



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO

RAFAEL DANYLLO DA SILVA MIGUEL

**EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE A MEMÓRIA E O SISTEMA
SEROTONINÉRGICO EM RATOS**

Recife

2021

RAFAEL DANYLLO DA SILVA MIGUEL

**EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE A MEMÓRIA E O SISTEMA
SEROTONINÉRGICO EM RATOS**

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

Área de Concentração: Neurociências

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

Co-orientadoras: Prof^a Lisiane dos Santos Oliveira e
Prof^a Dr^a Bruna Del Vechio Koike

Recife

2021

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M636e Miguel, Rafael Danylo da Silva.
Efeitos do desmame precoce sobre a memória e o sistema serotoninérgico em ratos / Rafael Danylo da Silva Miguel. – 2021.
87 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Sandra Lopes de Souza.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2021.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Hipocampo. 2. Serotonina. 3. Memória. I. Souza, Sandra Lopes de (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2021-088)

RAFAEL DANYLLO DA SILVA MIGUEL

**EFEITOS DO DESMAME PRECOCE SOBRE A MEMÓRIA E O SISTEMA
SEROTONINÉRGICO EM RATOS**

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

Aprovado em: 29/01/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Belmira Lara Andrade da Costa (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr^o Marcelo Moraes Valença (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o Dr^o Filipe Silveira Duarte (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a Julliet Araujo de Souza (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Prof^a Dr^a Lisiane dos Santos Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

À Rosa Maria Nunes da Silva, eterna tia e mãe!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, pois ele é o principal responsável por tudo aquilo que acontece em nossas vidas e direciona nossas escolhas.

Além dele há uma série de outras pessoas que me deram os braços para que esta pesquisa pudesse ser realizada, e a estas pessoas necessito agradecer de forma individual.

Agradeço a minha família, nas figuras da minha mãe (Maria das Graças da Silva Miguel), à minha irmã (Rafaela Thamires), minhas avós (Severina Maria e Maria de Mello [*in memoriam*]), por todo o apoio necessário para que eu pudesse avançar nos estudos e na pesquisa. Agradeço ainda a José Emerson Xavier, pela companhia, ajuda, incentivo e apoio em todas as fases da pesquisa e vida pessoal, antes mesmo deste projeto ser de fato idealizado e iniciado.

Preciso agradecer imensamente a Sandra Lopes de Souza por ter aceitado embarcar como minha orientadora neste estudo, me auxiliando e direcionando sobre o que, quando e como fazer. Seu apoio foi fundamental! Agradeço também as minhas coorientadoras Lisiane dos Santos Oliveira, que me acompanhou ao longo de toda minha carreira acadêmica, desde a graduação até o momento atual, sendo para mim uma das grandes referências como profissional e como pessoa; e Bruna Del Vechio Koike, pela ajuda na elaboração do projeto e da tese, bem como orientação sobre como transformar as ideias em textos concisos. Essas três mulheres são os pilares de sustentação de todas as etapas deste estudo, a elas minha eterna gratidão!

Agradeço também a amizade de Rosana Ximenes, que desde a graduação me auxiliou nos meus projetos acadêmicos e pessoais tal como um membro de minha família. A você, meu muito obrigado!

Por todo apoio técnico-científico durante a execução deste estudo, agradeço à Gabriel Tavares, Rudá Feitoza, Claudia Lagranha, Matilde Cesiana, Isabella Costa, Lavínia Calmon, Gilmar Nobre e Ângelo Roseno. Todo apoio de vocês, desde a ajuda com o manejo dos animais até as análises moleculares, me auxiliou a concluir esta pesquisa com êxito dentro do tempo previsto.

Agradeço ainda a banca de qualificação desta tese (Julliet, Matilde e Rosana) pelas contribuições que lapidaram a escrita e os métodos utilizados aqui.

Por fim, agradeço *in memoriam* de tia Rosa, minha tia-mãe que desde criança sempre dizia que eu seria “seu doutor”. A conclusão desta tese, portanto, já havia sido profetizada por ela décadas antes de eu sequer ingressar no ensino superior, e por isso a ela dedico este trabalho.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O desmame precoce (DP) é uma das agressões perinatais capazes de promover alterações neurocomportamentais que perduram ao longo de toda a vida. Este estudo teve por objetivo investigar as repercussões que o DP promove em testes de memória para localização (LO) e reconhecimento de objetos (RNO), na memória aversiva (MA), comportamento semelhante à depressão e na expressão de RNAm para os receptores 5-HT1A, 5-HT1B e 5-HT2A no hipocampo. Para isto, foram utilizados ratos *Wistar* de ambos os sexos que compuseram o grupo DP de machos (DPM, n= 20) e fêmeas (DPF, n=18), onde o desmame ocorreu no 15º dia de vida; e o grupo controle de machos (CM, n=18) e fêmeas (CF, n=16), desmamados no 30º dia. Os testes utilizados foram o teste de localização de objetos (TLO) seguido do teste de reconhecimento de objetos (TRNO), este último com ou sem uso de fluoxetina (i.p. 10mg/kg). Em seguida, foram realizados o labirinto em cruz modificado (TLCM) e o teste de suspensão pela cauda (TSC). Por fim, os animais foram eutanasiados pelo uso da guilhotina e seus hipocampos dissecados para análise por PCR em tempo real. Na memória de curta duração, o DPM obteve índices de localização de objetos (ILO) menores ($23,23 \pm 30,52$) que o CM ($50,85 \pm 13,89$; $p=0,041$), e menor entre DPF ($24,18 \pm 5,84$) e CF ($51,2 \pm 16,35$; $p=0,017$). Já para a memória de longa duração, o ILO foi menor em DPM ($0,94 \pm 6,18$) que em CM ($37,42 \pm 25,79$; $p=0,004$) e menor em DPF ($24,18 \pm 5,84$) comparado com CF ($51,27 \pm 16,35$). No TRNO de longa duração, DPM apresentaram Índice de Discriminação do Novo Objeto (IDNO) menores ($-5,11 \pm 6,16$) que os CM ($21,85 \pm 11,68$), e não diferiu entre DPF ($27,42 \pm 25,91$) e CF ($24,49 \pm 15,31$). Após a manipulação farmacológica, os DPM-fluoxetina apresentaram maiores ($54,96 \pm 9,5$) IDNO do que os DPM-salina ($36,28 \pm 8,29$). Além disso, não se observou diferença entre CM-salina ($59,62 \pm 5,03$) e CM-fluoxetina ($61,60 \pm 12,08$); e nem entre este último grupo e o DPM-fluoxetina. Não se observou diferenças entre as CF-fluoxetina ($9,41 \pm 4,99$) e CF-salina ($11,75 \pm 7,06$); nem entre DPF-fluoxetina ($9,28 \pm 3,82$) com DPF-salina ($19,52 \pm 8,49$). No TLCM, não se observou diferenças entre os grupos experimentais avaliados. Adicionalmente, DPM apresentaram maior tempo de imobilidade no TSC ($75,22 \pm 49,16$) que os CM ($20 \pm 19,46$; $p=0,026$); não apresentando diferenças entre os grupos DPF e CF. As análises moleculares apontaram que os DPM possuíam maior expressão para os receptores 5-HT1A e 5-HT1B e redução de 5-HT2A quando comparado com o grupo CM. Já nas fêmeas, houve aumento dos receptores 5-HT1A e 5-HT1B e não modificou os 5-HT2A no grupo DPF comparado com CF. Esses resultados apontam que o desmame precoce afeta diferentemente a

memória e a expressão dos receptores 5-HT1A, 5-HT1B e 5-HT2A no hipocampo de machos e fêmeas.

Palavras-Chave: Hipocampo. Serotonina. Memória.

