mg protein (Braz *et al.*, 2016a; Ferreira *et al.*, 2016).

240

241 **2.16 Measurement of REDOX state**

242 To measure the redox state, we measured both reduced and oxidized
243 glutathiones. The levels of reduced glutathione (GSH) were evaluated by adding 100
244 mM phosphate buffer (pH 8.0) with 5 mM ETA to the samples (with a final protein
245 concentration of 0.300 mg protein/ml), followed by a period of 15 minutes in incubation
246 with O-Phthaldehyde (OPT) (1 μ m) at RT. Fluorescence intensity was measured at 350
247 nm (excitation) and 420 nm (emission), and compared with a standard GSH curve (0.5 –
248 100 μ M). The oxidized glutathione (GSSG) levels were evaluated by incubation of
249 samples with 40 mM N-ethylmaleimide for a period of 30 minutes in RT, followed by
250 addition of 100 mM NaOH buffer. Afterwards, the same steps of the GSH assay were
251 followed to determine the GSSG levels. The Redox state was determined by the ratio of
252 GSH/GSSH (Hissin & Hilf, 1976). Data were expressed as mmol/mg prot.

253

254 **2.17 Total thiol groups**

255 The measurement of total thiol groups consisted of a cold extraction buffer (50 mM
256 Tris base, pH 7.4; 1 mM EDTA; 2 mM PMSF, 10 mM sodium orthovanadate) added to
257 the samples, followed by incubation with 10mM 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
258 (DTNB) at RT under a dark cover for a period of 30 minutes. The samples were
259 measured at 412 nm as described by Ellman(Ellman, 1959).

260

261 **2.18 Uncoupling protein 2 Gene expression**

262 Total RNA was isolated by a single step of guanidinium isothiocyanate/phenol
263 extraction, utilizing TRIzol RNA isolation reagent (Invitrogen, USA), according to the
264 manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured and RNA purity
265 checked (A260/280 ratio between 1.8 and 2.0) with a spectrophotometer (Thermo

266 Fisher Scientific, USA). Samples were treated with DNase to avoid DNA
267 contamination.

268 Three hundred nanograms were used for Real-time PCR analysis. PCR was
269 performed in a 15- μ L reaction mixture, containing 7.5 μ L 2x SYBR Green Reaction
270 Mix (Invitrogen®), 0.3 μ L each primer (10 pmol), 0.3 μ L Super Script III RT/Platinum
271 Taq Mix (10 pmol/ μ L), and 6.6 μ L samples in DEPEC water. Gene-specific primers
272 were used. Rat primers: UCP2: sense TACTCTCCTGAAAGCCAACC, antisense
273 GCTGCTCATAGGTGACAAAC; Beta-2 microglobulin (β 2M) gene was used as
274 reaction control: sense-ACCTGAATTTGGGAGTTTCTG, antisense-
275 TGACCGTGATCTTTCTGGTG (Matouskova *et al.*, 2014). Reactions were performed
276 using Rotor-Gene Q (Qiagen, USA).

277

278 **2.19 Statistical analysis**

279 The Kolmogorov-Smirnov test was utilized to evaluate data normality. If
280 assumptions for parametric tests hold, two-way ANOVA was used to assess the
281 differences between groups, followed by Tukey test. Comparisons were performed
282 using GraphPad Prism® software (GraphPad Software Inc., v.6, La Jolla, CA, USA).
283 Results were expressed as Mean $\pm$ SEM. All values were considered significant if $p <$
284 0.05.

285

286 **3. Results**

287 **Body weight**

288 At 21 days-old, male or female rats treated with Fx during lactation displayed
289 decreased body weight (Male Ct: 52.4 ± 1.3 g vs. Fx: 41.3 ± 0.7 g, $p < 0.01$; Female Ct:
290 48.7 ± 1.65 vs. Fx: 40.5 ± 1.0 g) (Figure 1). On the other hand, 60 days-old male or

female rats previously treated with Fx during lactation displayed significantly lower body weights. However, there was a greater decrease in female's body weight when female Fx was compared to male Fx (Male Ct: 218.2 ± 14.1 vs. Fx: 193.6 ± 15.5 g, $p < 0.001$; Female Ct: 180.4 ± 4.0 vs. Fx: 160.4 ± 2.2 g, $p < 0.01$; Male Ct: 218.2 ± 14.1 vs. Female Ct: 180.4 ± 4.0 g, $p < 0.0001$; Male Fx: 193.6 ± 15.5 g vs. Female Fx: 160.4 ± 2.2 g, $p < 0.0001$) (Figure 1).

Mitochondrial Bioenergetics

When assessing mitochondrial oxygen consumption with complex I substrate, we observed that female rats presented lower State 2 when compared to State 2 obtained from the male rat mitochondria (Male State 2 Ct: 7.3 ± 1.7 vs. Female State 2: 1.57 ± 0.5 nmol O_2 /min/mg prot, $p < 0.05$; Male Fx: 9.23 ± 3.40 vs. Female Fx: 1.95 ± 0.3 nmol O_2 /min/mg prot, $p < 0.05$). Although, when we compared State 3, only male rats displayed a significant increase induced by Fx treatment (Male Ct: 13.5 ± 2.5 vs. Fx: 37.6 ± 6.8 nmol O_2 /min/mg prot, $p < 0.05$; Female Ct: 11.2 ± 2.6 vs. Fx: 20.0 ± 2.0 nmol O_2 /min/mg prot) (Figure 2). Additionally, only the male rats previously treated with Fx displayed increased respiratory control ratio (Male Ct: 3.4 ± 0.8 vs. Fx: 9.3 ± 1.0 , $p < 0.01$; Female Ct: 6.0 ± 0.7 vs. Fx: 8.5 ± 1.0) (Figure 2). Moreover, we evaluated the citrate synthase (CS) activity, because CS is both an important regulator of Krebs cycle and an essential marker of mitochondrial oxidative capacity. There was an increase of 25% in the CS activity in the Fx group, as compared to the Ct group (Ct: 10.0 ± 0.6 vs. Fx: 12.5 ± 0.76 U/mg prot, $p < 0.05$). However, no significant differences were observed in female rats (Ct: 7.5 ± 0.2 vs. Fx: 8.4 ± 0.3 U/mg prot) (Figure 3A).

In the mitochondrial bioenergetics, another important mechanism is the control of the proton leak involved in uncoupling substrate oxidation and ATP synthesis. Proton

leak can be mediated by uncoupling proteins (UCPs). It is also possible to estimate that proton leak contributes to approximately 25% of the standard metabolic rate. Therefore, the functions of UCPs include thermogenesis, decreasing the production of reactive oxygen species (ROS), energy balance and metabolic regulation (Brand & Esteves, 2005). Our results regarding the UCP 2 in the brainstem of male and female animals demonstrated that Fx treatment induced an expressive increase in the UCP 2 expression (Male Ct: 1.0 ± 0.4 vs. Fx: 3.5 ± 0.4 , $p < 0.001$; Female Ct: 1.9 ± 0.4 vs. Fx: 9.3 ± 0.1 , $p < 0.001$) (Figure 3B). Besides the analysis of UCP function, it was important to determine the amount of ROS that was produced, and our results demonstrated that Fx treatment induced a decrease of approximately half ROS production by the mitochondria in the male brainstem (Male Ct: 15.8 ± 2.4 vs. Fx: 6.0 ± 1.0 AUC, $p < 0.01$). Interestingly, our female control group produced less ROS than our male control group (Male Ct: 15.8 ± 2.4 vs. Female Ct: 8.1 ± 1.0 AUC, $p < 0.05$) (Figure 3C).

Excess ROS production can induce the opening of the mitochondrial pores, which leads to mitochondrial swelling; measured spectrophotometrically as a reduction in absorbance at 520 nm. In our study, we observed that male rats from the control group had less resistance to swelling when compared to the female control group (Male Ct: 0.0082 ± 0.0005 vs. Female Ct: 0.0043 ± 0.0003 AUC, $p < 0.05$) (Figure 4). Additionally, we observed that male rats were less resistant to calcium-induced mitochondrial pore opening than female controls (Male Ct + Ca^{2+} : 0.0116 ± 0.002 vs. Female Ct + Ca^{2+} : 0.0035 ± 0.0004 AUC, $p < 0.001$, figure 4). In regard to the Fx treatment, we observed that Fx increased the resistance to calcium-induced mitochondrial pore opening in males, in the presence of calcium 20 μM (Male Ct + Ca^{2+} : 0.0116 ± 0.002 vs. Male Fx + Ca^{2+} : 0.0019 ± 0.0005 AUC, $p < 0.001$, figure 4).

Moreover, this assay also demonstrated that female rats were more resistant than male. It is noteworthy that even after the Fx treatment, mitochondria obtained from female rats had lower swelling than mitochondria from the male rats (Male Fx: 0.0066 ± 0.0004 vs. Female Fx: 0.0017 ± 0.0003 , $p < 0.01$ AUC, figure 4)

Oxidative status in the rat brainstem

In respect to the oxidative status, we observed that either male controls or Fx treated groups displayed higher MDA levels when compared to the female rats from the respective control groups (Male Ct: 161.70 ± 8.1 vs. Female Ct: 4.92 ± 0.63 $\mu\text{mol/mg prot}$, $p < 0.001$; Male Fx: 127.00 ± 10.7 vs. Female Fx: 5.17 ± 0.4 $\mu\text{mol/mg prot}$, $p < 0.001$) (Figure 5 A). Additionally, we observed that Fx treatment decreased (21%) the levels of MDA in the male groups (Male Ct: 161.7 ± 8.1 vs. Male Fx: 127.00 ± 10.7 $\mu\text{mol/mg prot}$, $p < 0.01$) (Figure 5 A).

Reactive oxygen species can induce the oxidation of amino acid residues on proteins; consequently yielding protein carbonyls. Therefore, the protein carbonyl content is the most widely used marker of oxidative modification of proteins. Our findings regarding the protein carbonyl content assay did not display statistical significance across experimental groups (Figure 5 B).

Furthermore, to evaluate oxidative stress, we needed to perform several assays to investigate pro-oxidant actions in biomolecules, as well as several assays that would indicate antioxidant capacity in the cell. Therefore, we evaluated enzymatic and non-enzymatic molecules that can present antioxidant capacity. The enzymatic antioxidant defense was differently modulated by gender and treatment factors. For instance, the superoxide dismutase (SOD) activity in male rats was decreased (74%) in the Fx group (Ct: 2.30 ± 0.36 Vs. Fx: 0.77 ± 0.05 U/mg prot, $p = 0.01$, figure 6 A). On the other hand,

the SOD activity was increased (82%) in female rats previously treated with Fx (Ct: 1.97 ± 0.24 vs. Fx: 3.59 ± 0.45 U/mg prot, $p=0.01$). When comparing male versus female rats that were previously treated with Fx, female rats displayed more than a 300% increase in the SOD activity (Male Fx: 0.77 ± 0.05 vs. Female Fx: 3.59 ± 0.45 U/mg prot, $p=0.001$) (Figure 6 A).

Because SOD has the capacity to convert superoxide anion into hydrogen peroxide, catalase activity was also evaluated. Catalase can detoxify hydrogen peroxide in water and oxygen. In male rats, aside of the tendency of increased catalase activity in the Fx group, two-way ANOVA did not find significant differences between controls and Fx treated rats (Ct: 0.67 ± 0.04 vs. Fx: 1.12 ± 0.15 U/mg prot, $p>0.05$) (Figure 6 B). Although in female, Fx treatment did increase CAT activity (Ct: 57.33 ± 3.57 vs. Fx: 70.85 ± 3.80 U/mg prot, $p<0.01$) (Figure 6 B). Additionally, we observed that female rats presented higher CAT activity independently of the Fx treatment (Male Ct: 0.67 ± 0.04 vs Female Ct: 57.33 ± 3.57 , $p<0.001$; Male Fx: 1.12 ± 0.15 vs. Fx: 70.85 ± 3.80 U/mg prot, $p<0.001$) (Figure 6 B). The glutathione S-Transferase activity was also investigated. The GST represent the class of major phase II detoxification enzymes, it is presented in different compartments in the cell, including cytosol, mitochondria, endoplasmic reticulum, nucleus and plasma membrane (Raza, 2011). In addition to their role in catalyzing the conjugation of electrophilic substrates to glutathione (GSH), GST have implications in several functions, including: cell growth, oxidative stress, as well as in disease progression and prevention of cancer (Raza, 2011). In our study, it was observed that Fx treatment increased GST activity only in male rats (Male Ct: 1.44 ± 0.1 vs. Fx: 2.58 ± 0.28 U/mg prot, $p<0.05$; Female Ct: 2.61 ± 0.46 vs. Fx: 2.47 ± 0.26 U/mg prot) (Figure 6 C).

389 In the non-enzymatic antioxidant defense, Fx treatment increased GSH/GSSH
 390 ratio only in the female group (Ct: 4.46 ± 0.26 vs. Fx: 9.14 ± 1.83 , $p < 0.05$, figure 6 D).
 391 In addition, Fx treatment increased GST activity 6 times more in female than in male
 392 rats (Male Ct: 0.88 ± 0.03 vs. Male Fx: 1.20 ± 0.06 , U/mg of prot) (Male Fx: $1.20 \pm$
 393 0.06 vs Female Fx: 9.14 ± 1.83 U/mg of prot, $p < 0.001$) (Figure 6 D). Similarly to the
 394 GSH/GSSG ratio, the present findings demonstrate that female rats presented higher
 395 levels of thiol groups than male (Male Ct: 0.068 ± 0.001 vs. Female Ct: 0.107 ± 0.008
 396 mM/mg of prot, $p < 0.001$; Male Fx: 0.052 ± 0.006 vs Female Fx: 0.092 ± 0.005 ,
 397 $p < 0.01$).

398

399 4. Discussion

400 This study was conducted to evaluate the effects of SERT inhibition during
 401 development (i.e. SSRI inhibitor treatment with fluoxetine from 1st to 21st postnatal day)
 402 on both male and female mitochondrial bioenergetics and oxidative balance inside of
 403 the brainstem. Our study demonstrates that SERT inhibition during development
 404 improves mitochondrial and oxidative balance in both genders.

405

406 *Gender effect*

407

408 The brainstem is particularly vulnerable to oxidative stress, as the
 409 morphological and physiological characteristics of the central nervous system, e.g. high
 410 levels of PUFA, oxygen consumption, and auto-oxidizable neurotransmitters, make this
 411 organ more susceptible to oxidative damage of neurons and supporting cells that are
 412 related to the control of the cardiovascular function. In line with these aspects of the
 413 brainstem sensitivity to oxidative stress, Chan *et al.* (2009) demonstrated that

mitochondrial dysfunction increased ROS production, and, this increased ROS production was associated with the impairment of antioxidant enzymes. As a result, we observed a hyperactivation of the sympathetic system (Chan *et al.*, 2009). More recently, Chan *et al* (2014), Kaludercic *et al* (2014) and Rubattu *et al* (2015) presented data suggesting a strong correlation between the formation of mitochondrial ROS and the hyperactivation of the nervous system, leading to an increase in vasomotor sympathetic tone and hypertension (Chan & Chan, 2014; Kaludercic *et al.*, 2014; Rubattu *et al.*, 2015). Studies evaluating the effects of estrogen on the critical areas responsible for maintaining sympathetic tonus as well as blood pressure have shown that estrogen controls the neurons located in the brainstem by acting both on gene transcription, and through post-transcriptional mechanisms. Immunohistochemical and *in situ hybridization* have shown that ER is detectable as both mRNA transcript (Shughrue *et al.*, 1997), and as a protein (Shughrue *et al.*, 1997; Shughrue & Merchenthaler, 2001; Wang *et al.*, 2006) in the brainstem neurons. Therefore, these aspects are characterizing this region as a strong candidate for the effects of estrogen on cardiovascular homeostasis and/or diseases.

Our study is the first to analyze potential gender-related effects on mitochondrial bioenergetics. Our findings demonstrated that females had lower state 2, lower ROS production and higher calcium retention capacity. Therefore, these results suggest that female rats have better coupled mitochondria, possibly due to estradiol effects, when compared to our findings in male rats. These suggested mechanisms might be corroborated by previous observations in cell culture and heart studies (Jung *et al.*, 2009; Lagranha *et al.*, 2010; Rattanasopa *et al.*, 2015; Sivasinprasasn *et al.*, 2015). In addition, a study by Sandhir *et al.* (2014) found that estradiol withdrawal impairs mitochondrial function and increases oxidative stress in the brain (Sandhir *et al.*, 2014).

439 According to Tamrakar and Briski (2017), estradiol increases the expression of key
440 glycolytic enzymes in Krebs cycle and oxidative phosphorylation during hypoglycemia,
441 in A2 noradrenergic neurons (Tamrakar & Briski, 2017). In addition, the authors
442 observed that estradiol prevented the maladaptive decline in components of the
443 mitochondrial electron transport chain during recurring hypoglycemia. Such protective
444 actions of estradiol on the many components of energy generation in these neurons
445 could contribute to the energetic resilience to metabolic insult in females when
446 compared to males (Tamrakar & Briski, 2017).

447 In regard to oxidative state, our data demonstrated that females had lower MDA
448 levels, as well as both increased catalase activity and total thiol levels, suggesting that
449 females had reduced oxidative stress, possibly due to estradiol levels. Similarly, these
450 findings were previously reported in the brainstem or brainstem nuclei (Wang & He,
451 2002; Wang *et al.*, 2008; Pierce *et al.*, 2009; Shih, 2009; Subramanian *et al.*, 2011; Wu
452 *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; de Sousa *et al.*, 2017). Therefore, it is reasonable to
453 suggest that the mitochondrial function in the female brainstem can be more effective,
454 due to estrogen's modulation.

455

456 ***Effects of SSRI treatment during development***

457 As an area of great interest, our team was eager to investigate whether
458 manipulation of serotonin levels during a developmental period modulates
459 mitochondrial bioenergetics and oxidative state, and also, if these these effects could
460 improve mitochondrial function in male rats. In regard to the mitochondrial
461 bioenergetics, our results found that fluoxetine treatment in males increased
462 phosphorylative capacity (i.e. ADP-stimulated state-State 3), respiratory control rate
463 (RCR), citrate synthase activity, UCP 2 expression, calcium retention capacity after

464 calcium challenge, and also decreased ROS production. It is well known that
465 mitochondrial efficiency is directly related to a tightly coupling capacity of the transport
466 of protons and electrons across the respiratory complex, driving the ATP synthesis
467 (Chance & Williams, 1956; Brand & Nicholls, 2011). Thus, our data suggest that
468 serotonin modulation during development was capable of positively stimulating the
469 electrons' flow and energy production. The higher RCR observed in males implies that
470 there was an ameliorated mitochondrial function. It was interesting to detect that SSRI
471 treatment of females lead to a smaller improvement in mitochondrial bioenergetics, only
472 increasing UCP 2 expression. In regard to the oxidative balance, we observed that the
473 treatment improved the activity of two important antioxidant enzymes (SOD and CAT)
474 and the REDOX status.

475 Several studies with SSRIs have been conducted to evaluate the modulation of
476 mitochondrial function, including those with stress models. In line with these studies,
477 Wen et al (2014) found that the SSRI treatment restored mitochondrial function in adult
478 male rats that were submitted to an experimental protocol to induce depression (Wen *et al.*, 2014). Moreover, Sonei et al (2016) studied the treatment of male rats from ages 28
479 to 48 postnatal days in a social-isolation stress model. This study presented an
480 attenuation of the effects of SSRIs on the brain mitochondria, as well as on behavioral
481 abnormalities (Sonei *et al.*, 2016). In previous studies from our research group which
482 utilized the same experimental model, we observed that treatment with SSRIs increased
483 the phosphorylative capacity in the skeletal muscle of male rats (da Silva *et al.*, 2015b).
484 Similarly, Braz et al (2016a) reported a significant improvement in the mitochondrial
485 RCR in cardiac mitochondria of male rats (Braz *et al.*, 2016a). On the other hand, there
486 are no current available reports regarding studies that have tested the effects of
487 fluoxetine in the brainstem of female rats. However, Adzic et al (2017) reported that
488

489 fluoxetine treatment increased mitochondrial ER β levels, as well as increased
 490 ER α □□□□□□ samples in hippocampal mitochondria of male and female rats that
 491 were submitted to a depression model. Besides the increased levels of ER β in females,
 492 fluoxetine treatment increased cytochrome c oxidase activity and, decreased Bax levels
 493 (Adzic *et al.*, 2017). The authors suggested that the cellular protection mediated by
 494 fluoxetine treatment in females was influenced by a mitochondrial ER β -dependent
 495 manner. These findings support previous data from Hsieh *et al.* (2006), suggesting that
 496 estradiol improves mitochondrial complex IV activity (Hsieh *et al.*, 2006). Additionally,
 497 interesting information from the Adzic study shows that chronic stress increases
 498 immobility time in male rats, and fluoxetine treatment reversed this effect. According to
 499 the research group, there is a link between the neurometabolic profile and behavioral
 500 phenotype. These results were associated with a decreased mitochondrial energetic
 501 process and increased immobility time. Therefore, it was suggested that stress-induced
 502 behavior in males could be related to the ER β -mediated changes in hippocampal
 503 cytochrome c oxidase.