ABSTRACT

Early weaning (EW) is one of the perinatal aggressions capable of promoting neurobehavioral changes that last throughout life. This study aimed to investigate the repercussions that EW promotes in memory tests for localization (OL) and object recognition (OR), in aversive memory (AM), depression-like behavior and in mRNA expression. For 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT2A receptors in the hippocampus. For this, we used *Wistar* rats of both sexes that composed the EW group of males (MEW, n=20) and females (FEW, n=18), where weaning occurred on the 15th day of life; and the control group of males (MC, n=18) and females (FC, n=16), weaned on the 30th day. The tests used were the object location test (OLT) followed by the object recognition test (ORT), the latter with or without the use of fluoxetine (i.p. 10mg/kg). Then, the modified cross maze (MCMT) and the tail-suspension test (TST) were performed. Finally, the animals were euthanized by the use of the guillotine and their hippocampi dissected for analysis by real-time PCR. In short-term memory, MEW had lower object location index (OLI) (23.23 ± 30.52) than MC (50.85 ± 13.89 ; $p=0.041$), and lower between FEW (24.18 ± 5.84) and FC (51.2 ± 16.35 ; $p=0.017$). For long-term memory, on the other hand, OLI was lower in MEW (0.94 ± 6.18) than in MC (37.42 ± 25.79 ; $p=0.004$) and lower in FEW (24.18 ± 5.84) compared to FC (51.27 ± 16.35). In long-term ORT, MEW showed lower New Object Discrimination Index (NODI) (-5.11 ± 6.16) than MC (21.85 ± 11.68), and did not differ between FEW (27.42 ± 25.91) and FC (24.49 ± 15.31). After pharmacological manipulation, MEW-fluoxetine showed higher (54.96 ± 9.5) NODI than MEW-saline (36.28 ± 8.29). Furthermore, no difference was observed between MC-saline (59.62 ± 5.03) and MC-fluoxetine (61.60 ± 12.08); nor between the latter group and MEW-fluoxetine. No differences were observed between FEW-fluoxetine (9.28 ± 3.82) with FEW-saline (19.52 ± 8.49). In MCMT, no differences were observed between the experimental groups evaluated. Additionally, MEW showed longer immobility time in the TST (75.22 ± 49.16) than MC (20 ± 19.46 ; $p=0.026$); showing no differences between FEW and FC groups. The molecular analyses pointed out that the MEW had a higher expression for 5-HT1A and 5-HT1B receptors and a reduction of 5-HT2A when compared to the MC group. In females, there was an increase in 5-HT1A and 5-HT1B receptors and no change in 5-HT2A in the FEW group compared to FC. These results indicate that early weaning differentially affects memory and the expression of 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT2A receptors in the hippocampus of males and females.

Key words: Hippocampus. Serotonin. Memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Anatomia do hipocampo humano	20
Figura 2- Esquema da morfologia do hipocampo em corte frontal	21
Figura 3- Biossíntese da Serotonina	25
Figura 4- Síntese de segundos mensageiros por ação dos 5-HT1A, 5-HT1B e 5-HT2A	27
Figura 5- Ordem de testes comportamentais realizados com os animais de cada grupo experimental	33
Figura 6- Etapas do teste de localização e reconhecimento do novo objeto para memória de curta e longa duração	34
Figura 7- Memória de localização de objetos de curta duração em animais machos	38
Figura 8- Memória de localização de objetos de longa duração em animais machos	39
Figura 9- Memória de reconhecimento do novo objeto de longa duração em animais machos.	40
Figura 10- Tempo de imobilidade de ratos machos no teste de suspensão pela cauda	41
Figura 11- Efeito da fluoxetina sobre a memória de reconhecimento de objetos de longa duração em animais machos	42
Figura 12- Expressão de RNAm para os receptores serotoninérgico no hipocampo de ratos machos.	43
Figura 13- Memória de localização de objetos de curta duração em animais fêmeas	44
Figura 14- Memória de localização de objetos de longa duração em animais fêmeas	45
Figura 15- Memória de reconhecimento do novo objeto de curta duração em animais fêmeas	46
Figura 16- Memória de reconhecimento do novo objeto de longa duração em animais fêmeas	47
Figura 17- Tempo de imobilidade durante o teste de suspensão pela cauda em fêmeas	48
Figura 18- Teste de reconhecimento de objetos para memória de longa duração mediante administração de fluoxetina em fêmeas	49

Figura 19- Expressão de RNAm para os receptores serotoninérgico no hipocampo de ratos fêmeas	50
--	----

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

5-HT	Serotonina
AMPK	Proteina-kinase Ativada por AMP
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CF	Grupo controle de fêmeas
CFs	Grupo controle de fêmeas que receberam injeção de solução salina
CFf	Grupo controle de fêmeas que receberam injeção de fluoxetina
CM	Grupo controle de machos
CMs	Grupo controle de machos que receberam injeção de solução salina
CMf	Grupo controle de machos que receberam injeção de fluoxetina
CREB1	Proteina-1 de ligação ao elemento responsivo à AMPc
CREB2	Proteina-2 de ligação ao elemento responsivo à AMPc
DAG	Diacilglicerol
DP	Desmame precoce
DPF	Grupo de fêmeas desmamadas precocemente
DPFs	Grupo de fêmeas desmamadas precocemente que receberam injeção de solução salina
DPFf	Grupo de fêmeas desmamadas precocemente que receberam injeção de fluoxetina
DPM	Grupo de machos desmamados precocemente
DPMs	Grupo de machos desmamados precocemente que receberam injeção de solução salina
DPMf	Grupo de machos desmamados precocemente que receberam injeção de fluoxetina
IP3	Inositol trifosfato
LDP	Depressão de longa duração

LTP	Potenciação de longa duração
LO	Localização de objetos
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Proteína kinase ativada por mitógeno
MBP	Proteína básica de mielina
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização mundial de saúde
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PKA	Proteína kinase A
PKC	Proteína kinase C
PLC	Fosfolipase C
RNO	Reconhecimento do novo objeto
SERT	Transportador de recaptção de serotonina
SM	Separação materna
SNC	Sistema nervoso central
TLCM	Teste do labirinto em cruz modificado
TLNO	Teste de localização de objetos
TRNO	Teste de reconhecimento no novo objeto
TSC	Teste de suspensão pela cauda
TPH	Triptofano hidroxilase
Trp	Triptofano
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	AMAMENTAÇÃO E O DESMAME PRECOCE	17
2.2	APRENDIZADO E MEMÓRIA	20
2.2.1	Aspectos morfológicos do hipocampo	20
2.2.2	Aspectos teóricos sobre o aprendizado-memória	22
2.2.3	O sistema serotoninérgico e sua ação no hipocampo	24
3	HIPÓTESE	30
4	OBJETIVOS	31
5	MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	32
5.2	TESTES COMPORTAMENTAIS	33
5.2.1	Teste de localização e reconhecimento de objetos	33
5.2.2	Teste do labirinto em cruz modificado	35
5.2.3	Teste de suspensão pela cauda	35
5.3	MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA	35
5.4	EXPRESSÃO DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS	36
5.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
6	RESULTADOS	38
6.1	MEMÓRIA DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS EM MACHOS	38
6.2	MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM MACHOS	39
6.3	MEMÓRIA AVERSIVA EM RATOS MACHOS	40

6.4	COMPORTAMENTO SEMELHANTE A DEPRESSÃO EM RATOS MACHOS	41
6.5	EFEITOS DA FLUOXETINA NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS DE LONGA DURAÇÃO EM MACHOS	41
6.6	EXPRESSÃO DE RNAm PARA OS RECEPTORES 5-HT1A, 5-HT1B E 5-HT2A NO HIPOCAMPO DE RATOS MACHOS	42
6.7	MEMÓRIA DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS EM FÊMEAS	43
6.8	MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM FÊMEAS	47
6.9	MEMÓRIA AVERSIVA EM RATOS FÊMEAS	47
6.10	COMPORTAMENTO SEMELHANTE A DEPRESSÃO EM RATOS FÊMEAS	48
6.11	EFEITO DA FLUOXETINA NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS DE LONGA DURAÇÃO EM FÊMEAS	48
6.12	EXPRESSÃO DE RNAm PARA OS RECEPTORES 5-HT1A, 5-HT1B E 5-HT2A NO HIPOCAMPO DE RATOS FÊMEAS	49
7	DISCUSSÃO	51
8	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICE A - ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO	68
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	87

1 INTRODUÇÃO

O período da lactação é o primeiro período de vida dos mamíferos após o nascimento. Durante este período, os nutrientes necessários para maturação dos sistemas e manutenção da homeostasia, advêm do leite materno, considerado o melhor alimento para o neonato (MELO; GONÇALVES, 2014). Por esta razão, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza o aleitamento materno exclusivo durante os seis primeiros meses de vida, sendo substituído paulatinamente por outros tipos de alimentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995). Entretanto, é evidente que o período mínimo para amamentação varia muito entre as espécies, se estendendo de alguns dias a vários meses (MCCOARD et al., 2020; TAVARES et al., 2020a; KIKUSUI et al., 2019; SUMNER et al., 2008).

Durante a lactação, a oferta do leite, tal como as interações existentes entre a mãe e o filho, exerce grande influência sobre o sistema nervoso central (SNC). Assim, a separação materna e o desmame precoce (DP) podem comprometer o desenvolvimento de determinadas estruturas do sistema nervoso com possíveis consequências sobre o comportamento na idade adulta (KIKUSUI; MORI, 2009; SILVA et al., 2013; SOUZA et al., 2020a; TAVARES et al., 2020b). Atualmente, sabe-se que a separação materna promove modificações no sistema serotoninérgico, causando resistência aos efeitos anoréticos da fluoxetina (SOUZA et al., 2020a, 2020b), alterando o comportamento alimentar e reduzindo a expressão de receptores 5-HT_{1B} no hipotálamo (SOUZA et al., 2020a). Adicionalmente, a separação materna por apenas 3 horas ao dia é capaz de promover redução da diferenciação e proliferação neural do bulbo olfatório e do hipocampo, promovendo com isso danos à memória olfativa (CZARNABAY et al., 2019).

De forma semelhante, o DP altera o comportamento alimentar de ratos, (TAVARES et al., 2020c ; OLIVEIRA et al., 2011), aumenta o comportamento ansioso e a agressividade (KIKUSUI et al., 2019; KANARI et al., 2005; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2004), o que é mais evidente mediante a determinados tipos de estresse (NAKAMURA et al., 2008), além de acarretar outras alterações sistêmicas (PEIXOTO et al., 2019; PIETROBON et al., 2020). No nível molecular, o desmame precoce proporciona aumento nos níveis de corticosterona, redução do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) (KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009), prejuízo a formação de bainha de mielina (KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007), e alterações na expressão de determinados receptores serotoninérgicos (TAVARES et al., 2020; ZHANG et al., 2016; NAKAMURA et al., 2008).

O BDNF é um dos principais fatores neurotróficos do sistema nervoso central, e sua administração estimula a neurogênese no hipocampo (POPOVA; ILCHIBAEVA; NAUMENKO, 2017). Estudos *in vivo* demonstraram que a administração de uma única dose de BDNF intra-ventricular é o suficiente para aumentar a expressão dos genes para os receptores 5-HT_{2A} (NAUMENKO et al., 2012). Esse receptor é encontrado vastamente no hipocampo, e pertence a uma família de receptores de serotonina acoplados à proteína G, que quando ativados por seus agonistas, promovem melhoria nos processos de consolidação da memória de objetos (ZHANG et al., 2016a). Devido a isso, os receptores 5-HT_{2A} são um dos receptores de serotonina que estão relacionados com os processos de aprendizagem-memória hipocampo dependentes (MIGUEL et al., 2020).

Além destes receptores, os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} também são expressos no hipocampo. Em sua maioria, eles agem como autoreceptores inibindo a liberação de serotonina no hipocampo (BERUMEN et al., 2012). A diminuição nos níveis de serotonina no hipocampo é uma das responsáveis por exercer prejuízo à memória declarativa (FERNANDEZ et al., 2017) e por aumentar o comportamento depressivo (YOHN; GERGUES; SAMUELS, 2017). Desta forma, os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A}, além de integrarem vias neurais distintas, exercem papéis opostos no aprendizado-memória.

No hipotálamo de ratos, desmame precoce por separação materna promove redução na expressão dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} e aumento na expressão de SERT. Já no tronco encefálico, ocorre o aumento dos receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C} e SERT (TAVARES et al., 2020b, 2020a, 2020c). Isso demonstra que as alterações encefálicas promovidas pelo desmame precoce são diferentes ao longo do encéfalo. No hipocampo de ratos não se sabe quais os efeitos do desmame precoce sobre a memória hipocampo-dependente e sua relação com os receptores 5-HT_{1A}, 1B e 2A, sendo estas análises os objetivos deste estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AMAMENTAÇÃO E O DESMAME PRECOCE

“O desenvolvimento das glândulas mamárias não poderia ter prestado qualquer serviço, e não teria podido, por conseguinte, ser efetuado pela seleção natural, se os filhos ao mesmo tempo não pudessem tirar a sua nutrição das secreções de tais glândulas”

Charles Darwin, 1859

Os cuidados parentais são um dos comportamentos mais evidente dentro da classe *Mammalia* (FARMER, 2020). Imediatamente após o nascimento, a maioria dos filhotes de mamíferos dependem diretamente de suas mães para sua nutrição e, em alguns casos, para regular a evacuação e a temperatura corporal (PLAUT; DAVIS, 1972). Os cuidados exibidos pela mãe para com os seus filhotes são, de fato, um dos comportamentos que garante o sucesso evolutivo da espécie (FARMER, 2020). Não apenas pela proteção oferecida contra predadores (PIKE et al., 2016), mas também pelo aporte nutricional e pela contribuição para o desenvolvimento do seu sistema imunológico (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, 2020).

O leite materno é o alimento mais completo para o neonato. Ele é composto por uma mistura de água, gordura, carboidratos e sais minerais, contendo ainda os anticorpos maternos e microrganismos que contribuem para o desenvolvimento da microbiota normal (BERGER et al., 2020; LI et al., 2017; LYONS et al., 2020; WEI et al., 2020). Em humanos, pequenas modificações no teor desses nutrientes podem ser observadas em diferentes grupos populacionais (BAHREYNIAN; FEIZI; KELISHADI, 2020). Entretanto, essas modificações não causam prejuízo à sua importância nutricional para o desenvolvimento saudável da criança.

A quantidade de leite materno ofertada ao neonato deve ser moderada, para que o excesso alimentar não provoque modificações no sistema nervoso central capaz de favorecer a instalação de padrões comportamentais de ansiedade (SALARI et al., 2018; SPENCER; TILBROOK, 2009) ou causar prejuízos à memória (DE LUCA et al., 2016). O “*overfeeding*” por redução da ninhada é uma técnica amplamente utilizada em roedores, na qual se reduz o número de animais amamentados por fêmea para três ou quatro filhotes (BRAZ et al., 2020; DE LUCA et al., 2016). No que diz respeito ao sistema nervoso e ao comportamento, observou-se que ratos *Wistar* submetidos a *overfeeding* (quatro filhotes por fêmea) apresentaram microgliose no hipocampo associada com o menor desempenho nos testes de memória espacial

pelo labirinto radial, tal como no teste de reconhecimento de objetos, quando comparados com animais controle (12 filhotes por fêmea) (DE LUCA et al., 2016). Resultados semelhantes foram observados em camundongos NMRI, nos quais, além de haver prejuízo a memória espacial, observou-se ainda um aumento no comportamento ansioso, redução dos níveis de BDNF no hipocampo e um aumento nos níveis de corticosterona em resposta ao estresse (SALARI et al., 2018). Entretanto, em camundongos C57BL/6, a redução da ninhada promoveu a diminuição do comportamento ansioso e a redução dos níveis de corticosterona em resposta ao estresse (SALARI et al., 2018), indicando que os efeitos da superalimentação de leite materno variam inclusive dentro dos membros de uma mesma família taxonômica.