504 It is well demonstrated that a well-coupling mitochondria lead to decreased ROS
 505 production (Boveris & Chance, 1973; Murphy, 2009). Our results displayed a decrease
 506 in mitochondrial ROS production in the male Fx group, which corroborated previous
 507 studies performed by our research group, with mitochondria obtained from different
 508 tissues (da Silva *et al.*, 2015b; Braz *et al.*, 2016a). Similarly, Villa *et al.* (2016)
 509 demonstrated that chronic Fx treatment in adult male rats increased cytochrome oxidase
 510 (complex III) activity in the cerebral cortex (Villa *et al.*, 2016). Villa's results coincide
 511 with Sonei *et al.* (2016), since both research groups demonstrated that Fx treatment
 512 decreases ROS production of complex I in the brain, as well as complex III in the heart
 513 of male rats (Sonei *et al.*, 2016).

Furthermore, in line with the effects of Fx on mitochondria bioenergetics, we observed that brainstem mitochondria of male Fx-treated groups were more resistant to calcium-induced mitochondrial permeability transition than the Ct group, which was challenged by the levels of calcium. Mitochondrial permeability transition is characterized by an abrupt increase in the permeability of the inner mitochondrial membrane to low-molecular-weight molecules. This increased permeability is due to the opening of the MPTP- with subsequent osmotic changes ultimately leading to mitochondrial swelling and cell death mediated by necrosis or apoptosis (Gunter & Pfeiffer, 1990; Bernardi & Petronilli, 1996; Rasola & Bernardi, 2011). Corroborating with our data, previous report demonstrate that fluoxetine inhibited both the opening of the mitochondrial permeability transition pore, along with the release of cytochrome c, as well as protected against cell death induced by staurosporine (Nahon *et al.*, 2005). Additionally, a treatment with fluoxetine prevents MPTP-induced degeneration of nigro-striatal dopaminergic neurons, and also increases striatal dopamine levels associated with the partial motor recovery. The authors suggest that this protection was attributed to the decrease in the production of reactive oxygen and nitrogen species and consequent oxidative stress (Chung *et al.*, 2011).

As an important marker of oxidative metabolism and Krebs cycle efficiency, citrate synthase activity was also analyzed in the present study. Our data found increased CS activity in the male Fx group, suggesting an enhanced activity of the Krebs Cycle. In the classic report published by Chance and Williams (1956) regarding oxidative phosphorylation, the tight coupling between reduced coenzymes (i.e. NADH and FADH₂) was a result of Krebs Cycle and mitochondrial respiratory chain activities (Chance & Williams, 1956). Our CS results corroborated the consistent increase in both mitochondrial phosphorylation (i.e. increase in NADH and FADH₂ resulting from

539 Krebs cycle stimulates oxidative phosphorylation at electron transport chain, increasing
540 oxygen consumption) and respiratory control rate, that were found in the Fx group.
541 Interestingly, previous published studies from our research group utilizing the same Fx
542 treatment also yielded results reporting increased CS activity in the brainstem of female
543 rats (Braz *et al.*, 2016a), as well as in the heart (Braz *et al.*, 2016a), hypothalamus and
544 skeletal muscle (da Silva *et al.*, 2015b) of male rats. Similarly, acute treatment with Fx
545 increased CS activity in the corpus striatum of adult male rats (Agostinho *et al.*, 2011).

546 According to Gimsa (2011), uncoupling protein 2 (UCP2) is a mitochondrial
547 protein that reduces oxidative stress and has a protective function in several chronic
548 diseases (Gimsa *et al.*, 2011). The increase in UCP diminished the $\Delta\Psi_m$, which was
549 capable of stimulating the electrical flux through ETC, thereby decreasing $O_2^{\bullet-}$
550 production (Azzu & Brand, 2010). Furthermore, oxidative stress can also be involved in
551 the UCP up-regulation, wherein derivatives from lipid peroxidation increased UCP
552 proton conductance in order to modulate ROS production (Affourtit *et al.*, 2007). Our
553 data demonstrate that Fx treatment increased UCP2 expression in male and female rats.
554 The increased UCP expression is similar to our previous published data, wherein we
555 observed that neonatal Fx treatment increased UCP1 protein levels in brown adipose
556 tissue (da Silva *et al.*, 2015a). Therefore, these data suggest that fluoxetine treatment in
557 male rats improves mitochondrial bioenergetics by increasing substrate offering as well
558 as by coupling electrons transport more efficiently. As a result, decreased leaking and
559 improved energy supply.

560 According to Halliwell and Gutteridge (2007), oxidative stress is a condition
561 characterized by elevated levels of reactive oxygen species and/or a decrease in activity
562 of the antioxidant system. As a result, oxidative stress can lead to increased pro-oxidant
563 environment and damaged biomolecules, such as lipids, protein or DNA (Halliwell &

Gutteridge, 2007). In our study, we observed a reduction in lipid peroxidation as judged by decreased MDA levels in the male Fx group. The investigation of this type of data is relevant since the brain can be highly exposed to oxidative damage due to its higher percentage of phospholipids. The oxidative damage of these phospholipids could compromise the plasmatic membrane integrity, and its ability of selective permeability (Halliwell & Gutteridge, 2007). Similar data were found by Abdel Salam et al (2013) and Moretti et al (2012) who found reduced MDA levels in the brain of male rats after an acute treatment with Fx (i.e. during 7 and 14 days, respectively) (Moretti *et al.*, 2012; Abdel Salam *et al.*, 2013). Our previous studies also found decreased MDA levels in the brainstem and heart of female rats (Braz *et al.*, 2016b), as well as in the heart of male rats (Braz *et al.*, 2016a) when treated with fluoxetine during neonatal period.

The antioxidant defense capacity was evaluated either by enzymatic or non-enzymatic systems. Superoxide dismutase (SOD), the first analyzed enzyme, was decreased in the male Fx group. This reduction in SOD activity may be due to decreased ROS production. Since the superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) is the “substrate” for this enzyme, and as mentioned above, we observed that mitochondria from male treated with Fx produce less ROS than control. In addition, the levels of superoxide anion can either regulates SOD mRNA levels as well as SOD activity (Akashi *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2008). Altogether, our data and current findings in literature show that Fx treatment during lactation may decrease SOD activity, due to decreased superoxide anion levels. On the other hand, GST activity was significantly increased in the male Fx- group. GST is a superfamily of enzymes, catalyzing the conjugation of glutathione (GSH) to a wide range of chemical carcinogens, drugs, and products of oxidative stress (Djukic *et al.*, 2017). The increase in GST activity has been described as an important compound in the cellular detoxification of lipid peroxidation products, (Al Nimer *et al.*, 2013), and

589 this increase is associated with neuroprotection (Al Nimer *et al.*, 2013; Jewett *et al.*,
590 2017). These findings corroborate previous data published by our research group, i.e. Fx
591 treatment increased GST activity in the hypothalamus of male rats (da Silva *et al.*,
592 2015b). The increase in GST activity may explain the decrease in MDA levels in the
593 male Fx-group, which can also be associated to how ROS attack membrane lipids.

594 In summary, our data demonstrate that fluoxetine treatment during lactation
595 modulates the mitochondrial bioenergetics in a sex-dependent manner. Interestingly, the
596 improvement was more significant in male rats, which could be associated with reduced
597 risk of neurogenic cardiac dysfunction that has been more commonly observed in males
598 than in females. However, further studies are required to better elucidate the underlying
599 mechanisms associated with the effects of fluoxetine on mitochondrial bioenergetics
600 during the critical period of brain development.

601

602 **Acknowledgements**

603 The authors are thankful to FACEPE, who provided financial support for our
604 laboratory (APQ 1026.4-09/12 and APQ-0164-4.05/15) and scholarship to SCAS, as
605 well as Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel
606 (CAPES), that provided scholarships to TLAS, GRFB, AASP, CMF and AIS. The
607 authors declare no conflict of interest.

608

609 **Conflict of interest disclosure**

610 The authors also declare that they have no competing interests.

611

612 **Authors Contribution**

613 TLAS: The author conducted the majority of the experiments and analyse data; GRFB

614 conducted several experiments together with TLAS; SCAS: help with experiments and
 615 take care of the animals; AASP: help with take care of the animals; CMF: help with
 616 take care of the animals, AIS: construction of the experimental design and help with the
 617 discussion of the results; CJL: help with the construction of the experimental design
 618 and help with the discussion of the results.

619

620 References

- 621 Abdel Salam, O.M., Mohammed, N.A., Sleem, A.A. & Farrag, A.R. (2013) The effect
 622 of antidepressant drugs on thioacetamide-induced oxidative stress. *Eur Rev Med*
 623 *Pharmacol Sci*, **17**, 735-744.
- 624
- 625 Adzic, M., Mitic, M. & Radojcic, M. (2017) Mitochondrial estrogen receptors as a
 626 vulnerability factor of chronic stress and mediator of fluoxetine treatment in
 627 female and male rat hippocampus. *Brain Res*, **1671**, 77-84.
- 628
- 629 Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, **105**, 121-126.
- 630
- 631 Affourtit, C., Crichton, P.G., Parker, N. & Brand, M.D. (2007) Novel uncoupling
 632 proteins. *Novartis Found Symp*, **287**, 70-80; discussion 80-91.
- 633
- 634 Agostinho, F.R., Reus, G.Z., Stringari, R.B., Ribeiro, K.F., Ferraro, A.K., Benedet, J.,
 635 Rochi, N., Scaini, G., Streck, E.L. & Quevedo, J. (2011) Treatment with
 636 olanzapine, fluoxetine and olanzapine/fluoxetine alters citrate synthase activity in
 637 rat brain. *Neurosci Lett*, **487**, 278-281.

638

- 639 Akashi, M., Hachiya, M., Paquette, R.L., Osawa, Y., Shimizu, S. & Suzuki, G. (1995)
640 Irradiation increases manganese superoxide dismutase mRNA levels in human
641 fibroblasts. Possible mechanisms for its accumulation. *J Biol Chem*, **270**, 15864-
642 15869.
- 643
- 644 Al Nimer, F., Strom, M., Lindblom, R., Aeinehband, S., Bellander, B.M., Nyengaard,
645 J.R., Lidman, O. & Piehl, F. (2013) Naturally occurring variation in the
646 Glutathione-S-Transferase 4 gene determines neurodegeneration after traumatic
647 brain injury. *Antioxid Redox Signal*, **18**, 784-794.
- 648
- 649 Azzu, V. & Brand, M.D. (2010) The on-off switches of the mitochondrial uncoupling
650 proteins. *Trends in biochemical sciences*, **35**, 298-307.
- 651
- 652 Benmansour, S., Owens, W.A., Cecchi, M., Morilak, D.A. & Frazer, A. (2002)
653 Serotonin clearance in vivo is altered to a greater extent by antidepressant-induced
654 downregulation of the serotonin transporter than by acute blockade of this
655 transporter. *J Neurosci*, **22**, 6766-6772.
- 656
- 657 Bernardi, P. & Petronilli, V. (1996) The permeability transition pore as a mitochondrial
658 calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr*, **28**, 131-138.
- 659
- 660 Boveris, A. & Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.
661 General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, **134**, 707-716.
- 662

- 663 Bozkurt, B., Aguilar, D., Deswal, A., Dunbar, S.B., Francis, G.S., Horwich, T., Jessup,
 664 M., Kosiborod, M., Pritchett, A.M., Ramasubbu, K., Rosendorff, C., Yancy, C.,
 665 American Heart Association Heart, F., Transplantation Committee of the Council
 666 on Clinical, C., Council on Cardiovascular, S., Anesthesia, Council on, C., Stroke,
 667 N., Council on, H., Council on, Q. & Outcomes, R. (2016) Contributory Risk and
 668 Management of Comorbidities of Hypertension, Obesity, Diabetes Mellitus,
 669 Hyperlipidemia, and Metabolic Syndrome in Chronic Heart Failure: A Scientific
 670 Statement From the American Heart Association. *Circulation*, **134**, e535-e578.
 671
- 672 Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
 673 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*,
 674 **72**, 248-254.
 675
- 676 Brand, M.D. & Esteves, T.C. (2005) Physiological functions of the mitochondrial
 677 uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab*, **2**, 85-93.
 678
- 679 Brand, M.D. & Nicholls, D.G. (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells.
 680 *Biochem J*, **435**, 297-312.
 681
- 682 Braz, G.R., Freitas, C.M., Nascimento, L., Pedroza, A.A., da Silva, A.I. & Lagranha, C.
 683 (2016a) Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidant
 684 defense in rat heart. *Appl Physiol Nutr Metab*, **41**, 362-369.
 685
- 686 Braz, G.R., Pedroza, A.A., Nogueira, V.O., de Vasconcelos Barros, M.A., de Moura
 687 Freitas, C., de Brito Alves, J.L., da Silva, A.I., Costa-Silva, J.H. & Lagranha, C.J.

- 688 (2016b) Serotonin modulation in neonatal age does not impair cardiovascular
 689 physiology in adult female rats: Hemodynamics and oxidative stress analysis. *Life*
 690 *Sci*, **145**, 42-50.
- 691
- 692 Buege, J.A. & Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, **52**,
 693 302-310.
- 694
- 695 Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay,
 696 J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A. & Poulton, R. (2003) Influence of life stress
 697 on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, **301**,
 698 386-389.
- 699
- 700 CDC & Centers for Disease Control and Prevention, N.C.f.H.S. (2015) Multiple Cause
 701 of Death Files, 1999-2013, as compiled from data provided by the 57 vital
 702 statistics jurisdictions through the Vital Statistics Cooperative Program. *CDC*.
- 703
- 704 Chan, S.H. & Chan, J.Y. (2014) Brain stem NOS and ROS in neural mechanisms of
 705 hypertension. *Antioxid Redox Signal*, **20**, 146-163.
- 706
- 707 Chan, S.H., Wu, K.L., Chang, A.Y., Tai, M.H. & Chan, J.Y. (2009) Oxidative
 708 impairment of mitochondrial electron transport chain complexes in rostral
 709 ventrolateral medulla contributes to neurogenic hypertension. *Hypertension*, **53**,
 710 217-227.
- 711

- 712 Chance, B. & Williams, G.R. (1956) The respiratory chain and oxidative
713 phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*, **17**, 65-134.
714
- 715 Chung, Y.C., Kim, S.R., Park, J.Y., Chung, E.S., Park, K.W., Won, S.Y., Bok, E., Jin,
716 M., Park, E.S., Yoon, S.H., Ko, H.W., Kim, Y.S. & Jin, B.K. (2011) Fluoxetine
717 prevents MPTP-induced loss of dopaminergic neurons by inhibiting microglial
718 activation. *Neuropharmacology*, **60**, 963-974.
719
- 720 Cote, F., Fligny, C., Fromes, Y., Mallet, J. & Vojdani, G. (2004) Recent advances in
721 understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends Mol Med*,
722 **10**, 232-238.
723
- 724 da Silva, A.I., Braz, G.R., Pedroza, A.A., Nascimento, L., Freitas, C.M., Ferreira, D.J.,
725 Manhaes de Castro, R. & Lagranha, C.J. (2015a) Fluoxetine induces lean
726 phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1
727 expression. *J Bioenerg Biomembr*, **47**, 309-318.
728
- 729 da Silva, A.I., Braz, G.R., Silva-Filho, R., Pedroza, A.A., Ferreira, D.S., Manhaes de
730 Castro, R. & Lagranha, C. (2015b) Effect of fluoxetine treatment on
731 mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues. *Appl Physiol*
732 *Nutr Metab*, **40**, 565-574.
733
- 734 da Silva, A.I., Galindo, L.C.M., Nascimento, L., Freitas, C.M., Manhaes-de-Castro, R.,
735 Lagranha, C.J. & Souza, S.L. (2014) Fluoxetine treatment of rat neonates
736 significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral

- 737 indicators of anxiety later in postnatal life. *Can J Physiol Pharmacol*, **92**, 330-
738 337.
- 739
- 740 de Sousa, S.M., Braz, G.R.F., Freitas, C.M., de Santana, D.F., Sellitti, D.F., Fernandes,
741 M.P. & Lagranha, C.J. (2017) Oxidative injuries induced by maternal low-protein
742 diet in female brainstem. *Nutr Neurosci*, 1-9.
- 743
- 744 Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S. & Beaudet, A. (1982) The serotonin neurons
745 in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope
746 radioautographic study. *J Comp Neurol*, **207**, 239-254.
- 747
- 748 Djukic, T., Simic, T., Pljesa-Ercegovac, M., Matic, M., Suvakov, S., Coric, V.,
749 Dragicevic, D. & Savic-Radojevic, A. (2017) Upregulated glutathione transferase
750 omega-1 correlates with progression of urinary bladder carcinoma. *Redox Rep*, **22**,
751 486-492.
- 752
- 753 Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, **82**, 70-77.
- 754
- 755 Ferreira, D.J., da Silva Pedroza, A.A., Braz, G.R., da Silva-Filho, R.C., Lima, T.A.,
756 Fernandes, M.P., Doi, S.Q. & Lagranha, C.J. (2016) Mitochondrial bioenergetics
757 and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: Immediate response
758 to maternal protein restriction. *Brain Res*.
- 759
- 760 Gainetdinov, R.R. & Caron, M.G. (2003) Monoamine transporters: from genes to
761 behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **43**, 261-284.

- 762
- 763 Gimsa, U., Kanitz, E., Otten, W., Aheng, C., Tuchscherer, M., Ricquier, D., Miroux, B.
- 764 & Ibrahim, S.M. (2011) Alterations in anxiety-like behavior following knockout
- 765 of the uncoupling protein 2 (ucp2) gene in mice. *Life Sci*, **89**, 677-684.
- 766
- 767 Go AS, M.D., Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S,
- 768 Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA,
- 769 Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH,
- 770 Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK,
- 771 Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie
- 772 PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB (2013) Heart
- 773 disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart
- 774 Association. *Circulation*, **127**, e6-e245.
- 775
- 776 Gomez, F. & Garcia-Garcia, L. (2017) Anxiogenic-like effects of fluoxetine render
- 777 adult male rats vulnerable to the effects of a novel stress. *Pharmacol Biochem*
- 778 *Behav*, **153**, 32-44.
- 779
- 780 Gunter, T.E. & Pfeiffer, D.R. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport
- 781 calcium. *Am J Physiol*, **258**, C755-786.
- 782
- 783 Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first
- 784 enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, **249**, 7130-7139.
- 785

- 786 Halliday, G., Baker, K. & Harper, C. (1995) Serotonin and alcohol-related brain
787 damage. *Metab Brain Dis*, **10**, 25-30.
- 788
- 789 Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford
790 UK, United Kingdom.
- 791
- 792 Heisler, L.K., Zhou, L., Bajwa, P., Hsu, J. & Tecott, L.H. (2007) Serotonin 5-HT(2C)
793 receptors regulate anxiety-like behavior. *Genes, brain, and behavior*, **6**, 491-496.
- 794
- 795 Henderson, L.A., Keay, K.A. & Bandler, R. (2000) Caudal midline medulla mediates
796 behaviourally-coupled but not baroreceptor-mediated vasodepression.
797 *Neuroscience*, **98**, 779-792.
- 798
- 799 Hissin, P.J. & Hilf, R. (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and
800 reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*, **74**, 214-226.
- 801
- 802 Hsieh, Y.C., Yu, H.P., Suzuki, T., Choudhry, M.A., Schwacha, M.G., Bland, K.I. &
803 Chaudry, I.H. (2006) Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by
804 estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling
805 and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *J Mol Cell Cardiol*,
806 **41**, 511-521.
- 807
- 808 Iordanidou, M., Tavridou, A., Petridis, I., Arvanitidis, K.I., Christakidis, D.,
809 Vargemezis, V. & Manolopoulos, V.G. (2010) The serotonin transporter promoter

- polymorphism (5-HTTLPR) is associated with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta*,
411, 167-171.
- Jewett, M., Jimenez-Ferrer, I. & Swanberg, M. (2017) Astrocytic Expression of GSTA4
Is Associated to Dopaminergic Neuroprotection in a Rat 6-OHDA Model of
Parkinson's Disease. *Brain sciences*, **7**.
- Jung, M.E., Wilson, A.M., Ju, X., Wen, Y., Metzger, D.B. & Simpkins, J.W. (2009)
Ethanol withdrawal provokes opening of the mitochondrial membrane
permeability transition pore in an estrogen-preventable manner. *J Pharmacol Exp
Ther*, **328**, 692-698.
- Kaludercic, N., Deshwal, S. & Di Lisa, F. (2014) Reactive oxygen species and redox
compartmentalization. *Front Physiol*, **5**, 285.
- Kim, C., Cushman, M., Khodneva, Y., Lisabeth, L.D., Judd, S., Kleindorfer, D.O.,
Howard, V.J. & Safford, M.M. (2015) Risk of Incident Coronary Heart Disease
Events in Men Compared to Women by Menopause Type and Race. *J Am Heart
Assoc*, **4**.
- Lagranha, C.J., Deschamps, A., Aponte, A., Steenbergen, C. & 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.