Da mesma forma que o *overfeeding*, a redução da oferta do leite materno também promove consequência no sistema nervoso central e no comportamento (KIKUSUI; MORI, 2009). Uma das formas de mensurar essas consequências é investigando os efeitos do DP. Neste ponto, deve-se levar em consideração pelo menos dois modelos de DP, o primeiro deles envolve manipulação farmacológica para inibir a síntese do leite (PEIXOTO et al., 2019; YOUNES-RAPOZO et al., 2015); e o segundo, a separação materna (SM) (OLIVEIRA et al., 2011b; TAVARES et al., 2020a). No DP realizado por manipulação farmacológica, utiliza-se a administração de bromocriptina, um dos agonistas dos receptores dopaminérgicos D2 que inibe a prolactina materna (PEIXOTO et al., 2019). Quando esse modelo experimental é utilizado em ratos, observa-se um aumento no número de astrócitos no hipotálamo e na densidade de fibras nervosas de Neuropeptídeo Y (NPY) no núcleo arqueado e paraventricular (YOUNES-RAPOZO et al., 2015). Além disso, esse tipo de DP promove redução da atividade simpática no tecido adiposo marrom de machos e fêmeas e aumento da proteína-kinase ativada por AMP (AMPK) em fêmeas (PEIXOTO et al., 2019). Já no desmame realizado por separação materna em roedores, a mãe é retirada do espaço onde se encontram os filhotes por volta do décimo quinto dia de vida pós-natal (OLIVEIRA et al., 2011b). Algumas das alterações observadas nesse modelo experimental se assemelham às observadas no DP por administração e bromocriptina (PEIXOTO et al., 2019). Entretanto, no comportamento ratos desmamados precocemente por SM, observou-se uma alteração no seu padrão alimentar, prorrogando o ponto de saciedade e aumentando o consumo alimentar mediante a jejum prévio (OLIVEIRA et al., 2011a, 2011b; SALLABERRY et al., 2018; TAVARES et al., 2020c). Adicionalmente, o DP por SM aumentou o consumo de alimentos palatáveis e rico em gordura (OLIVEIRA et al., 2011a; TAVARES et al., 2020b), indicando que os efeitos do DP sobre o comportamento

alimentar refletem não apenas no comportamento alimentar homeostático, mas também no hedônico.

Em relação à ansiedade, foi verificado que o DP por SM aumentou o comportamento ansioso em ratos (KODAMA et al., 2008). Além disso, ratos desmamados precocemente aumentaram a agressividade quando expostos a escassez de alimentos, o que caracteriza agressividade mediante a estresse ecológico (NAKAMURA et al., 2008). Essas alterações comportamentais observadas no modelo de DP por SM estão intimamente associadas com alterações morfológicas e moleculares no SNC (KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007).

O aumento do comportamento ansioso observado nos camundongos machos, se desenvolve juntamente com a mielinização precoce da porção anterior da amígdala basolateral (ONO et al., 2008). Além disso, mensurações dos níveis da proteína básica de mielina (MBP) demonstraram que apenas os camundongos machos apresentam redução dessa proteína, o que sugere que o sexo do animal exerce influência nas alterações promovidas pelo DP (KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007). Esses efeitos sexo-dependentes também são observados em mensurações dos níveis de corticosterona e de BDNF no hipocampo, os quais encontram-se, respectivamente, aumentado e diminuído apenas em camundongos machos (KIKUSUI et al., 2019; KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009; KODAMA et al., 2008).

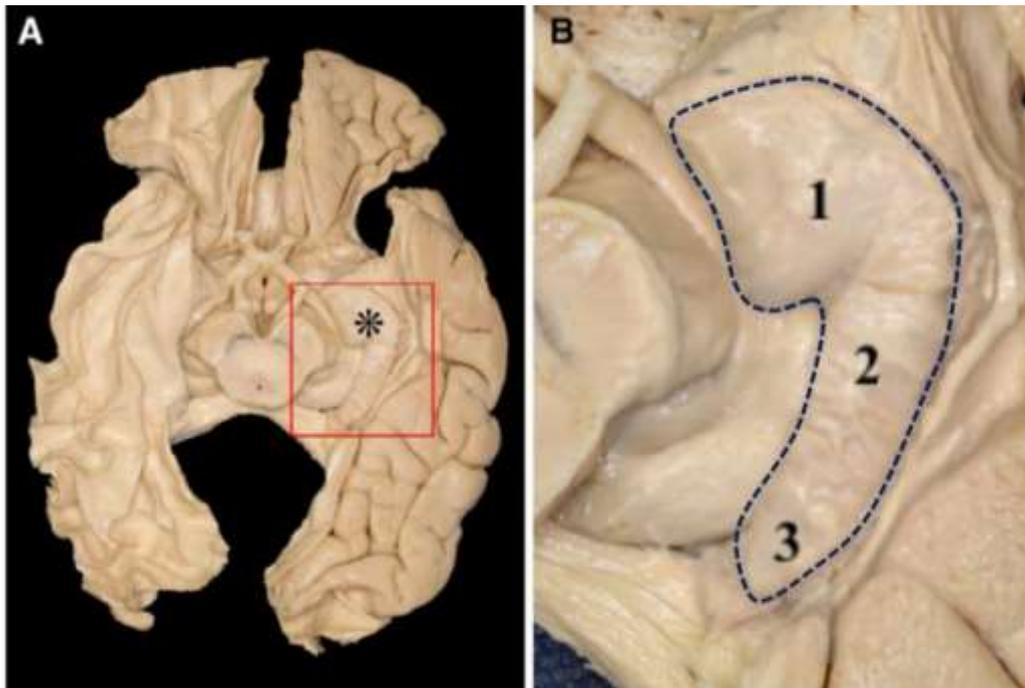
A redução do BDNF hipocampal nos animais desmamados precocemente, é uma das principais responsáveis pela diminuição da neurogênese observada nestes animais (KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009). Além disso, o desmame precoce exerceu influências sobre diversos sistemas de neurotransmissores encefálicos. No sistema serotoninérgico, o DP promoveu aumento na expressão de SERT e redução de RNAm para os receptores 5-HT1B no hipotálamo (TAVARES et al., 2020b), embora estes receptores estejam aumentados no tronco encefálico (TAVARES et al., 2020b). Já os receptores 5-HT2C do tronco encefálico apresentaram sua expressão aumentada, tanto em ratos machos (TAVARES et al., 2020a) como em fêmeas (TAVARES et al., 2020c), o que reforçou as repercussões do DP sobre o sistema serotoninérgico.

2.2 APRENDIZADO E MEMÓRIA

2.2.1 Aspectos morfológicos do hipocampo

Situado no lobo temporal, a formação hipocampal, ou simplesmente hipocampo, é uma das principais estruturas responsáveis pelos mecanismos relativos à memória explícita. Ela é formada pelo hipocampo propriamente dito¹ (Corno de Ammon) e pelo Giro denteado (HAYMAN et al., 1998; SANTOS et al., 2019), sendo este último uma das áreas onde a neurogênese permanece mesmo no indivíduo adulto (ERIKSSON et al., 1998; PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2020). Em humanos, o hipocampo apresenta uma cabeça, um corpo e uma cauda (**figura 1**), todas estas partes localizadas superiormente ao giro para-hipocampal (área entorrinal) (PASCALAU et al., 2018).