- 835 Lam, D.D. & Heisler, L.K. (2007) Serotonin and energy balance: molecular
 836 mechanisms and implications for type 2 diabetes. *Expert reviews in molecular*
 837 *medicine*, **9**, 1-24.
- 838
- 839 Lam, D.D., Przydzial, M.J., Ridley, S.H., Yeo, G.S., Rochford, J.J., O'Rahilly, S. &
 840 Heisler, L.K. (2008) Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via
 841 downstream activation of melanocortin 4 receptors. *Endocrinology*, **149**, 1323-
 842 1328.
- 843
- 844 Le Page, C., Noirez, P., Courty, J., Riou, B., Swynghedauw, B. & Besse, S. (2009)
 845 Exercise training improves functional post-ischemic recovery in senescent heart.
 846 *Exp Gerontol*, **44**, 177-182.
- 847
- 848 Lee, S.K., Ryu, P.D. & Lee, S.Y. (2013) Estrogen replacement modulates voltage-gated
 849 potassium channels in rat presympathetic paraventricular nucleus neurons. *BMC*
 850 *Neurosci*, **14**, 134.
- 851
- 852 Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W.,
 853 Shaltiel, S. & Stadtman, E.R. (1990) Determination of carbonyl content in
 854 oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, **186**, 464-478.
- 855
- 856 Lisabeth, L. & Bushnell, C. (2012) Stroke risk in women: the role of menopause and
 857 hormone therapy. *Lancet Neurol*, **11**, 82-91.
- 858

- 859 Liu, B., Chen, Y. & St Clair, D.K. (2008) ROS and p53: a versatile partnership. *Free*
860 *Radic Biol Med*, **44**, 1529-1535.
- 861
- 862 Maciag, D., Simpson, K.L., Coppinger, D., Lu, Y., Wang, Y., Lin, R.C. & Paul, I.A.
863 (2006) Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and
864 serotonin circuitry. *Neuropsychopharmacology*, **31**, 47-57.
- 865
- 866 Marina, N., Abdala, A.P., Korsak, A., Simms, A.E., Allen, A.M., Paton, J.F. & Gourine,
867 A.V. (2011) Control of sympathetic vasomotor tone by catecholaminergic C1
868 neurones of the rostral ventrolateral medulla oblongata. *Cardiovasc Res*, **91**, 703-
869 710.
- 870
- 871 Marina, N., Ang, R., Machhada, A., Kasymov, V., Karagiannis, A., Hosford, P.S.,
872 Mosienko, V., Teschemacher, A.G., Vihko, P., Paton, J.F., Kasparov, S. &
873 Gourine, A.V. (2015) Brainstem Hypoxia Contributes to the Development of
874 Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Hypertension*.
- 875
- 876 Matouskova, P., Bartikova, H., Bousova, I., Hanusova, V., Szotakova, B. & Skalova, L.
877 (2014) Reference genes for real-time PCR quantification of messenger RNAs and
878 microRNAs in mouse model of obesity. *PLoS One*, **9**, e86033.
- 879
- 880 Misra, H.P. & Fridovich, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of
881 epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*, **247**, 3170-
882 3175.
- 883

- 884 Moretti, M., Colla, A., de Oliveira Balen, G., Dos Santos, D.B., Budni, J., de Freitas,
 885 A.E., Farina, M. & Severo Rodrigues, A.L. (2012) Ascorbic acid treatment,
 886 similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative
 887 damage induced by chronic unpredictable stress. *J Psychiatr Res*, **46**, 331-340.
 888
- 889 Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*,
 890 **417**, 1-13.
 891
- 892 Nahon, E., Israelson, A., Abu-Hamad, S. & Varda, S.B. (2005) Fluoxetine (Prozac)
 893 interaction with the mitochondrial voltage-dependent anion channel and
 894 protection against apoptotic cell death. *FEBS Lett*, **579**, 5105-5110.
 895
- 896 Pierce, J.P., Kievits, J., Graustein, B., Speth, R.C., Iadecola, C. & Milner, T.A. (2009)
 897 Sex differences in the subcellular distribution of angiotensin type 1 receptors and
 898 NADPH oxidase subunits in the dendrites of C1 neurons in the rat rostral
 899 ventrolateral medulla. *Neuroscience*, **163**, 329-338.
 900
- 901 Pinheiro, I.L., da Silva, A.I., Reginato, A., da Silva Filho, R.C., Galindo, L.C.M.,
 902 Matos, R.J.B., de Souza Ferraz, J.C.J., Toscano Meneses da Silva Castro, A.E.,
 903 Milanski Ferreira, M., Manhaes de Castro, R. & de Souza, S.L. (2017) Neonatal
 904 fluoxetine exposure modulates serotonergic neurotransmission and disturb
 905 inhibitory action of serotonin on food intake. *Behav Brain Res*.
 906
- 907 Rapport, M.M., Green, A.A. & Page, I.H. (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin;
 908 isolation and characterization. *J Biol Chem*, **176**, 1243-1251.

- 909
- 910 Rasola, A. & Bernardi, P. (2011) Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -
911 dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, **50**, 222-233.
- 912
- 913 Rattanasopa, C., Phungphong, S., Wattanapernpool, J. & Bupha-Intr, T. (2015)
914 Significant role of estrogen in maintaining cardiac mitochondrial functions. *The*
915 *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **147**, 1-9.
- 916
- 917 Raza, H. (2011) Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and
918 mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *The FEBS*
919 *journal*, **278**, 4243-4251.
- 920
- 921 Rubattu, S., Bianchi, F., Busceti, C.L., Cotugno, M., Stanzione, R., Marchitti, S., Di
922 Castro, S., Madonna, M., Nicoletti, F. & Volpe, M. (2015) Differential
923 modulation of AMPK/PPARalpha/UCP2 axis in relation to hypertension and
924 aging in the brain, kidneys and heart of two closely related spontaneously
925 hypertensive rat strains. *Oncotarget*, **6**, 18800-18818.
- 926
- 927 Sanchez, S., Sanchez, C., Paredes, S.D., Cubero, J., Rodriguez, A.B. & Barriga, C.
928 (2008) Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of
929 rats. *Mol Cell Biochem*, **317**, 105-111.
- 930
- 931 Sandhir, R., Sethi, N., Aggarwal, A. & Khera, A. (2014) Coenzyme Q10 treatment
932 ameliorates cognitive deficits by modulating mitochondrial functions in surgically
933 induced menopause. *Neurochem Int*, **74**, 16-23.

- 934
- 935 Shih, C.D. (2009) Activation of estrogen receptor beta-dependent nitric oxide signaling
 936 mediates the hypotensive effects of estrogen in the rostral ventrolateral medulla of
 937 anesthetized rats. *J Biomed Sci*, **16**, 60.
- 938
- 939 Shughrue, P.J., Lane, M.V. & Merchenthaler, I. (1997) Comparative distribution of
 940 estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J*
 941 *Comp Neurol*, **388**, 507-525.
- 942
- 943 Shughrue, P.J. & Merchenthaler, I. (2001) Distribution of estrogen receptor beta
 944 immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*, **436**, 64-81.
- 945
- 946 Sivasinprasasn, S., Sa-Nguanmoo, P., Pratchayasakul, W., Kumfu, S., Chattipakorn,
 947 S.C. & Chattipakorn, N. (2015) Obese-insulin resistance accelerates and
 948 aggravates cardiometabolic disorders and cardiac mitochondrial dysfunction in
 949 estrogen-deprived female rats. *Age (Dordr)*, **37**, 28.
- 950
- 951 Sonei, N., Amiri, S., Jafarian, I., Anoush, M., Rahimi-Balaei, M., Bergen, H., Haj-
 952 Mirzaian, A. & Hosseini, M.J. (2016) Mitochondrial dysfunction bridges negative
 953 affective disorders and cardiomyopathy in socially isolated rats: Pros and cons of
 954 fluoxetine. *World J Biol Psychiatry*, 1-15.
- 955
- 956 Sookoian, S., Gianotti, T.F., Gemma, C., Burgueno, A. & Pirola, C.J. (2008)
 957 Contribution of the functional 5-HTTLPR variant of the SLC6A4 gene to obesity
 958 risk in male adults. *Obesity (Silver Spring)*, **16**, 488-491.

- 959
- 960 Subramanian, M., Balasubramanian, P., Garver, H., Northcott, C., Zhao, H., Haywood,
 961 J.R., Fink, G.D., MohanKumar, S.M. & MohanKumar, P.S. (2011) Chronic
 962 estradiol-17beta exposure increases superoxide production in the rostral
 963 ventrolateral medulla and causes hypertension: reversal by resveratrol. *Am J*
 964 *Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **300**, R1560-1568.
- 965
- 966 Tamrakar, P. & Briski, K.P. (2017) Impact of recurrent hypoglycemic stress on
 967 hindbrain A2 nerve cell energy metabolism and catecholamine biosynthesis:
 968 modulation by estradiol. *Acta neurobiologiae experimentalis*, **77**, 31-44.
- 969
- 970 Villa, R.F., Ferrari, F., Gorini, A., Brunello, N. & Tascetta, F. (2016) Effect of
 971 desipramine and fluoxetine on energy metabolism of cerebral mitochondria.
 972 *Neuroscience*, **330**, 326-334.
- 973
- 974 Wang, G., Drake, C.T., Rozenblit, M., Zhou, P., Alves, S.E., Herrick, S.P., Hayashi, S.,
 975 Warrier, S., Iadecola, C. & Milner, T.A. (2006) Evidence that estrogen directly
 976 and indirectly modulates C1 adrenergic bulbospinal neurons in the rostral
 977 ventrolateral medulla. *Brain Res*, **1094**, 163-178.
- 978
- 979 Wang, G., Milner, T.A., Speth, R.C., Gore, A.C., Wu, D., Iadecola, C. & Pierce, J.P.
 980 (2008) Sex differences in angiotensin signaling in bulbospinal neurons in the rat
 981 rostral ventrolateral medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **295**,
 982 R1149-1157.
- 983

- 984 Wang, S. & He, R.R. (2002) Effects of intracarotid injection of 17beta-estradiol on
 985 electrical activity of rostral ventrolateral medullary neurons in male rats. *Sheng Li*
 986 *Xue Bao*, **54**, 47-54.
- 987
- 988 Wen, L., Jin, Y., Li, L., Sun, S., Cheng, S., Zhang, S., Zhang, Y. & Svenningsson, P.
 989 (2014) Exercise prevents raphe nucleus mitochondrial overactivity in a rat
 990 depression model. *Physiol Behav*, **132**, 57-65.
- 991
- 992 Whitaker-Azmitia, P.M. (2001) Serotonin and brain development: role in human
 993 developmental diseases. *Brain Res Bull*, **56**, 479-485.
- 994
- 995 Whitaker-Azmitia, P.M., Druse, M., Walker, P. & Lauder, J.M. (1996) Serotonin as a
 996 developmental signal. *Behav Brain Res*, **73**, 19-29.
- 997
- 998 Wu, K.L., Chen, C.H. & Shih, C.D. (2012) Nontranscriptional activation of PI3K/Akt
 999 signaling mediates hypotensive effect following activation of estrogen receptor
 1000 beta in the rostral ventrolateral medulla of rats. *J Biomed Sci*, **19**, 76.
- 1001
- 1002 Zha, W., Ho, H.T.B., Hu, T., Hebert, M.F. & Wang, J. (2017) Serotonin transporter
 1003 deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance. *Sci Rep*, **7**,
 1004 1137.

1006 **Figure Captions:**

1007 **Figure 1:** Body weight in 60 days male and female rats previously treated with
 1008 fluoxetine during lactation. Rat pups received daily subcutaneous injections of Fx (10

1009 mg/kg body weight) or vehicle control (0.9% NaCl, 10 mL/kg body weight) from the
 1010 1st to the 21st day of life. Data are expressed as means $\pm$ SEM. (** $p \leq 0.01$; *** $p \leq$
 1011 0.001).

1012

1013 **Figure 2:** Mitochondrial bioenergetics in brainstem of 60 days male and female rats
 1014 previously treated with fluoxetine during lactation. Rat pups received daily
 1015 subcutaneous injections of Fx (10 mg/kg body weight) or vehicle control (0.9% NaCl,
 1016 10 mL/kg body weight) from the 1st to the 21st day of life. Mitochondrial respiration
 1017 with complex I substrates, in basal state (State 2), stimulated with ADP (State 3),
 1018 resting with oligomycin (State 4) and uncoupled with carbonyl cyanide m-chlorophenyl
 1019 hydrazone (Vmax). Respiratory control ratio (RCR) is described in the insert. Data are
 1020 expressed as means $\pm$ SEM. (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

1021

1022 **Figure 3:** Mitochondrial function in the brainstems of 60 day-old male and female rats
 1023 treated with fluoxetine during lactation. Rat pups received daily subcutaneous injections
 1024 of Fx (10 mg/kg body weight) or vehicle control (0.9% NaCl, 10 mL/kg body weight)
 1025 from the 1st to the 21st day of life (a) Citrate synthase activity; (b) UCP 2 expression;
 1026 (c) Mitochondrial reactive species production. Values are expressed as means $\pm$ SEM
 1027 (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

1028

1029 **Figure 4** Mitochondrial pore opening evaluation in the brainstems of 60 day-old male
 1030 and female rats treated with fluoxetine during lactation. Rat pups received daily
 1031 subcutaneous injections of Fx (10 mg/kg body weight) or vehicle control (0.9% NaCl,
 1032 10 mL/kg body weight) from the 1st to the 21st day of life. Isolated mitochondria were
 1033 evaluated without or with CaCl_2 (20 μmol). Rat pups received daily subcutaneous

1034 injections of Fx (10 mg/kg body weight) or vehicle control (0.9% NaCl, 10 mL/kg body
1035 weight) from the 1st to the 21st day of life. OD: optical density. A.U.C: area under the
1036 curve. Values are expressed as means $\pm$ SEM (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

1037

1038 **Figure 5:** Oxidative stress biomarker in the brainstems of 60 day-old male rats treated
1039 with fluoxetine during lactation. Rat pups received daily subcutaneous injections of Fx
1040 (10 mg/kg body weight) or vehicle control (0.9% NaCl, 10 mL/kg body weight) from
1041 the 1st to the 21st day of life. (a) Lipid peroxidation measured by MDA levels; (b)
1042 Protein oxidation measured by carbonyl contents. Values are expressed as means $\pm$
1043 SEM (** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

1044

1045 **Figure 6:** Antioxidant defense in the brainstems of 60 day-old male rats treated with
1046 fluoxetine during lactation. Rat pups received daily subcutaneous injections of Fx (10
1047 mg/kg body weight) or vehicle control (0.9% NaCl, 10 mL/kg body weight) from the
1048 1st to the 21st day of life. (a) Superoxide dismutase-SOD; (b) Catalase-CAT; (c)
1049 glutathione - S- transferase -GST; (d) REDOX state - GSH/GSSG; (e) Total thiols.
1050 Values are expressed as means $\pm$ SEM (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