Figura 1- Anatomia do hipocampo humano. A- Vista inferior do encéfalo mostrando o hipocampo esquerdo (*) em peça cadavérica dissecado. B- Ampliação da imagem A, detalhando as porções do hipocampo, 1 – Cabeça, 2- Corpo, 3- Cauda.



Fonte: Imagem adaptada de GUTIERREZ et al., 2018.

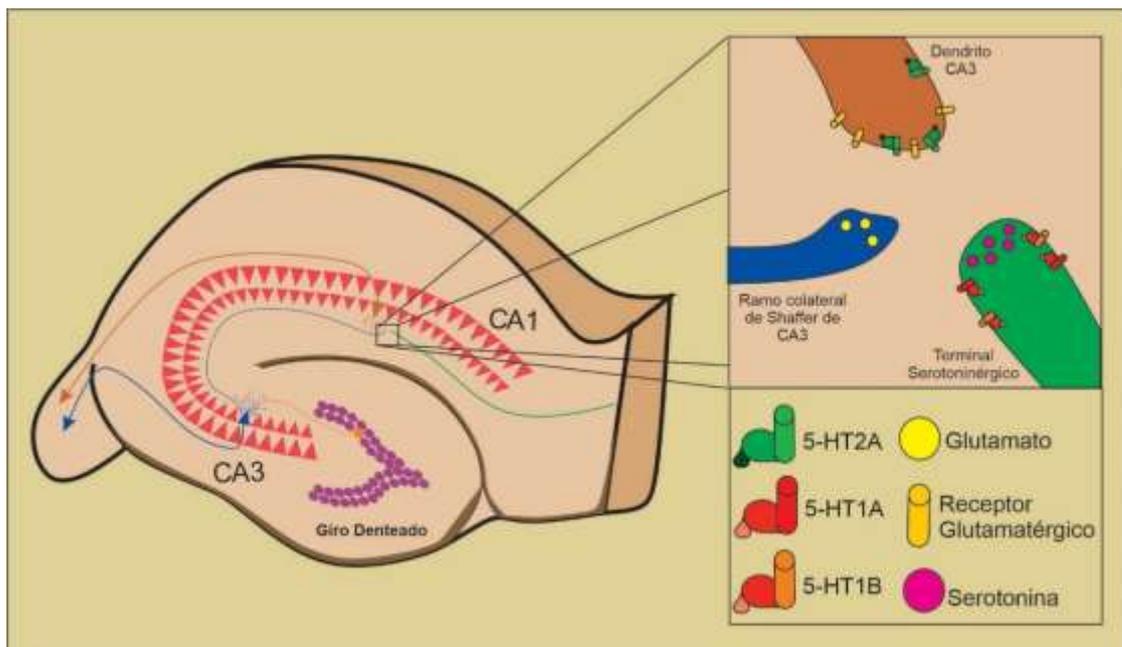
A cauda do hipocampo se projeta ântero-posteriormente em direção ao esplênio do corpo caloso, onde reduz seu volume e encerra formando o indúsio cinzento² (KAHLE;

¹ Alguns autores, incluem dentro da formação do hipocampo ainda o subículo e o giro para-hipocampal. Para mais detalhes, ver SANTOS et al. (2019).

² Pequena faixa de substância cinzenta que passa superiormente ao corpo caloso entre as estrias longitudinais lateral e medial.

FROTSCHER, 2008). Externamente ao hipocampo, encontra-se uma camada de substância branca denominada álveo, que é formado pelos axônios das células piramidais que partem do hipocampo através da fímbria (HAYMAN et al., 1998; PASCALAU et al., 2018). Essas células piramidais estão localizadas no hipocampo propriamente dito, o qual se subdivide em três áreas, abreviadas pelas siglas CA1, CA2 e CA3. Por outro lado, no giro denteado predominam as células granulares (**figura 2**). Em cortes frontais de encéfalo humano, ele localiza-se imediatamente inferior a fímbria, e é o local onde a maior parte das fibras aferentes do hipocampo penetram através da via perforante (para maiores descrições anatômicas, ver KAHLE; FROTSCHER, 2008).

Figura 2- Esquema da morfologia do hipocampo em corte frontal. As fibras serotoninérgicas oriundas dos núcleos dorsal e mediano da rafe, liberam serotonina na fenda sináptica entre os neurônios de CA1 e os ramos colaterais de Schaffer de CA3, Exercendo sua ação predominantemente nos receptores 5-HT2A pós-sinápticos e 5-HT1A e 1B pré-sinápticos.



Fonte: Próprio autor

Os axônios dos neurônios que compõem a via perforante, têm sua origem na área entorrinal. Ao chegar no giro denteado, a maior parte dessas fibras realizam sinapse com as células granulares, as quais se projetam para as células piramidais de CA3 (FREUNDL; BUZSÁKI, 1996; SANTOS et al., 2019). As células piramidais de CA3, por sua vez, emitem os ramos colaterais de Schaffer em direção às células piramidais de CA1, que é a maior fonte

de origem dos axônios que deixam o hipocampo através da fímbria do hipocampo (SANTOS et al., 2019). Essas conexões formam o circuito trissináptico do hipocampo que, por sua vez, pode ser modulado por uma rica diversidade de interneurônios, contribuindo com os processos cognitivos os quais o hipocampo exerce influência (FREUNDL; BUZSÁKI, 1996).

As influências do hipocampo sobre as atividades cognitivas apresentam como um dos principais marcos para história da neurociência moderna o caso clássico do paciente H.M., o qual foi submetido à remoção bilateral do hipocampo para o tratamento de crises epiléticas (AUGUSTINACK et al., 2014; SQUIRE, 2009). Após a remoção, as crises epiléticas ficaram controláveis. Entretanto, o paciente apresentou déficits intensos no processo de consolidação da memória declarativa. O estudo de HM serviu para reforçar que o substrato neural para o armazenamento da memória declarativa e não-declarativa não era o mesmo. Ou seja, o *engrama* desses dois tipos de memória são diferentes.

2.2.2 Aspectos teóricos sobre o aprendizado-memória

O estudo sobre a memória e os mecanismos responsáveis por sua formação, vem ganhando cada vez mais destaque (DUDAI; KARNI; BORN, 2015; SQUIRE, 2004). Em 2000, o cientista Eric Kandel, recebeu o prêmio Nobel de medicina devido aos seus estudos sobre o mecanismo molecular de formação da memória, utilizando invertebrados como modelo experimental (KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014). Entretanto, o interesse sobre o mecanismo de formação da memória é bem mais antigo, intrigando inclusive Ramón y Cajal, que defendia um substrato morfológico para memória (RAMON Y CAJAL, 1894). Segundo Kandel, em seu livro “Em busca da memória”: *-Somos o que somos por obra daquilo que sabemos e nos lembramos* (KANDEL, 2009). Ele ainda afirma que as *memórias são a cola para nossa vida mental*, unindo as experiências que vivenciamos e modulando nossos comportamentos. Assim sendo, é interessante definir o significado das palavras “aprendizado e memória”. Ainda de acordo com Kandel, o termo aprendizado é utilizado para designar a mudança de comportamento que resulta da aquisição de um novo conhecimento; enquanto o termo memória, para designar o processo de codificação, armazenamento e evocação desse conhecimento (KANDEL et al., 2014). Existem diversas classificações para designar os tipos de memória. Aqui, utilizaremos a classificação proposta pelo *The Memory Systems of 1994*, que

subdivide dois tipos de memória, de acordo com o teor da informação armazenada, como sendo memória declarativa e memória não-declarativa (SCHACTER; TULVING, 1994).