1051

1052

Figure 1: Body weigh

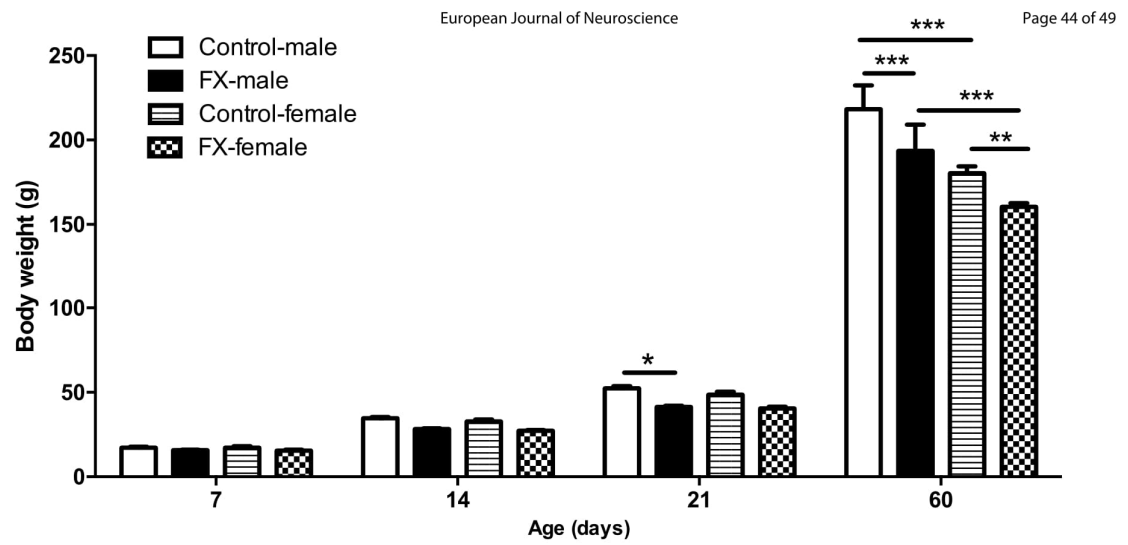


Figure 2: Mitochondrial oxygen consumption

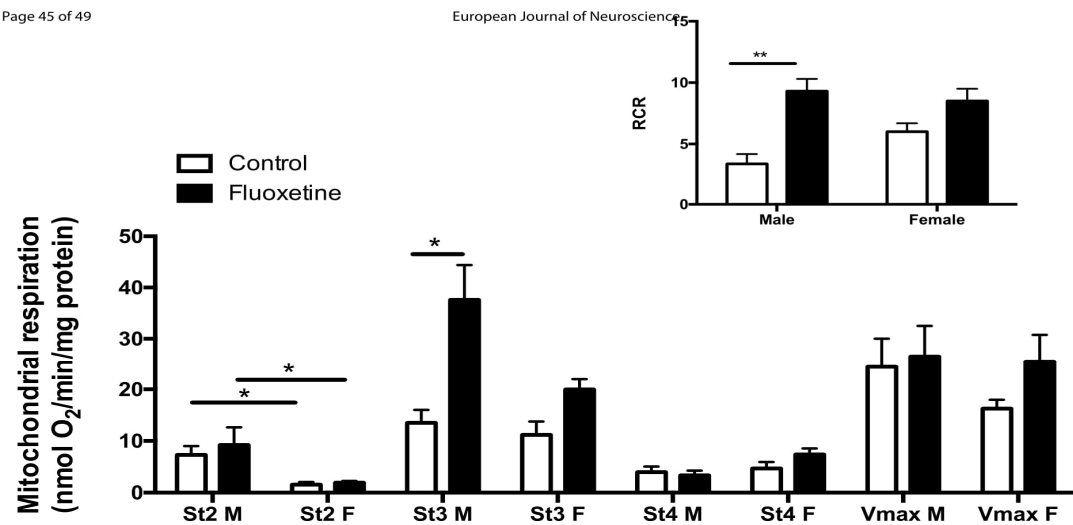


Figure 3: Mitochondrial function

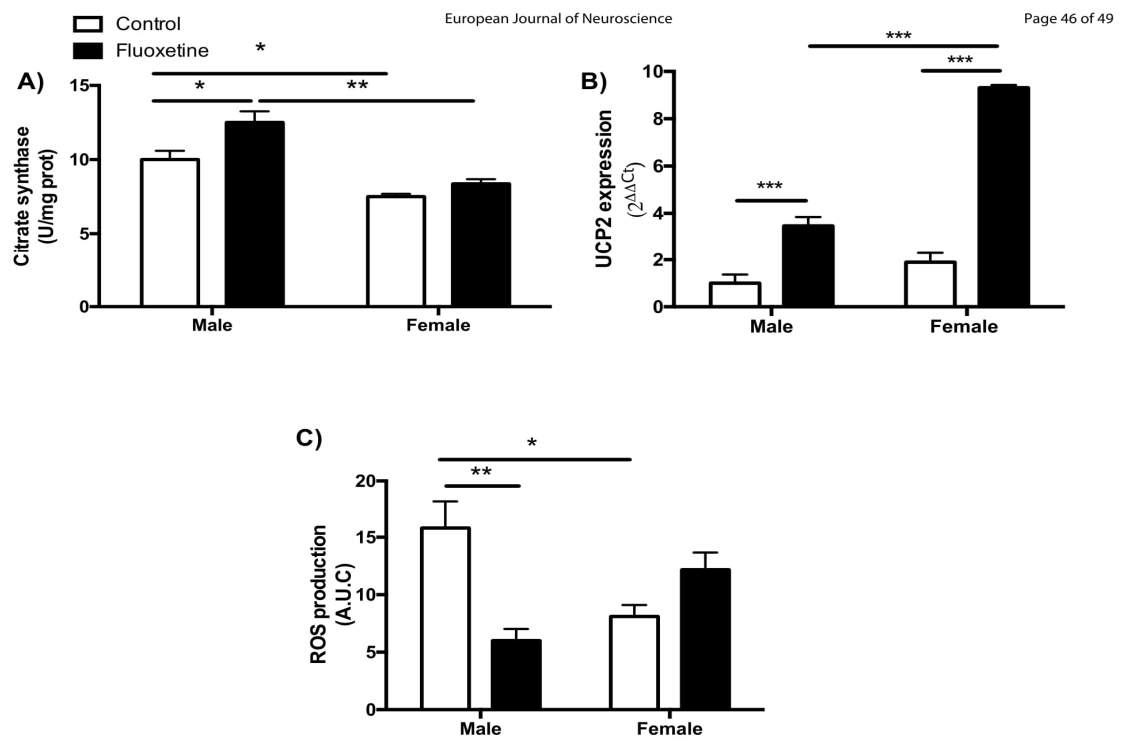


Figure 4: Mitochondrial swelling

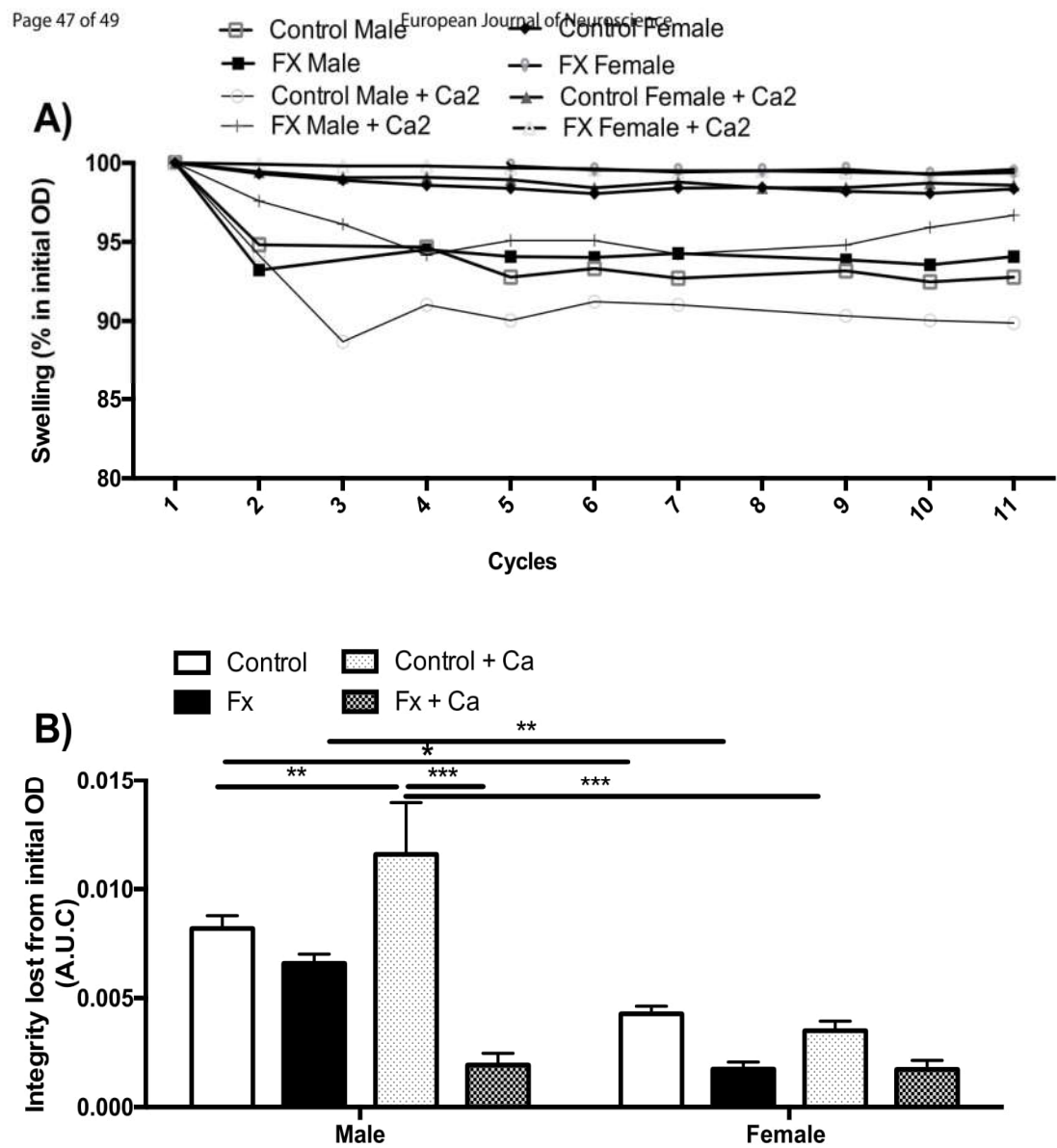


Figure 5: Oxidative stress biomarkers

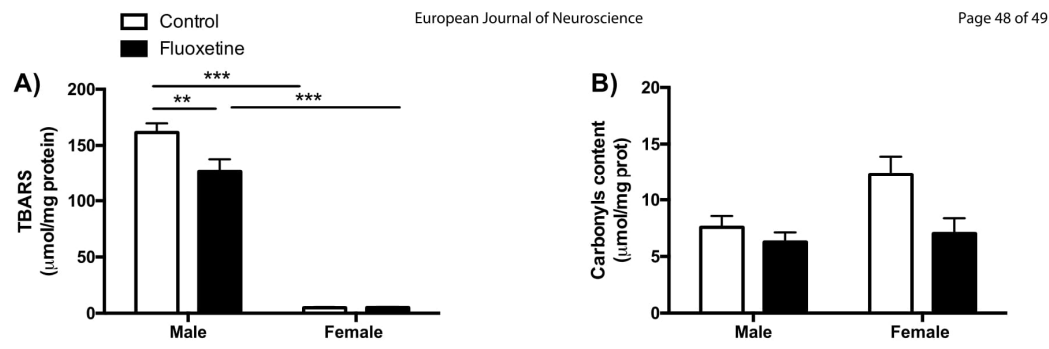
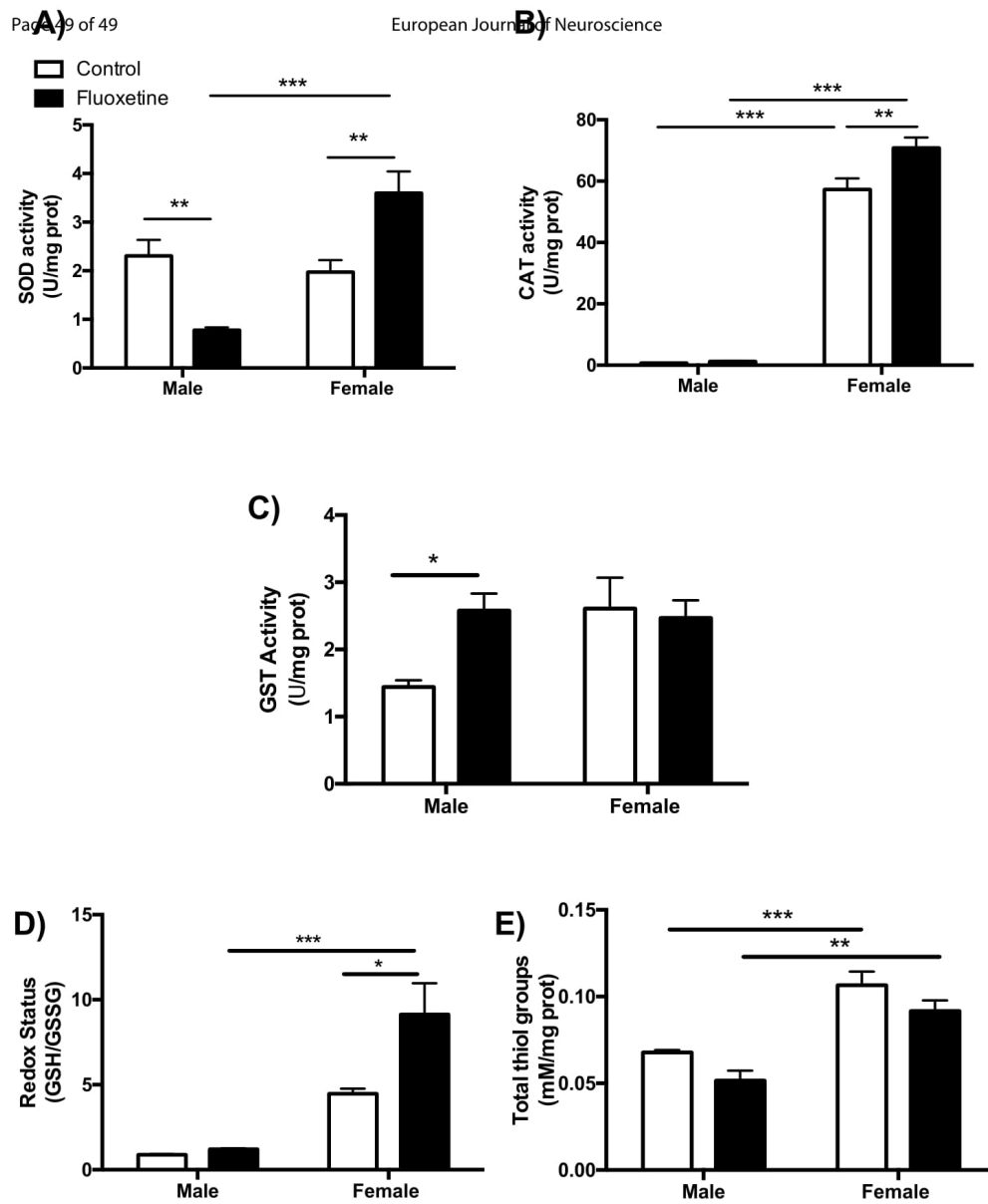


Figure 6: Antioxidant defenses



11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As mitocôndrias são as principais fontes geradoras de ATP e de espécies reativas de oxigênio sendo, portanto um alvo importante para diversas drogas com potencial terapêutico ainda pouco explorado. Estudos prévios já mostraram que os hormônios femininos podem apresentar efeitos terapêuticos através de sua ação sobre as funções mitocondriais, entretanto poucos estudos avaliaram os possíveis efeitos terapêuticos dos ISRS através de sua ação sobre as funções mitocondriais. Como os efeitos da utilização dos ISRS durante a lactação e sua ação sobre as mitocôndrias ainda são escassos, nosso estudo trouxe mais uma peça para o quebra-cabeça dos efeitos moduladores da ação da administração crônica de fluoxetina em ratos neonatos promovendo melhora importante no funcionamento das mitocôndrias de tronco encefálico em ratos machos e fêmeas, porém os machos apresentaram aumento significativo superiores aos das fêmeas. Podemos concluir com nossas investigações que o tratamento neonatal de nosso modelo experimental promoveu uma modulação positiva em uma importante área controladora da função cardiorrespiratória, o que possivelmente reduziria o risco para o aparecimento e desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tal como a hipertensão.

REFERÊNCIAS

- A.K. RAO, A.K. DIETRICH, Y.S. ZIEGLER, A.M. NARDULLI, 17beta-Estradiol-mediated increase in Cu/Zn superoxide dismutase expression in the brain: a mechanism to protect neurons from ischemia, **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v. 127, p. 382–389, 2011.
- ALENAZI, F. S; IBRAHIM, B.A; BRISKI, K.P. Estradiol regulates dorsal vagal complex signal transduction pathway transcriptional reactivity to the AMPK activator 5-Aminoimidazole-4-Carboxamide-Riboside (AICAR), **J. Mol. Neurosci.** v. 56, p. 907–916, 2015.
- B. IMTIAZ, M. TUPPURAINEN, T. RIKKONEN, M. KIVIPELTO, H. SOININEN, H. KROGER, *et al.*, Postmenopausal hormone therapy and Alzheimer disease: A prospective cohort study, **Neurology** v. 88, p. 1062–1068, 2017.
- BABA, Y; ISHIKAWA, S; AMAGI, Y; KAYABA, K; GOTOH, T; KAJII, E. Premature menopause is associated with increased risk of cerebral infarction in Japanese women, **Menopause**, v. 17, p. 506–510, 2010.
- BAKER K. G; HALLIDAY G. M; HORNUNG J. P; GEFFEN L. B; COTTON R. G; TORK I. Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. **Neuroscience**. v. 42, p. 757-775, 1991.
- BARAKAT, R; OAKLEY, O; KIM, H; JIN, J; KO, C.J. Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function, **BMB Rep.** v. 49, p. 488–496, 2016.
- BELL, C; ABRAMS, J; NUTT, D. Tryptophan depletion and its implications for psychiatry, **Brit. J. of Psychiatry**, p. 399 – 405, 2010.
- BELLANTI, F; MATTEO, M; ROLLO, T; ROSARIO, F; GRECO, P; VENDEMIALE, G. *et al.*, Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy, **Redox Biol.** v. 1, p. 340–346, 2013.
- BENDISKE, J; CABA, E; BROWN, Q. B; BAHR, B. A. Intracellular deposition, microtubule destabilization, and transport failure: an “early” pathogenic cascade leading to synaptic decline. **J Neuropathol Exp Neurol** v. 61, p. 640–650, 2002.
- BERTHOUD, H. R; MORRISON, C. The brain, appetite, and obesity. **Annu Rev Psychol.** v. 59, p. 55 - 92, 2008.

BJÖRKLUND, A.; HÖKFELT, T. **GABA and Neuropeptides in the CNS**, Part I. Elsevier, Amsterdam, 1985.

BRADLEY, S. R.; PIERIBONE, V. A.; WANG, W.; SEVERSON, C. A.; JACOBS, R. A.; RICHERSON, G. B. Chemosensitive serotonergic neurons are closely associated with large medullary arteries. **Nat. Neurosci.** v. 5, p. 401–402, 2002.

BRADLEY, T. J.; SATIR, P. 5-hydroxytryptamine-stimulated mitochondrial movement and microvillar growth in the lower malpighian tubule of the insect, *Rhodnius prolixus*. **J Cell Sci.** 1981 v. 49, p. 61 – 139, 1981.

BRAZ, G. R. F.; FREITAS, C. M.; NASCIMENTO, L.; PEDROZA, A. A.; SILVA, A. I.; LAGRANHA, C. J. Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidant defense in rat heart. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.** p. 1–8, 2016.

BUCHANAN, G. F.; RICHERSON, G. B. Central serotonin neurons are required for arousal to CO₂. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 107, p. 16354–16359, 2010.

BUZNIKOV, LAMBERT, LAUDER. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. **Cell Tissue Res.** p. 177–186, 2001.

C. BERNAL-MONDRAGON, S. RIVAS-ARANCIBIA, K.M. KENDRICK, R. GUEVARA-GUZMAN, Estradiol prevents olfactory dysfunction induced by A-beta 25–35 injection in hippocampus, **BMC Neurosci.** v. 14, p. 104, 2013.

CHEN, S.; OWENS, G. C.; CROSSIN, K. L.; EDELMAN, D. B. Serotonin stimulates mitochondrial transport in hippocampal neurons. **Mol. Cell. Neurosci.** p. 472 – 483, 2007.

CORCORAN, A. E.; HODGES, M. R.; WU, Y.; WANG, W.; WYLIE, C. J.; DENERIS, E. S.; RICHERSON, G. B. Medullary serotonin neurons and central CO₂ chemoreception. **Respir. Physiol. Neurobiol.** 168, 49–58, 2009.

CORREIA, D. T.; GUERREIRO, D. F.; OLIVEIRA, S.; FIGUEIRA, M. L. Diferenças farmacodinâmicas e farmacocinéticas entre os SSRI: Implicações na prática clínica. **Acta Med Port.** p. 167-174, 2007.

CUMMINGS, K. J.; LI, A.; DENERIS, E. S.; NATTIE, E. E. Bradycardia in serotonin deficient Pet-mice: influence of respiratory dysfunction and hyperthermia over the first 2 postnatal weeks. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 298, p. 1333–1342, 2010.

DAHLSTRONI, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. 1. Demonstration of monoamines in the cell bodies of the brain stem neurons. **Acta Physiol. Scand.** v. 62 (Suppl. 232), p. 1-55, 1964.

DALVA, M. B; MCCLELLAND A. C; KAYSER M. S. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. **Nature Publishing Group.** v. 08, p. 206 - 220, 2007.

DEPUY, S. D; KANBAR, R; COATES, M. B; STORNETTA, R. L; GUYENET, P. G; Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. **J. Neurosci.** v. 31, p. 1981–1990, 2011.

DERGACHEVA, O.; KAMENDI, H.; WANG, X.; PINOL, R. A.; FRANK, J.; GORINI, C.; JAMESON, H.; LOVETT-BARR, M. R.; MENDELOWITZ, D. 5-HT₂ receptors modulate excitatory neurotransmission to cardiac vagal neurons within the nucleus ambiguous evoked during and after hypoxia. **Neuroscience.** v. 164, p. 1191–1198, 2009.

DJORDJEVIC, J; DJORDJEVIC, A; ADZIC, M; ELAKOVIĆ, I; MATIĆ, G; RADOJCIC, M. B. Fluoxetine affects antioxidant system and promotes apoptotic signaling in Wistar rat liver. J. Djordjevic et al. / **European Journal of Pharmacology** p. 61–66, 2012.

E. DE MARINIS, E. ACAZ-FONSECA, M.A. AREVALO, P. ASCENZI, M. FIOCCHETTI, M. MARINO, *et al.*, 17beta-Oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor beta-mediated neuroglobin up-regulation, **J. Neuroendocrinol.** v. 25, p. 260–270, 2013.

ENGLER-CHIURAZZI, E. B; BROWN, C.M; POVROZNIK, J.M; SIMPKINS, J.W. Estrogens as neuroprotectants: Estrogenic actions in the context of cognitive aging and brain injury, **Prog. Neurobiol.** v. 157, p. 188–211, 2017.

ENGLER-CHIURAZZI, E.B; SINGH, M; SIMPKINS, J.W. From the 90's to now: A brief historical perspective on more than two decades of estrogen neuroprotection, **Brain Res.** v. 1633, p. 96–100, 2016.

ERICKSON, J. T.; SHAFER, G.; ROSSETTI, M. D.; WILSON, C. G.; DENERIS, E. S. Arrest of 5HT neuron differentiation delays respiratory maturation and impairs neonatal homeostatic responses to environmental challenges. **Respir. Physiol. Neurobiol.** v. 159, p. 85–101, 2007.

ERICKSON, J. T.; SPOSATO, B. C. Autoresuscitation responses to hypoxia-induced apnea are delayed in newborn 5-HT-deficient Pet-1 homozygous mice. **J. Appl. Physiol.** v. 106, p. 1785–1792, 2009.

ERSPAMER, V; ASERO, B. Isolation of enteramine from extracts of posterior salivary glands of octopus vulgaris and of discoglossuspictus skin. **Journal of Biological Chemistry**. Italy, 1952.

ERSPAMER, V; GHIRETTI, F. **Journal Physiol.** p.115 – 470, 1951.

FAWCETT, DON WAYNE, The cell. 2^a edition. Chapter 7. p. 410-468. 1981.

FIORICA-HOWELLS. E, MAROTEAUX. L, GERSHONMD. Serotonin and the 5-HT_{2B} Receptor in the Development of Enteric Neurons. **J Neuroscience**, p. 294–305, 2000.

FREITAS, L. S. **Estudo anatômico do tronco encefálico por imagens de ressonância magnética de 3 teslas e correlação com cortes histológicos**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina da Faculdade de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

FRIEDLANDER, A.H; JONES, L.J. The biology, medical management, and podiatric implications of menopause, **J. Am. Podiatr. Med. Assoc.** v. 92, p. 437–443, 2002.

FULLER, R. W; WONG, D. T; ROBERTSON, D. W. Fluoxetine, a selective inhibitor of serotonin uptake. **Med. Res. Rev.** p. 17–34, 1991.

G. PATKI, F.H. ALLAM, F. ATROOZ, A.T. DAO, N. SOLANKI, G. CHUGH, *et al.*, Grape powder intake prevents ovariectomy-induced anxiety-like behavior, memory impairment and high blood pressure in female Wistar rats, **PLoS One**, v. 8, 2013.

G. WANG, C.T. DRAKE, M. ROZENBLIT, P. ZHOU, S.E. ALVES, S.P. HERRICK, *et al.*, Evidence that estrogen directly and indirectly modulates C1 adrenergic bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla, **Brain Res.** v. 1094, p. 163–178, 2006.

G. WANG, C.T. DRAKE, M. ROZENBLIT, P. ZHOU, S.E. ALVES, S.P. HERRICK, *et al.*, Evidence that estrogen directly and indirectly modulates C1 adrenergic bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla, **Brain Res.** v. 1094, p. 163–178, 2006.

GILLIES, G.E; MCARTHUR, S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines, **Pharmacol. Rev.**v. 62, p. 155–198, 2010.

GIOVANNI, G. Serotonin in the pathophysiology and treatment of CNS disorders.**Exp Brain Res.** p. 371 – 373, 2013.

GUTKNECHT, L; ARARAGI, N; MERKER, S. R; WAIDER, J; SOMMERLANDT, F. M. J; MLINAR, B; BACCINI, G; MAYER, U; PROFT, F; HAMON, M; SCHMITT1, A. G; CORRADETTI, R; LANFUMEY, L; LESCH, K. P. Impacts of Brain Serotonin Deficiency following Tph2 Inactivation on Development and Raphe Neuron Serotonergic Specification. **Plos One**, v. 7, 2012.

HAINES, DUANE E. Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications 3th Edition.**Churchill Livingstone**, 2006.

HALLIDAY, G. M; LI, Y. W; BLUMBERGS, P.C; JOH, T. H; COTTON, R. G; HOWE, P. R; BLESSING, W. W; GEFFEN, L. B. Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease.**Ann Neurol.** v. 27, p. 373-85, 1990.