A memória declarativa é o que de fato compreendemos como memória. É tudo aquilo que pode ser expresso através da linguagem e que recordamos conscientemente. Já a memória não-declarativa é aquela cuja informação aprendida é expressa pelo empenho, que é evocada durante a execução de determinado comportamento, e não pela recordação consciente (SQUIRE, 2004). A memória declarativa depende principalmente da atividade do diencéfalo e da porção medial do lobo temporal; enquanto a memória não-declarativa, de forma geral, demanda principalmente a atividade de estruturas subcorticais (AUGUSTINACK et al., 2014; BUI et al., 2018; COHEN et al., 2013).

Uma vez que cada uma das modalidades de memória envolve diversos eventos com complexas correlações anátomo-funcionais, as descrições a seguir terão como foco de atenção principal a memória declarativa. Esse tipo de memória, é comumente designada como memória explícita, uma vez que demanda do esforço consciente para ser recordada. Além disso, tendo em vista que em sua etimologia a palavra declarativa remete à ação de declarar sobre algo, animais como roedores ou invertebrados carecem de arcabouço neural que possibilite essa verbalização. Logo, o termo “memória explícita” é mais abrangente e aconselhado quando utilizado para animais não-humanos.

A memória explícita pode ainda ser subdividida em memória episódica e memória semântica. A memória declarativa episódica é a memória autobiográfica. É aquela que se utiliza para recordar eventos aos quais vivenciamos. Já a memória semântica é aquela que utilizada ao recordar de fatos, tais como regras gramaticais. Ambos os tipos de memória explícita dependem da atividade do hipocampo (BUI et al., 2018; COHEN et al., 2013).

Durante o processo de formação de memória, vários eventos moleculares entram em ação, podendo culminar em alterações morfológicas (BIJATA et al., 2017; MARTIN et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2018). Estudos clássicos sobre esse processo de formação, reforçam a importância da serotonina como neuromodulador responsável por alterar os níveis citoplasmáticos de AMPc, Diacilglicerol (DAG) e Inositol trifosfato (IP3), o que por sua vez influenciam na liberação de neurotransmissores, transcrição gênica e expressão de proteínas relacionadas com a Potenciação de Longa Duração (LTP – *long-term potentiation*)

(ALBERINI et al., 1994; KAANG; KANDEL; GRANT, 1993; PURCELL et al., 2003; RAJASETHUPATHY et al., 2009).

Após ser liberada pelo terminal pré-sináptico, a serotonina pode agir em determinados receptores aumentando os níveis de AMPc, o que promove aumento da atividade da proteína quinase A (PKA) (KAANG; KANDEL; GRANT, 1993; STEVENS, 1994). A PKA fosforila a Proteína-1 de Ligação ao Elemento Responsivo à AMPc (CREB-1) deixando-a em sua forma ativa. Além disso, a PKA fosforila a Proteína Kinase Ativada Por Mitógeno (MAPK), que promove a desinibição da Proteína-2 de Ligação ao Elemento Responsivo à AMPc (CREB-2) sobre a CREB-1. Desta forma, a CREB-1 se torna capaz de se ligar ao promotor do Elemento Responsivo ao AMPc (CRE), sintetizando proteínas que culminam no crescimento sináptico inerente ao processo facilitação sináptica e formação de memória de longa duração (KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014).

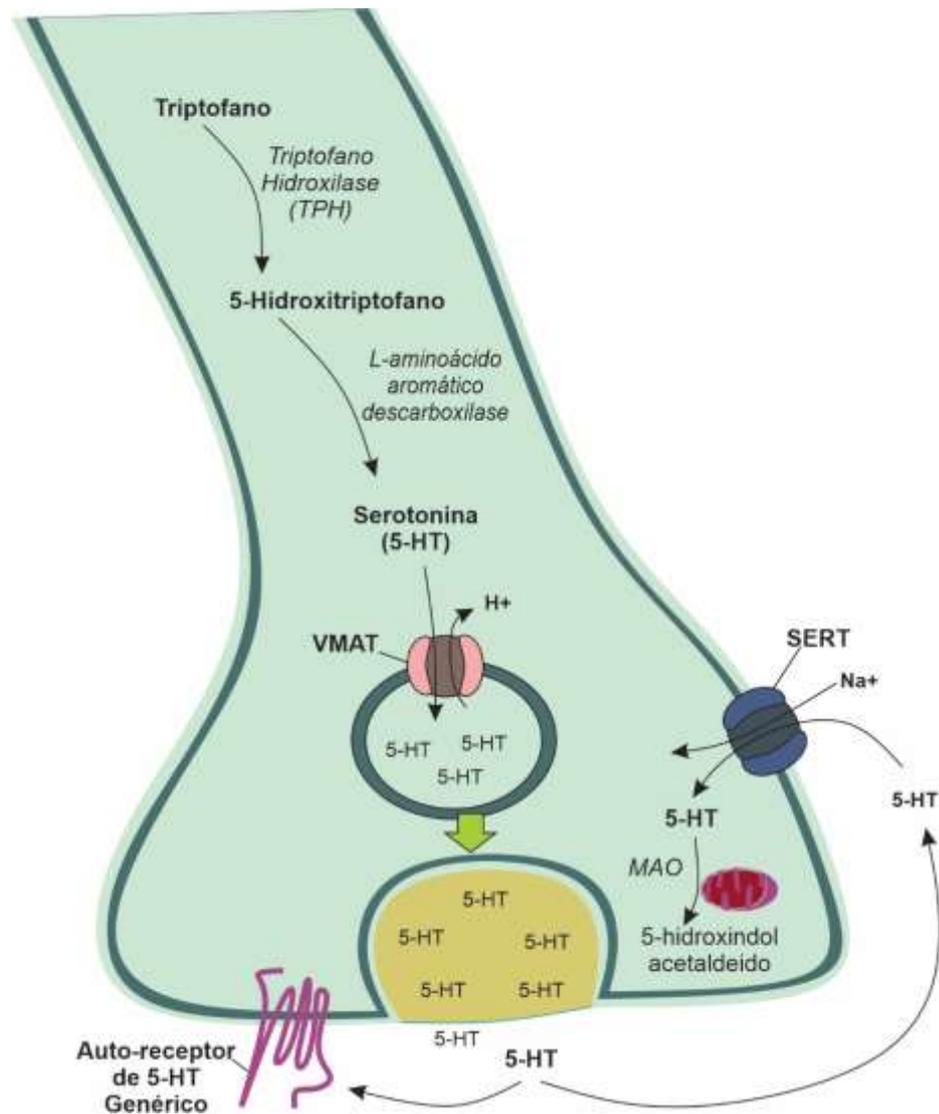
2.2.3 O sistema serotoninérgico e sua ação no hipocampo

A serotonina é um dos principais mensageiros químicos estudados no encéfalo dos seres vivos (JENKINS et al., 2016; YOUNG; LEYTON, 2002). O triptofano (Trp) proveniente da dieta é o seu precursor (BOADLE-BIBER, 1993; HÖGLUND; ØVERLI; WINBERG, 2019; WELFORD et al., 2016). No sistema nervoso central, a 5-HT é sintetizada e distribuída a partir dos núcleos da rafe na formação reticular. Em sua biossíntese ocorre a ação de duas reações enzimáticas. Na primeira etapa, o Trp é hidroxilado a partir da ação da enzima triptofano hidroxilase (TPH), sendo convertido em 5-hidroxitriptofano. Esta primeira etapa, tal como a das demais monoaminas é a etapa limitante, estando a TPH presente apenas em neurônios serotoninérgicos (HÖGLUND; ØVERLI; WINBERG, 2019). Existem duas isoformas da TPH, a TPH1, que está presente na periferia e na glândula pineal, e a TPH2, que se encontra no sistema nervoso central e entérico (HORMOZI et al., 2019; NAKAMURA; HASEGAWA, 2007).