HANNON, J; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors.**Behavioural Brain Research**,p. 198–213, 2008.

HARISH,G; VENKATESHAPPA, C; MAHADEVAN, A; PRUTHI, N; SRINIVAS BHARATH, M. M; SHANKAR, S.K. Glutathione metabolism is modulated by postmortem interval,gender difference and agonal state in postmortem human brains, **Neurochem. Int.** v. 59, p. 1029–1042, 2011.

HOLLENBECK, P. J.; SAXTON, W. M. O transporte axonal das mitocôndrias. **J Cell Sci.** 2005.

HORIUCHI, D; PILLING, A. D; LIVELY, C. M; SAXTON, W. M. Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in Drosophila motor axons. **MolBiol Cell.** v. 17, p. 2057–2068, 2006.

HORNUNG, JEAN-PIERRE. The human raphe nuclei and the serotonergic system.**Journal of Chemical Neuroanatomy.** v. 26, p. 331–343, 2003.

HOYER, D; CLARKE, D; FOZARD, JR; HARTIG, P. R; MARTIN, G. R; MYLECHARANE, E. J; *et al.* International union of pharmacology classification of receptors for 5- hydroxytryptamine (serotonin). **Pharmacol Rev.** p. 157–203, 1994.

IMAI, H.; STEINDLER, D. A.; KITAI, S. T. The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol.** v. 243, p. 363–380, 1986.

INADA, N. M; ZECCHIN, K. G; ALBERICI, L. C; DEGASPERI, G. R; OLIVEIRA, H. C. F. Mitochondrial oxidative stress and permeability transition: Tumor cell death, immune response and dyslipidemias. **Free Radical Pathophysiology.** 2008.

ISHIDA, S, HUANG E, ZUZAN H, SPANG R, LEONE G, WEST M, NEVINS JR. Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. **Mol Cell Biol.** v. 21, p. 46-99, 2001.

JENSEN, P.; FARAGO, A. F.; AWATRAMANI, R. B.; SCOTT, M. M.; DENERIS, E. S.; DYMECKI, S. M. Redefining the serotonergic system by genetic lineage. **Nat. Neurosci.** v. 11, p. 417–419, 2008.

KEANEY JR., J. F; SOLOMON, C. G. Postmenopausal hormone therapy and atherosclerosis—time is of the essence, **N. Engl. J. Med.** v. 374, p. 1279–1280, 2016.

KINNEY, H. C.; BROADBELT, K. G.; HAYNES, R. L.; ROGNUM, I. J.; PATERSON, D. S. The serotonergic anatomy of the developing human medulla oblongata: Implications for pediatric disorders of homeostasis. **Journal of Chemical Neuroanatomy.** v. 41, p. 182–199, 2011.

KINNEY, H. C.; RICHERSON, G. B.; DYMECKI, S. M.; DARNALL, R. A.; NATTIE, E. E. The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. **Annu. Rev. Pathol.** v. 4, p. 517–550, 2009.

KISHI, T; HIROOKA, Y; KIMURA, Y; ITO, K; SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, **Circulation.** v. 109, p. 2357–2362, 2004.

KROEZE W. K, KRISTIANSEN K, ROTH B. L. Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. **Curr Top Med Chem.** p. 507–528, 2002.

LAM, D. D; GARFIELD, A. S; MARSTON, O. J; SHAW. J; HEISLER, LK. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. **PharmacolBiochem and Behav.**97: 84–91, 2010.

LEE, S.K; RYU,P. D; LEE,S.Y. Estrogen replacement modulates voltage-gated potassium channels in rat presympatheticparaventricular nucleus neurons, **BMC Neurosci.**v. 14, p. 134, 2013.

LESCH, K. P;WAIDER, J. Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. **Neuron**, v. 76, 2012.

LI, W; WANG, F; MENUT, L; GAO, F.B. BTB/POZ-zinc finger protein abrupt suppresses dendritic branching in a neuronal subtype-specific and dosage-dependent manner. **Neuron**, v. 43, p.823 -834, 2004.

LOVICK, T. A. The medullary raphe nuclei: a system for integration and gaincontrol in autonomic and somatomotor responsiveness? **Exp. Physiol.** v. 82, p. 31–41, 1997.

M. POURGANJI, M. HOSSEINI, M. SOUKHTANLOO, H. ZABIHI, M.A. HADJZADEH,Protectiverole of endogenous ovarian hormones against learning and memory impairmentsand brain tissues oxidative damage induced by lipopolysaccharide, **Iran RedCrescent Med J.**v. 16, 2014.

MARTINS, A. C. C. L. **Determinação de precursores da Serotonina – Triptofano e 5-Hidroxitriptofano – em café por clae-par iônico.**Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

MARTINS, D. B; MAZZANTI, C. M; FRANCA, R. T; PAGNONCELLI, M; COSTA, M; DESOUZA,E.M. *et al.*, 17-beta estradiol in the acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and blood of ovariectomized adult and middle-aged rats,**Life Sci.** v.90, p. 351–359, 2012.

MASON, P. Contributions of the medullary raphe and ventromedial reticular region to pain modulation and other homeostatic functions. **Annu. Rev. Neurosci.**v. 24, p. 737–777, 2001.

- MEALEY, B. L; MORITZ, A.J. Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium, **Periodontol.**v. 32, p. 59–81, 2003.
- MENESES, A. Stimulation of 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2A/2C, 5-HT3 and 5-HT4 receptors or 5-HT uptake inhibition: short- and long-term memory. **Behav Brain Res.** v. 184, p. 81–90, 2007.
- MISIAK, M; BEYER, C; ARNOLD, S. Gender-specific role of mitochondria in the vulnerability of 6-hydroxydopamine-treated mesencephalic neurons, **Biochim.Biophys.**p. 1178–1188, 2010.
- MOISEWITSCH, J. R. The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial development. (critical review oral biology medicine) **Crit Rev Oral Biol Med.** p. 230–239, 2000.
- MORENO, R. A; MORENO, D. H; SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Rev Bras Psiquiatr.** v.21, 1999.
- MORRIS, R. L; HOLLENBECK, P. J. The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. **J Cell Sci.** v. 104, p. 917–927, 1993.
- MURPHY, E. Estrogen signaling and cardiovascular disease, **Circ. Res.**v. 109, p. 687–696, 2011.
- NAKAMURA, M; UENO, S.; SANO, A.; TANABE, H. The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. **Mol. Psychiatry.** V.5, p. 32–8, 2000.
- NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica.**3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- NELSON, L. R; BULUN,S.E.Estrogen production and action, **J. Am. Acad. Dermatol.**p. 45, p. 116-124, 2001.
- NETTER, F. H. **Atlas de Anatomia Humana.** 4a Edição. Rio de Janeiro: Elsevier. P. 532, 2006.

NICHOLLS J. G.; PATON J. F. R. Brainstem: neural networks vital for life. **Philosophical Transactions Royal Society**, p. 2447–2451, 2009.

NORDQUIST, N; ORELAND, L. Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders - a review, Upsala **Journal of Medical Sciences**, p. 2-10, 2010.

ÖGREN, S. O; ERIKSSON, T. M; ELVANDER-TOTTIE, E; D'ADDARIO, C; EKSTROM, J. C; SVENNINGSSON, P; MEISTER, B; KEHR, J; STIEDL, O. The role of 5-HT_{1A} receptors in learning and memory. **Behavioral Brain Research**, v. 195, p. 54 – 77, 2008.

OLIVEIRA-SALES, E. B; DUGAICH, A. P; CARILLO, B.A; ABREU, N. P; BOIM, M. A; MARTINS, P. J. *et al.*, Oxidative stress contributes to renovascular hypertension, **Am. J. Hypertens.** v. 21, p. 98–104, 2008.

OLIVEIRA, W. Abraço de Pai João. Pai João de Angola (Espírito): psicografado por Wanderley Oliveira. **DUFAX**: Belo Horizonte, MG. 2015. 224p.

PIERCE, J. P; KIEVITS, J; GRAUSTEIN, B; SPETH, R.C; IADECOLA, C; MILNER, T.A. Sex differences in the subcellular distribution of angiotensin type 1 receptors and NADPH oxidase subunits in the dendrites of C1 neurons in the rat rostral ventrolateral medulla, **Neuroscience**, v. 163, p. 329–338, 2009.

PIKE, C.J. Sex and the development of Alzheimer's disease, **J. Neurosci. Res.** v. 95, p. 671–680, 2017.

R. SANDHIR, N. SETHI, A. AGGARWAL, A. KHERA, Coenzyme Q10 treatment ameliorates cognitive deficits by modulating mitochondrial functions in surgically induced menopause, **Neurochem. Int.** v. 74, p. 16–23, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Outros mediadores periféricos: 5-hidroxitriptamina e purinas. In: RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. (Ed.) **Farmacologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 139-141. 1995.

RAPPORT, M. M.; GREEN, A. A.; PAGE, I. H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. **J Biol Chem**, v. 176, n. 3, p. 1243-51, Dec 1948.

REYNOLDS, P. D; GARTNER, W. B; SHAVER, K. G; CARTER, N. M. **Handbook of Entrepreneurial Dynamics: The Process of Business Creation**, SAGE. p. 299-310, 2004.

RYAN,K.J. Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology, **Cancer Res.**v. 42, p. 3342–3344, 1982.

SAKOWSKI, S. A.; GEDDES, T. J.; THOMAS, D. M.; LEVI, E.; HATFIELD, J. S.; KUHN, D. M. Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. **Brain Res** 1085: p. 11–8. 2006.

SALEH, T.M; CONNELL,B.J.17beta-estradiol modulates baroreflex sensitivity and autonomic tone of female rats, **J. Auton. Nerv. Syst.** v. 80, p. 148–161, 2000.

SALEH, T.M; CONNELL,B.J.Centrally mediated effect of 17beta-estradiol on parasympathetic tone in male rats, **Am. J. Phys.**v. 276, p. 474 – 481, 1999.

SCHEIBEL, M. E; TOMIYASU, U; SCHEIBEL, A. B. Do Raphe nuclei of the reticular formation have a neurosecretory or vascular sensor function? **Experimental neurology**, v. 47, p. 316 – 329, 1975.

SEVERSON, C. A; WANG, W; PIERIBONE, V. A; DOHLE, C. I; RICHERSON, G. B. Midbrain serotonergic neurons are central pH chemoreceptors. **Nat Neurosci.** v. 6, p. 38-40, 2003.

SHAUN, F.; MORRISON.; NAKAMURA, K. Central neural pathways for thermoregulation. **Front. Biosci.** v. 16, p. 74–104, 2011.

SHIH,C.D. Activation of estrogen receptor beta-dependent nitric oxide signaling mediates the hypotensive effects of estrogen in the rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats, **J. Biomed. Sci.**v. 16, 2009.

SHIH, C.D. Activation of estrogen receptor beta-dependent nitric oxide signaling mediates the hypotensive effects of estrogen in the rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats, **J. Biomed. Sci.**v. 16, p. 60, 2009.

SHUGHRUE,P.J; LANE,M.V; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogenreceptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system, **J. Comp.Neurol.** v. 388,p. 507–525, 1997.

SHUGHRUE,P.J; MERCHENTHALER,I. Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system, **J. Comp.Neurol.**v. 436, p. 64 - 81, 2001.

SNELL, R. S. **Clinical Neuroanatomy**. Seventh Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, January, 2009.

STAHL, S. M, GRADY, M. M. Differences in mechanism of action between current and future antidepressants. **J Clin. Psychiatry**, 2003.

STAHL, S. M. **Essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical application** / Stephen M. Stahl with illustrations by Nancy Muntner. 2nd ed. p. 601. New York, 2000.

STAHL, S. M.**Psychopharmacology of Antidepressants**. London: Martin Dunitz, 1997.

STAHL, S. M. Selectivity of SSRIs: individualizing patient care through rational treatment choices. Int. **J Psychiatry in Clinical Practice**, 2004.

STAHL, S. M. Symptoms and circuits, part 1: major depressive disorder. **J Clin Psychiatry**, 2003.

STERN,J.E; ZHANG, W. Preautonomic neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus contain estrogen receptor betan, **Brain Res.**v. 975, p. 99–109, 2003.

SUBRAMANIAN, M; BALASUBRAMANIAN, P; GARVER, H; NORTHCOTT, C; ZHAO, H;HAYWOOD,J.R. et al., Chronic estradiol-17beta exposure increases superoxideproduction in the rostral ventrolateral medulla and causes hypertension: reversalby resveratrol, **Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.** v. 300, p. 1560–1568, 2011.

T. SAITO, A. CIOBOTARU, J.C. BOPASSA, L. TORO, E. STEFANI, M. EGHBALI, Estrogen contributes to gender differences in mouse ventricular repolarization, **Circ. Res.** v. 105, p. 343–352, 2009.

TAMRAKAR, P; BRISKI, K.P. Impact of recurrent hypoglycemic stress on hindbrain A2nerve cell energy metabolism and catecholamine biosynthesis: modulation byestradiol, **ActaNeurobiol. Exp.** v. 77,p. 31–44, 2017.

TAYLOR, N. C.; LI, A.; NATTIE, E. E. Medullary serotonergic neurones modulate the ventilatory response to hypercapnia, but not hypoxia in conscious rats. **J. Physiol.**, v. 566, p. 543–557, 2005.

TORK, I. Anatomy of the serotonergic system. **Ann. NY Acad. Sci.** v. 600, p. 9–34, 1990.

TORK, I., HORNING, J. P. Raphe nuclei and serotonin containing systems. In: **The human nervous system**. San Diego: G. Paxinos, p 1001-1022, 1990.

TÖRK, I.; HORNING, J. P. Raphe nuclei and serotonin containing systems. In: Paxinos, G. (Ed.), **The Human Nervous System**. Academic Press, San Diego, p. 1001–1022, 1990.

TRIMMER, P. A; BORLAND, M. K. Differentiated Alzheimer's disease transmitochondrialcybrid cell lines exhibit reduced organelle movement. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, p. 1101–1109, 2005.

TRYBA, A. K.; PENA, F., RAMIREZ, J. M. Gasping activity in vitro: a rhythmdependent on 5-HT_{2A} receptors. **J. Neurosci.** v. 26, p. 2623–2634, 2006.

VASWANI M, LINDA FK, RAMESH S: Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. **Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry**, 2003.

VILLA, R. F; FERRARI, F; GORINI, A; BRUNELLO, N; TASCEDDA, F. Effect of desipramine and fluoxetine on energy metabolism of cerebral mitochondria. **Neuroscience**. v. 25, p. 326 – 330, 2016.

WANG, G; MILNER, T.A; SPETH, R.C.; GORE, A.C.; WU, C; IADECOLA, C. et al., Sex differences in angiotensin signaling in bulbospinal neurons in the rat rostral ventrolateral medulla, **Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.** v. 295, p. 1149–1157, 2008.

WANG, S. HE, R.R. Effects of intracarotid injection of 17beta-estradiol on electrical activity of rostral ventrolateral medullary neurons in male rats, **Sheng Li XueBao**, v. 54, p. 47–54, 2002.

WANG, S; HE, R.R. Effects of intracarotid injection of 17beta-estradiol on electrical activity of rostral ventrolateral medullary neurons in male rats, **Sheng Li XueBao**, v. 54, p. 47–54, 2002.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience. **N. Europsychopharmacology**. v. 21, n. 2S, 1999.

WU, K. L.; CHEN, C. H.; SHIH, C. D. Nontranscriptional activation of PI3K/Akt signaling mediates hypotensive effect following activation of estrogen receptor beta in therostral ventrolateral medulla of rats, **J. Biomed. Sci.** v. 19, p. 76, 2012.

WU, K. L.; CHEN, C. H.; SHIH, C. H. Nontranscriptional activation of PI3K/Akt signaling mediates hypotensive effect following activation of estrogen receptor beta in therostral ventrolateral medulla of rats, **J. Biomed. Sci.** v. 19, p. 76, 2012.

WYLIE, C. J., HENDRICKS, T. J., ZHANG, B., WANG, L., LU, P., LEAHY, P., FOX, S., MAENO, H., AND DENERIS, E. S. Distinct transcriptomes define rostral and caudal serotonin neurons. **J. Neurosci.** p. 670–684, 2010.

YAMAGATA, M.; SANESY, J. R.; WEINERZ, J. A. Synaptic adhesion molecules. **Current Opinion in Cell Biology**, p. 621–632, 2003.

YODIN, M. B.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F. **Nat Neuroscience**, p. 295-309. 2006.

YUEN, E. Y.; JIANG, Q.; CHEN, P.; GU, Z.; FENG, J.; YAN, Z. Serotonin 5-HT1A receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule dependent mechanism. **J. Neurosci.** v. 25, p. 5488–5501, 2005.

**APÊNDICE A - ARTIGO DE REVISÃO ACEITO NA *LIFE SCIENCES*
(QUALIS B1)**

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

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

Review article

Protective effects of estrogen against cardiovascular disease mediated via oxidative stress in the brain[☆]

Claudia J. Lagranha^{a,b,*}, Tercya Lucidi Araujo Silva^{a,b}, Severina Cassia A. Silva^b, Glaber Ruda F. Braz^b, Aline Isabel da Silva^{a,b}, Mariana Pinheiro Fernandes^b, Donald F. Sellitti^c

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

^b Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, Department of Physical Education and Sports Science, Federal University of Pernambuco–CAV, Vitória de Santo Antão 55608-680, Brazil

^c Department of Anatomy, Physiology, and Genetics, School of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD, USA

ARTICLE INFO

Keywords:
Oxidative stress
Estradiol
Neuroprotection
Brainstem

ABSTRACT

During their reproductive years women produce significant levels of estrogens, predominantly in the form of estradiol, that are thought to play an important role in cardioprotection. Mechanisms underlying this action include both estrogen-mediated changes in gene expression, and post-transcriptional activation of protein signaling cascades in the heart and in neural centers controlling cardiovascular function, in particular, in the brainstem. There, specific neurons, especially those of the bulbar region play an important role in the neuronal control of the cardiovascular system because they control the outflow of sympathetic activity and parasympathetic activity as well as the reception of chemical and mechanical signals. In the present review, we discuss how estrogens exert their cardioprotective effect in part by modulating the actions of internally generated products of cellular oxidation such as reactive oxygen species (ROS) in brain stem neurons. The significance of this review is in integrating the literature of oxidative damage in the brain with the literature of neuroprotection by estrogen in order to better understand both the benefits and limitations of using this hormone to prevent cardiovascular disease.

1. Introduction

During a 30–40 year reproductive period beginning with menarche and ending with menopause, women produce in a cyclic fashion a number of steroid, protein, and small polypeptide hormones important for the onset and maintenance of reproductive capability, and the development of secondary sexual characteristics. Although classically associated with their role in the female reproductive cycle, estrogens are increasingly being recognized for their protective actions against chronic and degenerative diseases affecting the cardiovascular system [1] and other organ systems that are not directly related to reproduction. This non-reproductive role for estrogens may underlie the long-recognized advantages that women have over men in retaining their general health and in attaining greater longevity.

The term 'estrogen' refers to a small group of steroidal hormones important in the control of the reproductive cycle. The three major estrogens are estrone (E1), 17- β -estradiol (E2) and estril (E3) which

differ from each other in the number of hydroxyl groups or ketones [2] present, but which exhibit to varying degrees the same effects on target reproductive organs and secondary sexual characteristics. 17- β -estradiol is the predominant estrogen during the reproductive years, both in its total serum concentration and in overall estrogenic activity. Most of the circulating estrogen in premenopausal women is produced by the ovaries, largely as a result of secretion from the granulosa cells of developing follicles, and during pregnancy is supplemented by estrogen secretion from the placenta. Estrogens are also produced in small quantities by several peripheral tissues such as liver, adrenal gland, mammary glands, adipose tissue and brain. Similar to ovarian granulosa cells, the expression of the enzyme aromatase in these tissues allows local conversion of C-19 steroids such as androstenediol to estrogens, although at much lower levels than in the ovary [3,4].

In the perimenopausal period and during menopause, there is a massive reduction in the production of estrogens due to the exhaustion of ovarian follicles and consequently, a failure of the gonadotropins

[☆] The authors are thankful to the State of Pernambuco Science and Technology Support Foundation (FACEPE APQ- 0164-4.05/15; 1026-4.09/12) for the financial support. The authors declare that there are no conflicts of interest.

* Corresponding author at: Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória - CAV/UFPE, Laboratório de Bioquímica e Bioquímica do exercício, Rua Alto do Reservatório, S/N - Bela Vista, CEP 55608-680 Vitória de Santo Antão - PE, Brasil.

E-mail address: claudia.lagranha@ufpe.br (C.J. Lagranha).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.043>

Received 26 July 2017; Received in revised form 7 November 2017; Accepted 26 November 2017

Available online 28 November 2017

0024-3205/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

(follicle-stimulating hormone; FSH) and luteinizing hormone; LH) [5] to maintain high circulating levels of the estradiol. With the elimination of ovarian estrogens at menopause, the extra-ovarian production of estrogens becomes predominant, and the main plasma estrogen during this period is estrone, a less potent estrogen than 17- β -estradiol [6].

Numerous studies have demonstrated an effect of estrogens in combating the onset and progression of heart disease by acting on organs associated with both the central and peripheral control of cardiovascular function through specific receptors located in these organs [7–9]. Prior to the past decade, almost all of the cardiovascular effects of estrogen were attributed to the binding to a specific steroid receptor, which upon associating with estrogen would then translocate to the nucleus to function as a transcription factor for specific genes. One example of an estrogen-responsive, cardioactive gene is nitric oxide synthase (NOS), the enzyme responsible for production of nitric oxide [7]. More recently, it has become recognized that estrogens also signal through activation of plasma membrane estrogen receptors (ER) (in particular, ER- β) that activate the phosphoinositol-3-kinase signaling pathway (PI3K) to increase cardiovascular protection [8]. The PI3K signaling cascade may also be initiated by estrogen (specifically, estradiol) binding to a G-protein-linked orphan receptor known as GPR30 [8]. Thus estrogen cardioprotection can be ascribed to effects on both gene expression and signaling cascades coupled to membrane receptors at the level of the vascular smooth muscle cell and other cells of the cardiovascular system [9,10].

Compared to investigations into direct protective effects of estrogen on cardiovascular cells, studies on estrogen action in specific regions of the brain related to CV function are relatively few, and estrogen control of the brainstem, the area of the brain most essential to cardiovascular maintenance, is not yet fully understood. Groups of neurons located in the brainstem; specifically in regions of the bulb (the nucleus tractus solitarius [NTS]) and the rostral ventrolateral medulla [RVLM]) are important sites for CV control, as they are the main central regulators of sympathetic activity, transducing afferent signals from arterial baroreceptors and central and peripheral chemoreceptors into changes in cardiovascular status [11–14]. Among the most important mechanisms regulating this brainstem activity is the production of reactive oxygen species (ROS). Chan et al. [15] has demonstrated that increased ROS production induced by mitochondrial dysfunction in concert with a reduction in antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and catalase induces hyperactivation of the sympathetic system [15]. More recently, Chan et al. [16], Kaludercic et al. [17] and Rubattu et al. [18] presented data suggesting a strong relationship between the formation of mitochondrial ROS and hyperactivation of the nervous system leading to an increase in vasomotor sympathetic tone and hypertension [16–18].

Our recent research has focused on the mechanisms by which oxidative stress is initiated following abnormalities in nutrition such as protein malnutrition or obesity, in order to better understand how nutrition-linked stress in early development ultimately leads to cardiac disease in later life [19]. Specifically, our data, plus that of other researchers [20,21], has shown that certain nutritional deficiencies in the perinatal developmental period induce high oxidative stress and a concomitant reduction in numerous antioxidant defenses in both the heart and the brainstem of adult male rats, and that this nutritional insult also is linked to the development of hypertension in adulthood [20–22]. Putting these data together with the existing literature on the subject of cardiovascular disease prevention and the specific therapies used to attain this goal [23,24], we discuss here the concept of using estrogens to combat the oxidative stress in the brainstem that ultimately leads to cardiovascular disease in the adult. The objective of this review is to give a brief overview of oxidative stress on centers of cardiovascular control in the brain, together with a review of the literature of estrogen neuroprotection to discuss a role for estrogens in reducing the harmful cardiovascular sequelae of oxidative stress in the brainstem.

2. Materials and methods

To conduct this review, a search for scientific articles was carried out in *Pubmed* and *Science Direct* databases using the following descriptors: “Oxidative stress; Estradiol; Female; Brainstem; NTS; RVLM”. The inclusion criteria for articles included in this manuscript were: publication period (2010 through 2017), availability of the article, and a discussion of at least two of the above descriptors. In addition to the recent articles, classic manuscripts (published prior to 2010, and referring to at least two of the above descriptors) were used in the discussion of the more basic concepts presented here.

3. Oxidative stress in the brain

3.1. Mechanisms

Reactive oxygen species, including the superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) and the hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$), can cause the oxidation of membrane lipids, proteins, DNA, and other biomolecules critical to cell survival. Under normal physiologic conditions, the enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx or GPx) and catalase (CAT), are able to sequester or reduce the damage induced by ROS by inhibiting their formation or inactivating them [25]. In addition to the enzymatic defenses, cells can defend themselves against oxidative damage using non-enzymatic molecules that act as antioxidants. The main molecule in this category is glutathione in its reduced form (GSH) [26]. When an imbalance occurs between the oxidizing elements and the antioxidant elements in the cell, tending toward greater concentrations of the oxidizers than antioxidants, a sequence of reactions is initiated that results in structural damage to organelles (e.g. mitochondria, plasma membrane) and to the molecular components (lipids, proteins, DNA) of those organelles. This process is termed oxidative stress [25] (Fig. 1).

Oxidative stress has been linked to a broad range of pathologies including a number of cardiovascular diseases and neurologic disorders, the latter including Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Alzheimer's disease. The brain is especially vulnerable to oxidative stress for several reasons:

- It consumes a disproportionately large fraction of total O_2 . It is estimated that, under basal conditions, 20% of the O_2 consumed by the body is used by the brain, primarily to maintain the necessary ionic gradients for generating action potentials [27];
- It possesses a high concentration of metal ions capable of reacting with certain ROS species and forming hydroxyl radicals [28,29];
- Its cells possess membranes rich in polyunsaturated fatty acids and are thus particularly vulnerable to oxidative processes [25];
- It produces H_2O_2 via enzymes responsible for the recycling of the monoamines (e.g. serotonin, norepinephrine and dopamine) that are employed as neurotransmitters in the brain [30,31];
- It releases excitatory neurotransmitters such as glutamate that elevate Ca^{2+} and lead to oxidative stress and cell death [19,25].

The brain's particular vulnerability to oxidative stress compared to other organs increases the likelihood of a transduction of the oxidative damage to neurons and supporting cells into permanent changes in the neural pathways that control cardiovascular function and other ‘involuntary’ responses such as thermoregulation. Together, these pathways make up a central autonomic network composed of neurons in higher brain centers (including the limbic system) and the hypothalamus, sending and receiving information to and from specific regions of the brainstem (including the rostral ventral lateral medulla [RVLM]) that in turn control the peripheral autonomic nervous system and its cardiovascular responses such as heart rate and vascular tone. Interposed between the limbic and hypothalamic inputs above, and the brain stem/peripheral autonomic inputs below are the neurons of the

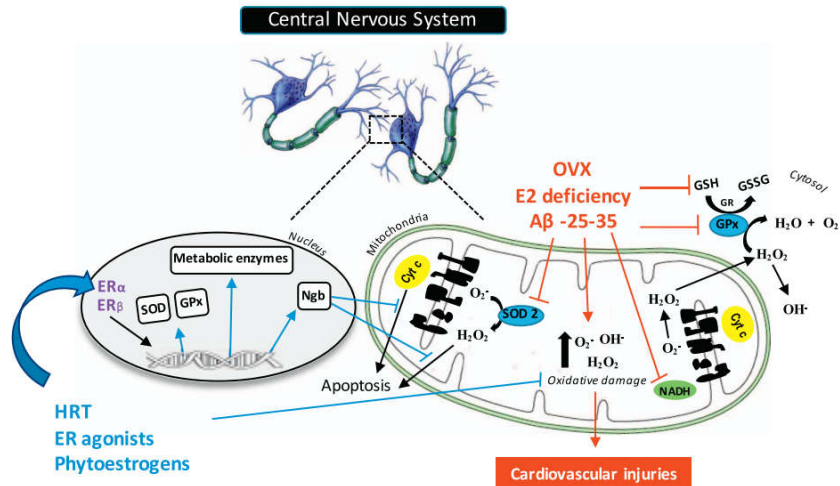


Fig. 1. Pathways of estrogen action in central nervous system oxidative stress and apoptosis. Blue arrows/lines indicate estrogen neuroprotection mediated by activation of estrogen receptors (ER α and ER β) and expression of genes/proteins involved in antioxidant and metabolic defense (SOD, GPx, metabolic enzymes). Also shown is an estrogen-induced increase in neuroglobin (Ngb) expression that inhibits apoptosis by blocking cytochrome c (Cyt c) and hydrogen peroxide (H_2O_2) release from mitochondria. Red arrows/lines show the consequences of estrogen deficiency in several pathways that inhibit antioxidant activity of mitochondrial superoxide dismutase (SOD 2) and cytosolic glutathione peroxidase (GPx), in addition to altering redox status (lower reduced glutathione-GSH/oxidized glutathione-GSSG ratio) and reducing nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) levels. All of these molecular effects play a significant role in causing oxidative damage and the development of cardiovascular injuries. A β -25-35, beta amyloid 25-35, used to exacerbate oxidative stress; GR, glutathione reductase; HRT, hormone replacement therapy; $O_2^{\cdot-}$, superoxide anion; $OH^{\cdot}$, hydroxyl radical; OVX, ovariectomy. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

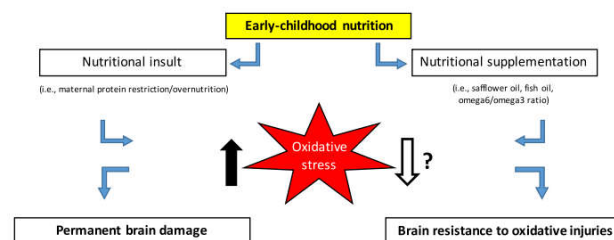


Fig. 2. Early nutritional involvement in oxidative stress and its effects on brain. Poor nutrition at the beginning of life increases oxidative damage (i.e., reduced antioxidant enzyme activity and/or increased mitochondrial ROS production), while the effects of nutritional supplementation on "oxidative status" in this period and subsequent effects in the brain will require further investigation.

paraventricular nucleus (PVN) that include both parvocellular and magnocellular neurons. As described in the sections below, the function of each of these components of the autonomic network has been shown to be subject to alterations in oxidative balance [32,33].

3.2. Nutritional effects on oxidative stress in the brain

Much of our recent research has centered upon how early nutritional insult (or, conversely, nutrient supplementation) can produce the changes in oxidative stress in specific areas of the brain that last into adulthood and alter cardiovascular function [22,34–38]. In a series of studies performed in Wistar rats, we showed that maternal protein restriction leads to an increase in measures of oxidative stress and a reduction in antioxidant metabolism in the brainstems of both newborn [37] and fully mature (i.e., 100-day old) [22] male offspring. Furthermore, we determined that the increased oxidative stress in the medulla

of 90-day old rats born to protein-restricted mothers coincided with increased arterial blood pressure and heart rate in those animals [35]. These experimental findings have clear implications for understanding how poor maternal and early-childhood nutrition can increase the risk for chronic diseases of adulthood. Conversely, we demonstrated that prenatal and perinatal intervention with specific nutritional supplements such as safflower (*Carthamus tinctorius*) oil [39] and fish oil [40] led to complex changes in measures of antioxidant activity, including decreased SOD and increased glutathione-S-transferase with safflower oil treatment, and increased SOD activity with fish oil in specific regions of the brain. In addition, we showed that omega-3 deficiency [41] impaired anti-oxidant defenses in the substantia nigra, and that cerebellar antioxidant status could be rescued from the damage incurred by a nutrient-deficient diet by lowering the omega6/omega3 ratio of the diet [42]. Overall, these studies support the hypothesis that permanent brain changes resulting from poor nutrition could be mediated by

increased oxidative stress and/or decreased anti-oxidant activity in the neurons or other brain cells of the malnourished animals (Fig. 2).

4. Neuroprotective effects of estrogen

4.1. Clinical observations

An extensive literature has been amassed over the past two decades pointing to the neuroprotective benefits of estrogen, and supporting the clinical use of estrogen or estrogenic compounds in the treatment of Alzheimer's disease, stroke, and other chronic and acute brain disorders [43]. The subject has been ably reviewed [44–50], and will not be treated at length here. However, several recent papers serve to illustrate the complexity of the field and the broad range of possible mechanisms that have been suggested to underlie the neuroprotective action of the hormone. Clinical studies have shown that the incidence of Alzheimer's disease (AD) is similar among men and women, however in old age, women appear to have a higher incidence of AD than men [51]. The increased proportion of AD in elderly women could be due to their greater life expectancy, but it could also result from the decline in sex steroid hormone levels that begins around menopause [52] as the precipitous decline in serum estradiol eliminates the 'protective' state that had existed previously in the female brain, allowing neurodegenerative processes to begin. In addition, it has been shown that estrogen supplementation in post-menopausal women helps to maintain memory and cognition in what could be regarded as a partial restoration of the protective effect of E2 in the brain [53].

However, the numerous investigations into the clinical effects of long-term hormone replacement therapy (HRT) showing that it increases the risk of developing reproductive cancers [54] suggests that the safe and effective use of estrogens as neuroprotectants will require the careful separation of the damaging effects of the hormone from the beneficial ones via timing, dosing, delivery method, and the selective targeting of the estrogen therapy (e.g. using receptor-specific ER agonists and estrogenic compounds such as phytoestrogens) [55].

Moreover, any proposed link between estrogen effects in the brain and cardiovascular protection must take into account the results of several large randomized studies of estrogen replacement in post-menopausal women either with cardiovascular disease, or without cardiovascular disease (the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study [HERS], and The Women's Health Initiative [WHI] study, respectively) that have disappointingly been unable to show protective cardiovascular effects from hormone replacement therapy [56]. Much of the focus on why the HERS and WHI studies did not show definitive beneficial effects of the hormone has been on its 'peripheral' actions on the cardiovascular system, including changes to the endothelium and vascular smooth muscle [56,57], rather than on cardioprotective estrogen actions in the brain. Therefore, the results of the HERS/WHI trials would not seem to pose as much of a 'conundrum' in light of the numerous observational studies of neuroprotection by estrogen as it would in the face of the numerous reports of cardioprotection by the hormone. However, since our hypothesis links suppression of oxidative damage in the brainstem by estrogen with some of the beneficial cardiovascular effects of the hormone, we will still need to address the apparent discrepancy between the results of these randomized trials, and the body of literature supporting the therapeutic use of estrogen.

4.2. The role of androgens and aromatase

Also complicating the interpretation of clinical data regarding the protective effect of estrogen in brain disease and its potential therapeutic use is the observation that aromatase is expressed in neurons in specific brain regions, thus allowing the aromatization of circulating androgens to estrogens *in situ* in the brains of both males and post-menopausal females [53,58,59]. Moreover, it has been shown in the rat [58] that the enzyme is not only heterogeneously expressed in different

regions of the hypothalamus and limbic system, but that distribution of aromatase activity differs between the sexes, with males expressing higher levels in the medial amygdala, stria terminalis, suprachiasmatic preoptic and other limbic system nuclei than the female.

Clearly, the conversion of androgens to locally acting estrogens in both higher and lower brain centers, together with the formation of significant levels of circulating estrogen from peripheral tissues such as adipose and skin [3] should modify the classic view of estrogen neuro- and cardioprotection as an 'all-or-none' phenomenon dependent solely on levels of ovarian hormone that vary based on sex and reproductive age.

4.3. The role of antioxidant activity

A growing number of studies suggests that one mechanism through which estrogens support cardiovascular health is by maintaining a balanced oxidative state in both the cells of CVS, and in the brain cells that control the CVS through peripheral innervation [60–64]. The latter target is the subject of this review.

Bellanti et al. [65] showed in a study of women receiving estrogen replacement therapy that estrogen plays an important role in regulating redox equilibrium by increasing expression of antioxidant enzymes and restoring overall antioxidant status [65]. In a prospective population-based study in Japan, researchers found that women who began menopause before 40 years of age had a higher risk of suffering a stroke than those beginning menopause after this time [66]. Studies such as this support the concept that estrogen plays a clinically significant role in protecting women from cardiovascular disease by stimulating antioxidant responses (Table 1 and Fig. 1).

The mechanisms underlying the anti-oxidant-mediated protective effect of estrogens against heart and vascular disease have been explored in a number of experimental studies that in the aggregate show a complex regulation of brain cell genetics and function by estrogen. Some of these studies, like that of De Marinis et al. [67], emphasize the classic role of estrogen as a steroid hormone signaling through nuclear estrogen receptors (ER) that regulate the transcription of estrogen-responsive genes [67]. Specifically, these authors ascribed the beneficial effects of E2 in reducing H₂O₂-induced apoptosis in the hippocampus and reducing inflammation in primary cortical astrocytes to the induction of a specific gene and protein (neuroglobin) by E2 [67]. Other studies point to the regulation of additional E2-responsive genes. Patki et al. [68], observed in the hippocampus of rats made E2-deficient by ovariectomy (OVX), that oxidative stress was increased in this organ and that this in turn led to increased blood pressure and anxiety, accompanied by learning disability and memory loss [68]. Also working with the hippocampus of OVX rats, Bernal-Mondragon et al. [69], injected beta amyloid 25-35 (A- β 25-35) into the organ two weeks after ovariectomy and found that the oxidative stress generated by the administration of A- β 25-35 was sufficient to impair olfaction but that the olfactory defect could be prevented by administering E2 before and after A- β 25-35 injection [69]. The authors went on to suggest that the protective effect of estradiol was mediated through regulation of mitochondrial bioenergetics [69]. In a similar vein, Rao et al. [70], in assessing the protective effect of E2 against ischemia, observed an increase in the activity of the antioxidant enzyme SOD1 in cortical neurons together with a reduction in ischemia-induced brain damage inversely proportional to SOD1 activity in female rats treated with E2 for two weeks [70].

Sandhir et al. [71] using a rat OVX model observed a significant reduction in cognitive function, decreased levels of NADH, cytochrome C reductase and cytochrome C oxidase, redox status, and a significant decrease the activity of SOD and CAT enzymes in the brain compared to non-OVX controls [71]. Pourganji et al. [72] evaluating the effects of estrogen withdrawal on the oxidative state of the brain, using OVX rats and OVX rats stimulated with lipopolysaccharide (LPS) found elevated levels of MDA and a decrease in total thiol in both the LPS treated- and

Table 1
Effect of estrogen as neuroprotector.

Authors	Treatment	Effect	Area/Cell type
36	Different levels of E2 based on reproductive age	Elevation of oxidative stress biomarkers and reduction of antioxidant defenses in rats with lower E2	Brainstem
44	Male treated with E2	E2 decreases the firing rate of RVLM neurons, increases NOS production, without changes in blood pressure and heart rate	RVLM
45	Gender difference	Females have greater AT1 expression and less p47phox expression than males	RVLM
46	Male treated with E2	Decreases blood pressure, increases NOS expression and NO production	RVLM
47	Gender difference	Females have greater AT1 expression and less p47phox expression	RVLM
48	Female treated with E2	Increases systolic and diastolic blood pressure and ROS production	RVLM
49	Male treated with E2	Increases ER β , activates PI3K and AKT	RVLM
67	E2	Decreases effect of H ₂ O ₂ and increases neuroglobin expression	Cortical astrocytes
69	OVX + E2	OVX increases oxidative stress, E2 improves mitochondrial bioenergetics	Hippocampus
70	Females 5–9 days + E2	Increases SOD1 activity	Cortical neurons
71	OVX	Decreases NADH levels, GSH/GSSG ratio, SOD and CAT activity.	Total brain
72	OVX	Increases MDA levels and decreases total SH.	Hippocampus
73	Gender difference	Females possess more GSH	Cortex, cerebellum, bulb, substantia nigra, hippocampus
74	OVX	Increases oxidative stress	Hippocampus, striatum, cortex, cerebellum
75	Gender difference	Males produce more ROS; Male mesencephalic neurons are more vulnerable to 6-hydroxydopamine than female cells	Mesencephalic neurons
76	Gender difference	Male mesencephalic neurons are more vulnerable than female neurons to rotenone	Mesencephalic neurons
77	OVX + E2	E2 activates genes involved in AMPK activation	Caudal dorsal vagal complex
78	OVX + E2	E2 induces an increase in the expression of key glycolytic, Krebs cycle, oxidative phosphorylation, and lipid metabolism enzymes in A2 metabolo-sensory neurons	Caudal dorsal vagal complex
79	OVX + E2	E2 decreases oxidative stress, increases total anti-oxidant status and increases GPx activity	Total brain, (excluding cerebellum)
80	OVX + E2 Coumestrol	E2 and coumestrol decrease oxidative stress and increase anti-oxidant activity	Total brain
102	OVX + E2	Decreases Kv4.2 and I _A flow	RVLM

OVX- animals compared with control, suggesting that normal levels of E2 offer a protective effect against oxidative damage induced by inflammation in the hippocampus [72].

Regional specificity of the protective E2 effect is also indicated by the studies of Harish et al. [73] who showed higher GSH levels in specific areas of the female brain (frontal cortex, cerebellum, bulb, hippocampus and substantia nigra) compared to men of the same age [73]. In experimental studies with OVX rats at 5 and 10 months of age, several of the same regions (cortex, cerebellum and hippocampus) in addition to the corpus striatum presented high levels of oxidative stress that was reduced to control levels or even lower with E2 treatment [74].