Na segunda etapa, o 5-hidroxitriptofano é, por sua vez, convertido em 5-hidroxitriptamina (5-HT, ou serotonina) através da ação da descarboxilase dos aminoácidos aromáticos (BEST; NIJHOUT; REED, 2010; BOADLE-BIBER, 1993). Após sua biossíntese, a serotonina é transportada para vesículas secretoras, através do Transportador Vesicular de Monoaminas (VMAT) e, no caso dos neurônios, liberadas após a despolarização da membrana plasmática. Nos terminais nervosos dos neurônios serotoninérgicos estão presentes o SERT, que recicla a

serotonina do meio extracelular conduzindo-a para o meio intracelular (BEST; NIJHOUT; REED, 2010; HÖGLUND; ØVERLI; WINBERG, 2019). Em seguida, a serotonina pode ser transportada novamente para vesículas, ou degradada pela ação conjunta da Monoamino oxidase-A (MAO-A) com a Aldeído desidrogenase, formando o ácido 5-hidroxiindolacético (**figura 3**).

Figura 3- Biossíntese da serotonina. O esquema representa a terminação nervosa de um neurônio serotoninérgico, apontando todas as etapas da biossíntese e degradação da serotonina.



Fonte: Próprio autor.

O centro anatômico responsável pela síntese e distribuição de serotonina pelo sistema nervoso pode ser apresentado utilizando como referência apenas os neurônios que sintetizam

serotonina, que engloba nove populações neurais (B1-B9); ou os conglomerados celulares que contém neurônios serotoninérgicos, que são os núcleos da rafe já mencionados anteriormente (AZMITIA, 1999, 2007). Cada núcleo da rafe contém um número determinado de neurônios serotoninérgicos, variando em cerca de 50% para o Núcleo Dorsal da Rafe à menos 10% no Núcleo Paramediano da Rafe (para mais detalhes sobre as populações de neurônios serotoninérgicos que compõem cada núcleo da rafe, ver DENERIS; GASPAR, 2018). A partir destas regiões, os neurônios serotoninérgicos projetam seus axônios ao longo do sistema nervoso, sobre o qual exerce sua função modulatória.

A ação neural da serotonina, da mesma forma como a de todos os neurotransmissores, vai depender do tipo de receptor que será ativado por ela. Os receptores serotoninérgicos são agrupados em 7 famílias, que vão desde os receptores 1 até o 7, sendo que apenas o receptor 3 é do tipo ionotrópico (ZARINDAST; NASEHI; HOSEINPOURFARD, 2014). Os mecanismos celulares de ação dos receptores metabotrópicos estão intimamente relacionados com o tipo de proteína G com o qual estão acoplados (BERUMEN et al., 2012).

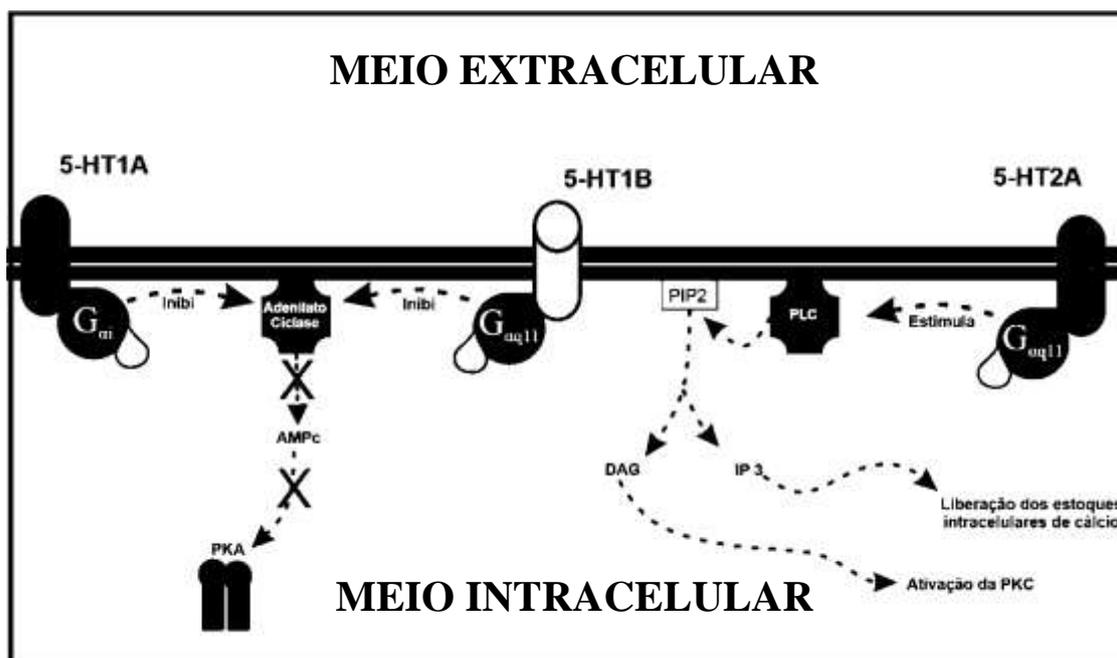
Os receptores pertencentes à família 5-HT1 e 5-HT5, são acoplados à proteína G_{ai} , que inibem a adenilato ciclase reduzindo os níveis de AMPc (GHAVAMI et al., 2004; MCCORVY; ROTH, 2015). De forma oposta, os receptores 5-HT4, 5-HT6 e 5-HT7 são acoplados a proteína G_{as} , que ativam a adenilato ciclase aumentando os níveis de AMPc. Por fim, os receptores 5-HT2 e 5-HT5 são acoplados à proteína $G_{\alpha q/11}$, que ativam a fosfolipase C (PLC) produzindo IP_3 e DAG, o que aumentam os níveis de cálcio intracelular (GHAVAMI et al., 2004; MCCORVY; ROTH, 2015) (**figura 4**). A distribuição destes receptores ao longo do sistema nervoso central e seu papel para o comportamento são bastante variáveis.

No hipocampo, a serotonina modula funções como a memória e os comportamentos ansioso e depressivo. O fato de que o hipocampo é uma das principais áreas encefálicas responsáveis pela memória não é novidade para ciência. Entretanto, quais são as influências que ele sofre pelo sistema serotoninérgico? As projeções serotoninérgicas que chegam ao hipocampo, vem através dos núcleos dorsal e mediano da rafe (COHEN et al., 2013). Ela é o neurotransmissor liberado durante o condicionamentos com *Aplysia*³ (BAILEY et al., 2000). Nesse invertebrado, durante o condicionamento, a serotonina é liberada na fenda sináptica, promovendo modificações tanto no neurônio pré-sináptico quanto no pós-sináptico. Essas modificações são

³ A *Aplysia* é uma espécie de molusco marinho que foi utilizada nos primeiros estudos sobre os mecanismos moleculares de formação da memória.

decorrentes da atividade de uma série de moléculas que atuam na expressão ou inibição da expressão de determinados genes (KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014).

Figura 4- Síntese de segundos mensageiros por ação dos 5-HT1A, 5-HT1B e 5-HT2A. Os receptores 5-HT1A e 5-HT1B estão acoplados á proteína Gi, reduzindo a ação da adenilato ciclase. Já os receptores 5-HT2A acionam a fosfolipase C (PLC), que convertem o PIP2 presente na membrana plasmática em DAG e IP3.



Fonte: Próprio autor.

A memória espacial e a memória de reconhecimento de objetos, são dois tipos de memória que dependem da atividade funcional do hipocampo e que recebem influencias do sistema serotoninérgico (BUI et al., 2018; TEIXEIRA et al., 2018; ZHANG; STACKMAN JR, 2015). Quando aciona seus receptores situados em CA1, ela promove o aumento da excitabilidade, inibindo os canais de potássio e melhorando a ativação dos receptores NMDA, o que facilita o LTP e promove benefício a memória espacial (CAI et al., 2013; CELADA; PUIG; ARTIGAS, 2013; TEIXEIRA et al., 2018). Entretanto, ao ser liberada em CA3, a serotonina promove a redução da LTP e Depressão de Longa Duração (LTD) promovida pela entrada de potenciais elétricos vindo das fibras musgosas do giro denteado (TWARKOWSKI; HAGENA; MANAHAN-VAUGHAN, 2016), reforçando a presença da diferença nas redes neurais e na distribuição espacial dos receptores serotoninérgicos no hipocampo (LUTTGEN et al., 2004; ZHANG et al., 2016).

Embora diversos receptores serotoninérgico possam exercer influências sobre a memória (AMODEO et al., 2018; SHAPIRO et al., 2018), vem ganhando destaque os receptores 5-HT_{2A}, que podem ser localizados no hipocampo e exercem importante influência sobre a memória (MIGUEL et al., 2020). Esse receptor é um dos receptores metabotrópicos de serotonina, como mencionado anteriormente, está acoplado a proteína G_{αq/11} (GHAVAMI et al., 2004; MCCORVY; ROTH, 2015). Sua localização no Corno de Amonn, é tanto nos terminais pré-sinápticos das sinapses excitatórias com os neurônios piramidais, como nos próprios dendritos e espinhas dendríticas desses neurônios (ZHANG et al., 2016). Esse padrão de distribuição dos receptores 5-HT_{2A} sugere que eles podem atuar nos processos de formação de memória hipocampo-dependente tanto nos terminais pré-sinápticos como nos pós-sinápticos. Os efeitos da ativação dos receptores 5-HT_{2A} através de injeções de seus agonistas, mostram que estes receptores promovem melhor desempenho no teste de reconhecimento do novo objeto (ZHANG et al., 2016).

Ao se administrar agonistas dos receptores 5-HT_{2A} (TCB-2) em roedores, observou-se que a ativação destes receptores promove maior consolidação da memória, pois esses benefícios só puderam ser constatados quando esse agonista era administrado após o evento de aprendizagem (ZHANG et al., 2016). Além disso, o uso deste agonista também foi realizado em animais modelo para doença de Alzheimer. Nesses animais a administração do TCB2 foi realizada durante 30 dias e promoveu melhores desempenho no teste de reconhecimento de objetos (AFSHAR et al., 2018). Adicionalmente, observou-se ainda que essa administração crônica aumenta a sobrevivência dos neurônios hipocámpais em CA1, o que sugere que a ativação dos receptores 5-HT_{2A} exerce ação neuroprotetora (AFSHAR et al., 2018).

Os efeitos benéficos dos receptores 5-HT_{2A} para o hipocampo podem ser potencializados pela ação sinérgica com outros receptores de serotonina. Tanto com a ativação isolada dos receptores 5-HT_{2A} como com o bloqueio isolado dos receptores 5-HT_{1A}, é possível constatar um efeito neuroprotetor contra ação da *streptozotocina*, uma neurotoxina utilizada para indução da doença de Alzheimer. Esse efeito é ainda mais potencializado quando se realiza a ativação dos receptores 5-HT_{2A} juntamente com o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} (SHAHIDI et al., 2019). Entretanto, o papel dos receptores 5-HT_{1A} no comportamento e na memória hipocampo-dependente ainda não está bem elucidado.

A ativação dos receptores 5-HT_{1A} aciona a fosforilação da CREB, o que por sua vez aumenta a sinaptogênese, neurogênese e exerce efeitos ansiolíticos (ZHANG et al., 2016c).

Adicionalmente, essa ativação também exibe importante papel antidepressivo e melhora a ação do BDNF (SENESE et al., 2018; ZHOU; CAO; MAR, 2014). Entretanto, em relação a memória, observou-se que a administração do agonista dos receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, tanto pode promover benefícios à memória de curta e longa duração, se administrado em baixas doses (0,3 mg/kg), como pode promover prejuízo à essas modalidades de memória, quando utiliza-se doses elevadas (1,0 mg/kg) (HAIDER et al., 2012). Já o bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} (*spiperone*) promove alteração na memória de longa duração, sem afetar a memória de curta duração (HAIDER et al., 2012). Esses resultados sugerem que uma pequena ativação dos receptores 5-HT_{1A} contribuem para os processos de memória, embora uma forte ativação destes receptores cause prejuízo à essa função cognitiva.

Além destes receptores serotoninérgicos, o hipocampo apresenta ainda os receptores 5-HT_{1B}, os quais também exercem influências na ativação dos neurônios piramidais (LU et al., 2018). A ativação do receptores 5-HT_{1B} na região CA1 do hipocampo de ratos, promove prejuízo à memória espacial no labirinto de Morris (BUHOT; PATRA; NAÏLI, 1995). Esses efeitos já são bem consolidados na literatura, demonstrando o prejuízo da ativação destes receptores para o aprendizado-memória, e os benefícios do uso de seus antagonistas (MENESES, 2001). Desta forma, o sistema serotoninérgico é capaz de exercer influências sobre os mecanismos de aprendizado e memória hipocampo dependente, a qual é determinada pela via e pelo tipo de receptor acionado.

3 HIPÓTESE

O desmame precoce reduz a expressão dos receptores 5-HT_{2A} e aumenta a expressão dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} no hipocampo de ratos, promovendo prejuízo na memória e modificando a resposta no teste de reconhecimento do novo objeto mediante o uso de fluoxetina.

4 OBJETIVOS

GERAL

- Analisar as consequências do desmame precoce sobre os receptores 5-HT1A, 1B e 2A no hipocampo de ratos e seu impacto no desempenho de testes de memória, com ou sem o uso de fluoxetina.

ESPECÍFICOS

Analisar em animais controle e desmamados precocemente:

- A memória de localização de objetos e de reconhecimento de objetos, de curta e de longa duração;
- A memória aversiva;
- O comportamento semelhante a depressão;
- A memória de longa duração para reconhecimento de objetos mediante ao uso de fluoxetina;
- A expressão de RNAm para os receptores 5HT1A, 5-HT1B e 5-HT2A no hipocampo;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para formação dos grupos experimentais, fêmeas nulíparas de ratos *Wistar* adultas foram acasaladas com machos na proporção de 1:2. Após a constatação da gestação pelo aumento do peso corporal, as fêmeas foram isoladas em gaiolas individuais recebendo água e ração *ad libitum*, sob condições constantes de temperatura (20° C), luminosidade (ciclo de 12-12hr, luz a partir das 18:00). O dia do nascimento foi considerado como dia 0, e após este dia os filhotes de cada ninhada foram randomizados e manipulados para que permanecessem apenas 8 filhotes, quatro de cada sexo, por mãe.

O período de desmame utilizado para os animais controle foi no trigésimo dia de vida pós-natal; e para os animais do grupo experimental foi o décimo quinto dia de vida, tal como realizado por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2011b). Desta forma, obtiveram-se os grupos de animais machos controle (CM) e desmamado precocemente (DPM); e fêmeas controle (CF) e desmamadas precocemente (DPF). Para realização do desmame precoce, os filhotes foram removidos da gaiola onde estavam suas mães, entretanto, estes filhotes permaneceram juntos até o trigésimo dia de vida pos-natal, visto que os filhotes do grupo controle também permaneceram juntos até este dia.

Após o trigésimo dia de vida, os animais foram alocados em duplas do mesmo sexo, por gaiola, e permaneceram recebendo água e ração *ad libitum*. A distribuição das gaiolas dos animais no biotério foi determinada aleatoriamente, tal como as gestantes que iriam compor cada um dos grupos experimentais. No dia 61 de vida pós-natal, iniciaram-se os testes comportamentais, iniciando do menos aversivo para o mais aversivo; e após a conclusão destes testes, os animais foram eutanasiados pelo uso da guilhotina.