Other studies hint at long-lasting or permanent differences in mitochondrial function between males and females due either to exposure to different estrogen milieu at sexual maturity, or to inherited differences at the level of the chromosome. Misiak et al. [75] found that mesencephalic neurons in culture obtained from male mice are more vulnerable to 6-hydroxydopamine (6-OHDA), a neurotoxin that destroys catecholaminergic terminals used in an experimental model of Parkinson's disease, than mesencephalic neurons obtained from female mice [75]. The authors attributed the gender-based differences in vulnerability to 6-OHDA to a greater ROS production in male mitochondria compared with female, possibly due to in vivo E2 regulation of transcription of mitochondrial and nuclear genes that causes increased respiratory chain activity, and decreased oxidative stress and apoptosis [75]. Tao et al. [76], moreover, using the same in vitro model of Parkinson's disease, demonstrated that male mesencephalic neurons are more vulnerable than female neurons to rotenone-induced cytotoxicity and that E2 has a moderately protective effect in neurons of both sexes [76]. Interestingly, the authors postulate a rather unusual mechanism underlying these gender-based differences, suggesting that the testis-determining region on the Y chromosome (SRY), upregulates monoamine oxidase A and downregulates estrogen receptor- β , and thus reduces the resistance to oxidative stress-induced cell death in male-derived neurons compared to female [76].

Several reports have looked into the direct effects of E2 on neuronal bioenergetics in specific areas of the brain. In a study evaluating the

effect of E2 in the control of the energy sensor 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) in the caudal dorsal vagal complex, Alenazi et al. [77] demonstrated that several genes are differentially expressed in the presence of E2, and that the products of these genes converge in pathways of AMPK activation that are similar to those used by AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide), a classical AMPK activator [77]. Another investigation into the effect of E2 in the caudal dorsal vagal complex by Tamrakar and Briski [78] showed that E2 induces an increase in the expression of key glycolytic, Krebs cycle, oxidative phosphorylation, and acetyl CoA – FAS pathway enzyme proteins in A2 metabolo-sensory neurons during recurring hypoglycemia [78]. In addition, the authors observed that E2 prevented the maladaptive decline in components of the mitochondrial electron transport chain during recurring hypoglycemia. Such protective actions of E2 on the many components of energy generation in these CV neurons could contribute to the energetic resilience to metabolic insult in females compared with males [78].

4.4. Phytoestrogen protection against oxidative damage in brain

In order to circumvent the potential carcinogenic effects of estrogen replacement, several research groups have begun to test the possible neuroprotective effects of phytoestrogens, such as genistein, a component of soy, on the premise that such plant-derived estrogens can protect against E2 decline without triggering harmful changes in reproductive target tissues [79]. Evsen et al. [79] in a study evaluating the effects of either estradiol or genistein on oxidative stress in the brains of ovariectomized rats demonstrated that treatment with either of the two estrogenic compounds significantly reduced oxidative stress levels compared to an untreated ovariectomized group. Moreover, the authors suggested that the reduction in oxidative stress resulted from an increase in both the total antioxidant status and in specific antioxidant enzymes, such as GPx, that are elevated in females treated with genistein [79]. In another investigation into neuroprotection by phytoestrogens, Canal Castro et al. [80] submitted OVX rats to global brain ischemia for ten minutes and evaluated the effects of estradiol or coumestrol on both cerebral antioxidant activity and cell death [80].

Coumestrol is a phytoestrogen present in soybean, brussels sprouts and spinach that exhibits a high affinity for both the ER- α and ER- β [81]. The data showed that both E2 and coumestrol protected the brain against damage following global ischemia, and that significant neuroprotection occurred regardless of whether the E2 or coumestrol was administered 1 h before ischemia or 3 or 6 h after blood flow was restored. The authors concluded that due to its induction of antioxidant activity through its activation of estrogen receptors [81], coumestrol might be beneficial as a dietary neuroprotective agent.

5. Control of CV function by brainstem neurons

5.1. Pathways of CV control

Parvocellular neurosecretory neurons located in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus constitute several distinct functional categories, including those that send their axons into the median eminence to release factors exerting control over pituitary hormone secretion, and those that are involved in the central autonomic network [82]. The latter type of parvocellular neuron can either send pre-sympathetic projections directly to sympathetic preganglionic nuclei in the medial-lateral column of the spinal cord or can take a less direct path to sympathetic control of the cardiovascular system by synapsing with vasomotor neurons in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) [83,84]. Significant experimental evidence suggests that the RVLM plays a crucial role in generating the sympathetic vasomotor tone that maintains resting blood pressure. Anatomical and electrophysiological data, moreover, indicate that the sympathetic vasomotor output tone of RVLM is mediated through direct bulb-spinal projections to the intermediate-lateral autonomic nucleus in the spinal cord [85–89].

The arterial baroreflex is a fundamental homeostatic mechanism that provides rapid negative feedback to diminish fluctuations in cardiovascular responses induced by environmental stimuli. As part of the baroreflex circuit, vasomotor sympathetic efferents of the RVLM are modulated by glutamatergic neurons located in the NTS [84,90]. These neurons then excite neurons in the caudal ventrolateral medulla (CVLM) [91,92]. In turn, GABAergic neurons from the CVLM inhibit the pre-sympathetic neurons in the RVLM that project to the sympathetic preganglionic neurons and offer the greatest vasomotor sympathetic tone unit [93–95]. Thus, driven by excitatory baroreceptor afferent nerves, the NTS normally provides a powerful tonic inhibitory influence on sympathetic vasomotor tone and blood pressure [93–95].

5.2. Effects of estrogen on brainstem neurons

Studies evaluating the effects of estrogens on the areas critical for maintaining sympathetic tone and blood pressure have shown that estrogen, acting both on gene transcription and through post-transcriptional mechanisms, controls the RVLM. Immunohistochemical and *in situ* hybridization techniques have shown that within RVLM neurons, ER is detectable as both an mRNA transcript [96] and as a protein [96–98], making this region a strong candidate for the transduction of estrogen binding into effects on cardiovascular homeostasis and disease. The importance of E2 in modulating the baroreceptor reflex was shown in studies performed in both male [99] and estrogen-supplemented OVX female rats [100], wherein a peripheral injection of E2 was observed to increase baroreceptor sensitivity, a condition leading to enhanced cardiovascular function. Those effects were diminished in both the male and female rats by a central injection of a selective antagonist of ER [99,100]. Wang and He [44] studied the effects of E2 on the electrical activity of RVLM neurons and showed that intracarotid injection of E2 decreased the firing rate of the RVLM neurons without changing blood pressure or heart rate [44]. However, pre-treatment with L-NAME, a nitric oxide (NO) synthase inhibitor significantly attenuated the inhibitory effect of E2 on RVLM firing rate, whereas the NO donor 3-morpholinosydnonimine - SIN-1 potentiated the effect.

These results suggest strongly that E2 effects in the RVLM involve NOS activation and NO release, and furthermore that the actions of E2 are mediated through a non-transcriptional signaling mechanism [44].

Shih [108] showed a particularly important role for the ER- β receptor in RVLM neurons in producing the cardioprotective effects of E2 described above. Specifically, the author showed that whereas both E2 and a selective ER- β -receptor agonist decrease systolic arterial pressure (SAP) and SAP-vasomotor spectrum components in a dose-dependent manner, an ER- α -receptor agonist has no effect [46]. Furthermore, the author showed that the cardiovascular effects of ER- β in the RVLM are dependent on iNOS stimulation and nitric oxide (NO) release [46]. Wu et al. [49], in addition showed that ER binding to ER- β in the RVLM evokes its pressor effects through non-genomic actions rather than genomic actions, specifically by activating the intracellular PI3K-Akt pathway [49].

In addition to its modulation of NO levels, E2 has been shown in several studies to affect cardiovascular function by regulating the transcription of specific voltage-gated potassium channels that control the transient outward potassium current (I_{to}) [101]. Saito et al. [101] had observed the transcriptional effect in ventricular cardiac cells, noting that Kv4.3 and Kv1.5 but not Kv4.2 were down-regulated by E2 treatment [101]. Lee et al. [102], on the other hand, showed that E2 significantly downregulates the expression of Kv4.2 mRNA, but not Kv4.3 in the RVLM neurons, to result in a down-regulation of I_{to} densities and hyperpolarization of these neurons [102]. Since ER receptors, particularly ER- β , are highly expressed in PVN- RVLM neurons [103], it seems likely that regulation of potassium channels in this area constitutes an important underlying mechanism for the beneficial effects of E2 on cardiovascular function.

Another suspected pathway for transducing E2 effects in the RVLM into a reduction in hypertension involves direct inhibitory effects of the hormone on ROS generation in RVLM neurons that would otherwise promote an increase in sympathetic activity and consequently induce a hypertensive state [104,105]. Wang et al. [45] in studies associating gender with the risk of cardiovascular disease, showed that the female RVLM expresses a greater number of angiotensin II receptors (AT1), but a lower level of p47 phox (the catalytic subunit of NADPH oxidase responsible for ROS formation) than the male RVLM, resulting in altered Ca^{2+} flux through L-type Ca^{2+} channels that could transduce the protective effects of E2 on blood pressure [45]. Pierce et al. [47] also studied the distribution of AT1 receptors and p47phox expression in pre-sympathetic neurons in the RVLM, and found that female neurons possessed a significantly greater concentration of membrane AT1 and a significantly lower expression of p47 phox in both the cell membrane and cytosol, and suggested that this distribution could underlie the gender-based differences observed in the production of ROS [47].

The literature cited above, supporting a cardioprotective role of estrogen mediated via decreased oxidative stress in the brain, however, must be considered in light of a number of contrary findings showing increased oxidative damage with estrogen in specific brain regions [48]. In a study of intact female rats (i.e., rats with normal serum E2), Subramanian et al. [48] showed that chronic treatment with low-dose E2 for 90 days resulted in increased systolic and blood pressure and heart rate accompanied by increased production of superoxide anion in the RVLM. The authors suggested that the contrasting results that they and others [106,107] had obtained compared to data supporting a cardioprotective action of E2 could be related to the chronic low dose (20 ng/day for 90 days) employed in their study, compared to the shorter-term higher dose E2 treatments (e.g. 1.5 mg/day) that showed a hypotensive effect of E2. Animals used in that study exhibited higher body weights and food and water intake in the E2-treated group that could play a role in the difference in mean arterial pressure the authors observe between E2-treated and control rats. It is worth noting that this study differs from most of the others as it was conducted in intact rats exhibiting normal serum E2 levels at the outset of the study, so that treatment with exogenous E2 resulted in only marginal (25–46%)

increases in serum E2 compared to the control animals [48]. Nonetheless, results such as those of Subramanian et al. suggest that careful consideration be given to dosing and timing of the therapeutic use of estrogens as cardiovascular protection, and also to specific receptors and signaling pathways that could separate beneficial neural effects of estrogens from the damaging ones.

5.3. Estrogen protection against nutritional damage to the brainstem

In light of our findings of significant metabolic and oxidative damage to cardiovascular control centers caused by nutritional deprivation, we have also investigated the possibility of long-lasting protective effects of estrogen against metabolic insult to brainstem neurons. Specifically, we compared the effects of higher and lower E2 levels (based on different levels of reproductive maturity) on measurements of oxidative stress in the brainstem of rats that had suffered nutritional deprivation during gestation and lactation. We showed that under-nutrition resulted in an elevation of oxidative stress biomarkers and reduction in enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in the rats with lower E2, compared to similarly nutrition-deficient rats during early development that now had higher E2 levels [36]. Moreover, we found that the total global oxy-score in the low E2 group indicated a striking level of oxidative damage in 22-day-old rats whose mothers had received a low-protein diet. In contrast, in the group with reproductive (i.e., high) levels of E2, we observed a decrease in oxidative stress biomarkers, increased enzymatic antioxidant activity, and a positive oxy-score when compared to control [36]. We concluded from these results that following a protein deficiency in the maternal diet during early development, estrogens present at reproductive age might confer resistance to the oxidative damage in the brainstem, which is very apparent in pre-pubertal rats.

6. Final considerations

Estrogen-linked 'protection' against a number of chronic degenerative diseases of high morbidity and mortality remains an important area of investigation. Numerous reports suggest that estrogens act as anti-oxidants that in turn sustain heart health, and hormone replacement therapy in post-menopausal women at one time was considered as a low-risk strategy for reducing heart disease. That optimistic view of the benefits of estrogen has now been tempered by more recent findings that recognize the increased risk that estrogen poses for other diseases.

Further research is crucial for separating the 'bad' effects of estrogen from the 'good' and this will require the elucidation of the specific pathways through which estrogen works, including which receptor subtypes are employed, which genes are activated or suppressed, and which proteins are involved in estrogen signal transduction. Such information may show that phytoestrogens can be used more effectively as therapeutics than estrogen itself.

To understand and refine a therapeutic role for estrogen in cardiovascular and neuro-protection, we will also need to focus upon the specific tissues, cells and organs that estrogen acts upon. In this review we have outlined the important concept that specific regions of the brain respond to estrogens with reductions in the oxidative stress that could damage the normal central autonomic control mechanisms maintaining cardiovascular and brain health. We hope that future studies along this line will lead ultimately to the use of estrogen against disease in a precise and entirely beneficial way.

References

- [1] E. Murphy, Estrogen signaling and cardiovascular disease, *Circ. Res.* 109 (6) (Sep 02 2011) 687–696 (PubMed PMID: 21885836. PMID: 3398381).
- [2] K.J. Ryan, Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology, *Cancer Res.* 42 (8 Suppl) (1982 Aug) 3342s–3344s (PubMed PMID: 7083198).
- [3] L.R. Nelson, S.E. Bulun, Estrogen production and action, *J. Am. Acad. Dermatol.* 45 (3 Suppl) (2001 Sep) S116–24 (PubMed PMID: 11511861).
- [4] R. Barakat, O. Oakley, H. Kim, J. Jin, C.J. Ko, Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function, *BMB Rep.* 49 (9) (2016 Sep) 488–496 (PubMed PMID: 27530684. PMID: 5227141).
- [5] A.H. Friedlander, L.J. Jones, The biology, medical management, and podiatric implications of menopause, *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* 92 (8) (2002 Sep) 437–443 (PubMed PMID: 12237264).
- [6] B.L. Mealey, A.J. Moritz, Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium, *Periodontol.* 32 (2003) 59–81 (PubMed PMID: 12756034).
- [7] M.E. Mendelsohn, R.H. Karas, The protective effects of estrogen on the cardiovascular system, *N. Engl. J. Med.* 340 (23) (1999 Jun 10) 1801–1811 (PubMed PMID: 10362825).
- [8] T. Simoncini, A. Hafezi-Moghadam, D.P. Brazil, K. Ley, W.W. Chin, J.K. Liao, Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase, *Nature* 407 (6803) (2000 Sep 28) 538–541 (PubMed PMID: 11029009. PMID: 2670482).
- [9] E.J. Filardo, P. Thomas, GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release, *Trends Endocrinol. Metab.* 16 (8) (2005 Oct) 362–367 (PubMed PMID: 16125968).
- [10] C.M. Revankar, D.F. Cimino, L.A. Sklar, J.B. Arterburn, E.R.A. Prossnitz, transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling, *Science* 307 (5715) (2005 Mar 11) 1625–1630 (PubMed PMID: 15705806).
- [11] S.W. Mifflin, Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius, *Am. J. Phys.* 263 (2 Pt 2) (1992 Aug) R368–75 (PubMed PMID: 1510176).
- [12] J. Ciriello, C.G. Schultz, S. Roder, Collateral axonal projections from ventrolateral medullary non-catecholaminergic neurons to central nucleus of the amygdala, *Brain Res.* 663 (2) (1994 Nov 14) 346–351 (PubMed PMID: 7874522).
- [13] B.H. Machado, H. Mauad, D.A. Chianca Junior, A.S. Haibara, E. Colombari, Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarius, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30 (4) (1997 Apr) 533–543 (PubMed PMID: 9251775. Epub 1997/04/01. eng).
- [14] E. Colombari, J.V. Menani, W.T. Talman, Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats, *Am. J. Phys.* 270 (6 Pt 2) (1996 Jun) R1220–5 (PubMed PMID: 8764286. Epub 1996/06/01. eng).
- [15] S.H. Chan, Wu KL, A.Y. Chang, M.H. Tai, J.Y. Chan, Oxidative impairment of mitochondrial electron transport chain complexes in rostral ventrolateral medulla contributes to neurogenic hypertension, *Hypertension* 53 (2) (2009 Feb) 217–227 (PubMed PMID: 19114648).
- [16] S.H. Chan, J.Y. Chan, Brain stem NOS and ROS in neural mechanisms of hypertension, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (1) (2014 Jan 01) 146–163 (PubMed PMID: 23418728).
- [17] N. Kaluderovic, S. Deshwal, F. Di Lisa, Reactive oxygen species and redox compartmentalization, *Front. Physiol.* 5 (285) (2014) (PubMed PMID: 25161621. PMID: 4130307).
- [18] S. Rubattu, F. Bianchi, C.L. Busceti, M. Cotugno, R. Stanzione, S. Marchitti, et al., Differential modulation of AMPK/PPARalpha/UCP2 axis in relation to hypertension and aging in the brain, kidneys and heart of two closely related spontaneously hypertensive rat strains, *Oncotarget* 6 (22) (2015 Aug 07) 18800–18818 (PubMed PMID: 26023797. PMID: 4662457).
- [19] D.J. Ferreira, D.F. Sellitti, C.J. Lagranha, 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.* 7 (5) (2016 Oct) 513–524 (PubMed PMID: 27270104).
- [20] J.L. de Brito Alves, V.O. Nogueira, G.B. de Oliveira, G.S. da Silva, A.G. Wanderley, C.G. Leandro, et al., 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 (4) (2014 Feb) 606–615 (PubMed PMID: 24059468).
- [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) (2015 Jan) 123–130 (PubMed PMID: 25287449).
- [22] D.S. Ferreira, Y. Liu, M.P. Fernandes, C.J. Lagranha, Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring, *Nutr. Neurosci.* 19 (8) (2016 Oct) 369–375 (PubMed PMID: 26635485).
- [23] A. Coats, S. Jain, Protective effects of nifedipine on oxidative stress to prevent hypertension-related target organ damage, *J. Hum. Hypertens.* 31 (6) (2017 Jun) 376–381 (PubMed PMID: 28252041. PMID: 5418557).
- [24] E. Murphy, C. Steenbergen, Cardioprotection in females: a role for nitric oxide and altered gene expression, *Heart Fail. Rev.* 12 (3–4) (2007 Dec) 293–300 (PubMed PMID: 17508281).
- [25] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4, editor. United Kingdom: Oxford UK (2007) 888 p.
- [26] A. Meister, M.E. Anderson, Glutathione, *Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 711–760 (PubMed PMID: 6137189. Epub 1983/01/01. eng).
- [27] J.W. Mink, R.J. Blumenshine, D.B. Adams, Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis, *Am. J. Phys.* 241 (3) (1981 Sep) R203–12 (PubMed PMID: 7282965).
- [28] J.R. Connor, S.A. Benkovic, Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical, and molecular considerations, *Ann. Neurol.* 32 (Suppl) (1992) S51–61 (PubMed PMID: 1510381).
- [29] E. Mills, X.P. Dong, F. Wang, H. Xu, Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders, *Future Med. Chem.* 2 (1) (2010 Jan) 51–64 (PubMed PMID: 20161623. PMID: 2812924).
- [30] S. Gal, H. Zheng, M. Fridkin, M.B. Youdim, Novel multifunctional neuroprotective

- iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. In vivo selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of MPTP-induced striatal dopamine depletion, *J. Neurochem.* 95 (1) (2005 Oct) 79–88 (PubMed PMID: 16181414).
- [31] H. Zheng, S. Gal, L.M. Weiner, O. Bar-Am, A. Warshawsky, M. Fridkin, et al., Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases: in vitro studies on antioxidant activity, prevention of lipid peroxide formation and monoamine oxidase inhibition, *J. Neurochem.* 95 (1) (2005 Oct) 68–78 (PubMed PMID: 16181413).
- [32] S.H. Chan, M.H. Tai, C.Y. Li, J.Y. Chan, Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats, *Free Radic. Biol. Med.* 40 (11) (2006 Jun 01) 2028–2039 (PubMed PMID: 16716903).
- [33] K.D. Bruce, M.A. Hanson, The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome, *J. Nutr.* 140 (3) (2010 Mar) 648–652 (PubMed PMID: 20107145).
- [34] G.R.F. Braz, A.S. Emiliano, S.M. Sousa, A.A.S. Pedroza, D.F. Santana, M.P. Fernandes, et al., Maternal low-protein diet in female rat heart: possible protective effect of estradiol, *J. Dev. Orig. Health Dis.* 8 (3) (2017 Jun) 322–330 (PubMed PMID: 28264755).
- [35] J.L. de Brito Alves, J.M. de Oliveira, D.J. Ferreira, M.A. de Barros, V.O. Nogueira, D.S. Alves, et al., Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 43 (12) (2016 Dec) 1177–1184 (PubMed PMID: 27612187).
- [36] S.M. de Sousa, G.R.F. Braz, C.M. Freitas, D.F. de Santana, D.F. Sellitti, M.P. Fernandes, et al., Oxidative injuries induced by maternal low-protein diet in female brainstem, *Nutr. Neurosci.* (2017 May 11) 1–9 (PubMed PMID: 28494696).
- [37] D.J. Ferreira, A.A. da Silva Pedroza, G.R. Braz, da Silva-Filho, Lima T.A. RC, M.P. Fernandes, et al., Mitochondrial bioenergetics and oxidative status disruption in brainstem of weaned rats: immediate response to maternal protein restriction, *Brain Res.* 1642 (5) (2016 Jul 1) 553–561 (PubMed PMID: 27109594).
- [38] 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) (2014 Aug) 880–887 (PubMed PMID: 24905448).
- [39] R.F. Mendes-da-Silva, D.J.S. Ferreira, A.A.C. Lopes-de-Morais, P.F.C. de Macedo, C.J. Lagranha, Batista-de-Oliveira-Hornisby M. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil during pregnancy and lactation influences brain excitability and cortex oxidative status in the rat offspring, *Nutr. Neurosci.* (2017 Apr 07) 1–8 (PubMed PMID: 28784045).
- [40] P.F.C. Macedo, J.S.V. de Melo, L.A.R. Costa, G.R.F. Braz, S.M. de Sousa, C.J. Lagranha, et al., Fish oil and treadmill exercise have age-dependent effects on episodic memory and oxidative state of the hippocampus, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 42 (5) (2017 May) 503–510 (PubMed PMID: 28177723).
- [41] 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 (PubMed PMID: 22969716. Epub 2012/09/13. eng).
- [42] R.L. Augusto, A.R. Isaac, J. Silva II, D.F. Santana, D.J. Ferreira, C.J. Lagranha, et al., Fighting oxidative stress: increased resistance of male rat cerebellum at weaning induced by low omega 6/omega 3 ratio in a protein-deficient diet, *Cerebellum* 22 (2016 Mar) (PubMed PMID: 27003678).
- [43] E.B. Engler-Chiurazzi, M. Singh, J.W. Simpkins, From the 90's to now: A brief historical perspective on more than two decades of estrogen neuroprotection, *Brain Res.* 1633 (2016 Feb 15) 96–100 (PubMed PMID: 26740397. PMID: 4762740).
- [44] S. Wang, R.R. He, Effects of intracarotid injection of 17beta-estradiol on electrical activity of rostral ventrolateral medullary neurons in male rats, *Sheng Li Xue Bao* 54 (1) (2002 Feb 25) 47–54 (PubMed PMID: 11930241).
- [45] G. Wang, T.A. Milner, R.C. Speth, A.C. Gore, D. Wu, C. Iadecola, et al., Sex differences in angiotensin signaling in bulbospinal neurons in the rat rostral ventrolateral medulla, *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 295 (4) (2008 Oct) R1149–57 (PubMed PMID: 18685065. PMID: 2576084).
- [46] C.D. Shih, Activation of estrogen receptor beta-dependent nitric oxide signaling mediates the hypotensive effects of estrogen in the rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats, *J. Biomed. Sci.* 16 (60) (2009 Jul 07) (PubMed PMID: 19583861. PMID: 2717931).
- [47] J.P. Pierce, J. Kievits, B. Graustein, R.C. Speth, C. Iadecola, T.A. Milner, Sex differences in the subcellular distribution of angiotensin type 1 receptors and NADPH oxidase subunits in the dendrites of CI neurons in the rat rostral ventrolateral medulla, *Neuroscience* 163 (1) (2009 Sep 29) 329–338 (PubMed PMID: 19501631. PMID: 2740659).
- [48] M. Subramanian, P. Balasubramanian, H. Garver, C. Northcott, H. Zhao, J.R. Haywood, et al., Chronic estradiol/17beta exposure increases superoxide production in the rostral ventrolateral medulla and causes hypertension: reversal by resveratrol, *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 300 (6) (2011 Jun) R1560–8 (PubMed PMID: 21411770. PMID: 3119149).
- [49] K.L. Wu, C.H. Chen, C.D. Shih, Nontranscriptional activation of PI3K/Akt signaling mediates the hypotensive effect following activation of estrogen receptor beta in the rostral ventrolateral medulla of rats, *J. Biomed. Sci.* 19 (1) (2012 Aug 16) 76 (PubMed PMID: 22897791. PMID: 3438069).
- [50] E.B. Engler-Chiurazzi, C.M. Brown, J.M. Povornzik, J.W. Simpkins, Estrogens as neuroprotectants: Estrogenic actions in the context of cognitive aging and brain injury, *Prog. Neurobiol.* 157 (2017 Oct) 188–211 (PubMed PMID: 26891883. PMID: 4985492).
- [51] C.J. Pike, Sex and the development of Alzheimer's disease, *J. Neurosci. Res.* 95 (1–2) (2017 Jan 02) 671–680 (PubMed PMID: 27870425. PMID: 5120614).
- [52] B. Imtiaz, M. Tuppurainen, T. Rikonen, M. Kivipelto, H. Soininen, H. Kroger, et al., Postmenopausal hormone therapy and Alzheimer disease: A prospective cohort study, *Neurology* 88 (11) (2017 Mar 14) 1062–1068 (PubMed PMID: 28202700. PMID: 5384835).
- [53] G.E. Gillies, S. McArthur, Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines, *Pharmacol. Rev.* 62 (2) (2010 Jun) 155–198 (PubMed PMID: 20392807. PMID: 2879914).
- [54] J.D. Yager, N.E. Davidson, Estrogen carcinogenesis in breast cancer, *N. Engl. J. Med.* 354 (3) (2006 Jan 19) 270–282 (PubMed PMID: 16421368).
- [55] J.F. Keane Jr., C.G. Solomon, Postmenopausal hormone therapy and atherosclerosis—time is of the essence, *N. Engl. J. Med.* 374 (13) (2016 Mar 31) 1279–1280 (PubMed PMID: 27028919).
- [56] O.M. Reslan, R.A. Khalil, Vascular effects of estrogenic menopausal hormone therapy, *Rev. Recent Clin. Trials* 7 (1) (2012 Feb) 47–70 (PubMed PMID: 21864249. PMID: 3227781).
- [57] G.M. Rosano, C. Vitale, M. Fini, Hormone replacement therapy and cardioprotection: what is good and what is bad for the cardiovascular system? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1092 (2006 Dec) 341–348 (PubMed PMID: 17308159).
- [58] C.E. Roselli, I.E. Horton, J.A. Resko, Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system, *Endocrinology* 117 (6) (1985 Dec) 2471–2477 (PubMed PMID: 4065042).
- [59] J.G. Yague, A.C. Wang, W.G. Janssen, P.R. Hof, L.M. Garcia-Segura, I. Azcoitia, et al., Aromatase distribution in the monkey temporal neocortex and hippocampus, *Brain Res.* 1209 (2008 May 13) 115–127 (PubMed PMID: 18402929. PMID: 2423000).
- [60] R.A. Lobo, Hormone-replacement therapy: current thinking, *Nat. Rev. Endocrinol.* 13 (4) (2017 Apr) 220–231 (PubMed PMID: 27716751).
- [61] M.C. Kander, Y. Cui, Z. Liu, Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases, *J. Cell. Mol. Med.* 21 (5) (2017 May) 1024–1032 (PubMed PMID: 27957792. PMID: 5387169).
- [62] C. Angeloni, G. Teti, M.C. Barbalace, M. Malaguti, M. Falconi, S. Hrelia, 17beta-Estradiol enhances sulforaphane cardioprotection against oxidative stress, *J. Nutr. Biochem.* 42 (2017 Apr) 26–36 (PubMed PMID: 28110122).
- [63] B.S. McEwen, T.A. Milner, Understanding the broad influence of sex hormones and sex differences in the brain, *J. Neurosci. Res.* 95 (1–2) (2017 Jan 02) 24–39 (PubMed PMID: 27870427. PMID: 5120618).
- [64] E.M. De Francesco, C. Rocca, F. Scavellio, D. Amelio, T. Pasqua, D.C. Rigracciolo, et al., Protective role of GPER agonist G-1 on cardiotoxicity induced by doxorubicin, *J. Cell. Physiol.* 232 (7) (2017 Jul) 1640–1649 (PubMed PMID: 27607345).
- [65] F. Bellanti, M. Matteo, T. Rollo, F. De Rosario, P. Greco, G. Vendemiale, et al., Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy, *Redox Biol.* 1 (2013) 340–346 (PubMed PMID: 24024169. PMID: 3757703).
- [66] Y. Baba, S. Ishikawa, Y. Amagi, K. Kayaba, T. Gotoh, E. Kajii, Premature menopause is associated with increased risk of cerebral infarction in Japanese women, *Menopause* 17 (3) (2010 May-Jun) 506–510 (PubMed PMID: 20042893).
- [67] E. De Martinis, E. Azaiz-Fonseca, M.A. Arevalo, P. Asceri, M. Fiochetti, M. Marino, et al., 17beta-Estradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor beta-mediated neuroglobin up-regulation, *J. Neuroendocrinol.* 25 (3) (2013 Mar) 260–270 (PubMed PMID: 23190172).
- [68] G. Patki, F.H. Allam, F. Atrooz, A.T. Dao, N. Solanki, G. Chugh, et al., Grape powder intake prevents ovariectomy-induced anxiety-like behavior, memory impairment and high blood pressure in female Wistar rats, *PLoS One* 8 (9) (2013) e74522 (PubMed PMID: 24040270. PMID: 3767647).
- [69] C. Bernal-Mondragon, S. Rivas-Arancibia, K.M. Kendrick, R. Guevara-Guzman, Estradiol prevents olfactory dysfunction induced by A-beta 25–35 injection in hippocampus, *BMC Neurosci.* 14 (2013 Sep 24) 104 (PubMed PMID: 24059981. PMID: 3849069).
- [70] A.K. Rao, A.K. Dietrich, Y.S. Ziegler, A.M. Nardulli, 17beta-Estradiol-mediated increase in Cu/Zn superoxide dismutase expression in the brain: a mechanism to protect neurons from ischemia, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127 (3–5) (2011 Nov) 382–389 (PubMed PMID: 21704159. PMID: 3901640).
- [71] R. Sandhir, N. Sethi, A. Aggarwal, A. Khara, Coenzyme Q10 treatment ameliorates cognitive deficits by modulating mitochondrial functions in surgically induced menopause, *Neurochem. Int.* 74 (2014 Jul) 16–23 (PubMed PMID: 24780430. Epub 2014/05/02. eng).
- [72] M. Pourganji, M. Hosseini, M. Soukhtanloo, H. Zabih, M.A. Hadjzadeh, Protective role of endogenous ovarian hormones against learning and memory impairments and brain tissues oxidative damage induced by lipopolysaccharide, *Iran Red Crescent Med J* 16 (3) (2014 Mar) e13954 (PubMed PMID: 24829769. PMID: 4005431).
- [73] G. Harish, C. Venkateshappa, A. Mahadevan, N. Pruthi, M.M. Srinivas Bharath, S.K. Shankar, Glutathione metabolism is modulated by postmortem interval, gender difference and agonal state in postmortem human brains, *Neurochem. Int.* 59 (7) (2011 Dec) 1029–1042 (PubMed PMID: 21945455. Epub 2011/09/29. eng).
- [74] D.B. Martins, C.M. Mazzanti, R.T. Franca, M. Pagnoncelli, M.M. Costa, E.M. de Souza, et al., 17-beta estradiol in the acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and blood of ovariectomized adult and middle-aged rats, *Life Sci.* 90 (9–10) (2012 Feb 27) 351–359 (PubMed PMID: 22227472).
- [75] M. Misiak, C. Beyer, S. Arnold, Gender-specific role of mitochondria in the vulnerability of 6-hydroxydopamine-treated mesencephalic neurons, *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (6–7) (2010 Jun-Jul) 1178–1188 (PubMed PMID: 20416276).
- [76] Q. Tao, X. Fan, T. Li, Y. Tang, D. Yang, W. Le, Gender segregation in gene

- expression and vulnerability to oxidative stress induced injury in ventral mesencephalic cultures of dopamine neurons, *J. Neurosci. Res.* 90 (1) (2012 Jan) 167–178 (PubMed PMID: 21919034).
- [77] F.S. Alenazi, B.A. Ibrahim, K.P. Briski, Estradiol regulates dorsal vagal complex signal transduction pathway transcriptional reactivity to the AMPK activator 5-Aminoisimidazole-4-Carboxamide-Riboside (AICAR), *J. Mol. Neurosci.* 56 (4) (2015 Aug) 907–916 (PubMed PMID: 25796381).
- [78] P. Tamrakar, K.P. Briski, Impact of recurrent hypoglycemic stress on hindbrain A2 nerve cell energy metabolism and catecholamine biosynthesis: modulation by estradiol, *Acta Neurobiol. Exp.* 77 (1) (2017) 31–44 (PubMed PMID: 28379214).
- [79] M.S. Evsen, A. Ozler, C. Gocmez, S. Varol, S.Y. Tunc, E. Akil, et al., Effects of estrogen, estrogen/progesterone combination and genistein treatments on oxidant/antioxidant status in the brain of ovariectomized rats, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 17 (14) (2013 Jul) 1869–1873 (PubMed PMID: 23877849).
- [80] C. Canal Castro, A.S. Pagnussat, L. Orlandi, P. Worm, N. Moura, A.M. Eigen, et al., Coumestrol has neuroprotective effects before and after global cerebral ischemia in female rats, *Brain Res.* 1474 (2012 Sep 20) 82–90 (PubMed PMID: 22824334).
- [81] C.C. Castro, A.S. Pagnussat, N. Moura, M.J. da Cunha, F.R. Machado, A.T. Wyse, et al., Coumestrol treatment prevents Na⁺, K⁺ – ATPase inhibition and affords histological neuroprotection to male rats receiving cerebral global ischemia, *Neurol. Res.* 36 (3) (2014 Mar) 198–206 (PubMed PMID: 24512013).
- [82] L.W. Swanson, H.G. Kuypers, The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods, *J. Comp. Neurol.* 194 (3) (1980 Dec 01) 555–570 (PubMed PMID: 7451682).
- [83] S. Pyner, J.H. Coote, Identification of branching paraventricular neurons of the hypothalamus that project to the rostromedial medulla and spinal cord, *Neuroscience* 100 (3) (2000) 549–556 (PubMed PMID: 11098118).
- [84] R.A. Dampney, Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system, *Physiol. Rev.* 74 (2) (1994 Apr) 323–364 (PubMed PMID: 8171117).
- [85] A.R. Granata, D.A. Ruggiero, D.H. Park, T.H. Joh, D.J. Reis, Brain stem area with C1 epinephrine neurons mediates baroreflex vasodepressor responses, *Am. J. Phys.* 268 (4 Pt 2) (1985 Apr) H547–67 (PubMed PMID: 3985177).
- [86] J. Ciriello, M.M. Caverson, C. Polosa, Function of the ventrolateral medulla in the control of the circulation, *Brain Res.* 396 (4) (1986 Dec) 359–391 (PubMed PMID: 3542115).
- [87] J.B. Minson, J.P. Chalmers, A.C. Caon, B. Renaud, Separate areas of rat medulla oblongata with populations of serotonin- and adrenaline-containing neurons alter blood pressure after L-glutamate stimulation, *J. Auton. Nerv. Syst.* 19 (1) (1987 Apr) 39–50 (PubMed PMID: 2885359).
- [88] S.F. Morrison, J. Callaway, T.A. Miller, D.J. Reis, Glutamate in the spinal sympathetic intermediolateral nucleus: localization by light and electron microscopy, *Brain Res.* 503 (1) (1989 Nov 27) 5–15 (PubMed PMID: 2575434).
- [89] A.M. Allen, J.M. Adams, P.G. Guyenet, Role of the spinal cord in generating the 2- to 6-Hz rhythm in rat sympathetic outflow, *Am. J. Phys.* 264 (5 Pt 2) (1993 May) R938–45 (PubMed PMID: 8498604).
- [90] K.M. Spyer, Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control, *J. Physiol.* 474 (1) (1994 Jan 01) 1–19 (PubMed PMID: 8014887, PMID: 1160290).
- [91] P.G. Guyenet, T.M. Filtz, S.R. Donaldson, Role of excitatory amino acids in rat vagal and sympathetic baroreflexes, *Brain Res.* 407 (2) (Mar 31 1987) 272–284 (PubMed PMID: 3567646).
- [92] F.J. Gordon, Aortic baroreceptor reflexes are mediated by NMDA receptors in caudal ventrolateral medulla, *Am. J. Phys.* 252 (3 Pt 2) (1987 Mar) R628–33 (PubMed PMID: 2881491).
- [93] A.D. Loewy, K.M. Spyer, Central Regulation of Autonomic Functions, xii Oxford University Press, New York; Oxford, 1990 (390 p).
- [94] W.W. Blessing, The Lower Brainstem and Bodily Homeostasis, xiv Oxford University Press, New York; Oxford, 1997 (575 p).
- [95] A.M. Schreihöfer, R.L. Stornetta, P.G. Guyenet, Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rat, *J. Physiol.* 529 (Pt 1) (2000 Nov 15) 221–236 (PubMed PMID: 11080264, PMID: 2270165).
- [96] P.J. Shughrue, M.V. Lane, I. Merchenthaler, Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system, *J. Comp. Neurol.* 388 (4) (1997 Dec 01) 507–525 (PubMed PMID: 9388012).
- [97] P.J. Shughrue, I. Merchenthaler, Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system, *J. Comp. Neurol.* 436 (1) (2001 Jul 16) 64–81 (PubMed PMID: 11413547).
- [98] G. Wang, C.T. Drake, M. Rozenblit, P. Zhou, S.E. Alves, S.P. Herrick, et al., Evidence that estrogen directly and indirectly modulates C1 adrenergic bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla, *Brain Res.* 1094 (1) (2006 Jun 13) 163–178 (PubMed PMID: 16696957).
- [99] T.M. Saleh, B.J. Connell, Centrally mediated effect of 17 β -estradiol on parasympathetic tone in male rats, *Am. J. Phys.* 276 (2 Pt 2) (1999 Feb) R474–81 (PubMed PMID: 9950927).
- [100] T.M. Saleh, B.J. Connell, 17 β -estradiol modulates baroreflex sensitivity and autonomic tone of female rats, *J. Auton. Nerv. Syst.* 80 (3) (2000 May 12) 148–161 (PubMed PMID: 10785281).
- [101] T. Saito, A. Ciobotaru, J.C. Bopassa, L. Toro, E. Stefani, M. Eghbali, Estrogen contributes to gender differences in mouse ventricular repolarization, *Circ. Res.* 105 (4) (2009 Aug 14) 343–352 (PubMed PMID: 19608983, PMID: 2921935).
- [102] S.K. Lee, P.D. Ryu, S.Y. Lee, Estrogen replacement modulates voltage-gated potassium channels in rat presympathetic paraventricular nucleus neurons, *BMC Neurosci.* 14 (2013 Nov 04) 134 (PubMed PMID: 24180323, PMID: 3840734).
- [103] J.E. Stern, W. Zhang, Preautonomic neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus contain estrogen receptor beta, *Brain Res.* 975 (1–2) (2003 Jun 13) 99–109 (PubMed PMID: 12763597).
- [104] T. Kishi, Y. Hirooka, Y. Kimura, K. Ito, H. Shimokawa, A. Takeshita, Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Circulation* 109 (19) (2004 May 18) 2357–2362 (PubMed PMID: 15117836).
- [105] E.B. Oliveira-Sales, A.P. Dugaich, B.A. Carrillo, N.P. Abreu, M.A. Boim, P.J. Martins, et al., Oxidative stress contributes to renovascular hypertension, *Am. J. Hypertens.* 21 (1) (2008 Jan) 98–104 (PubMed PMID: 18091731).
- [106] K.B. Brosnihan, P. Li, D. Ganten, C.M. Ferrario, Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS, *Am. J. Phys.* 273 (6 Pt 2) (1997 Dec) R1908–15 (PubMed PMID: 9435644).
- [107] J. Gimenez, M.P. Garcia, M. Serna, B. Bonacasa, L.F. Carbonell, T. Quesada, et al., 17 β -estradiol enhances the acute hypotensive effect of captopril in female ovariectomized spontaneously hypertensive rats, *Exp. Physiol.* 91 (4) (2006 Jul) 715–722 (PubMed PMID: 16627572).
- [108] C.D. Shih, Activation of estrogen receptor beta-dependent nitric oxide signaling mediates the hypotensive effects of estrogen in the rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats, *J. Biomed. Sci.* 16 (2009 Jul 07) 60 (PubMed PMID: 19583861, PMID: 2717931).

**ANEXO A- CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO ORIGINAL ENVIADO PARA
EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE (QUALIS A2)**


European Journal of Neuroscience

[Home](#)

[Author](#)

[Review](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

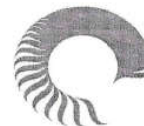
Thank you for your submission

Submitted to	European Journal of Neuroscience
Manuscript ID	EJN-2017-12-25153
Title	Serotonin transporter inhibition during neonatal period induces sex-dependent effects on mitochondrial bioenergetics in the rat brainstem
Authors	Silva, Tercya Lucidi Braz, Glauber Silva, Severina Cassia Pedroza, Anderson Apolonio Freitas, Cristiane da Silva, Aline Isabel Lagranha, Claudia
Date Submitted	04-Dec-2017

Author Dashboard

ANEXO B- OFÍCIO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UFPE / 2012

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 Jansen
Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver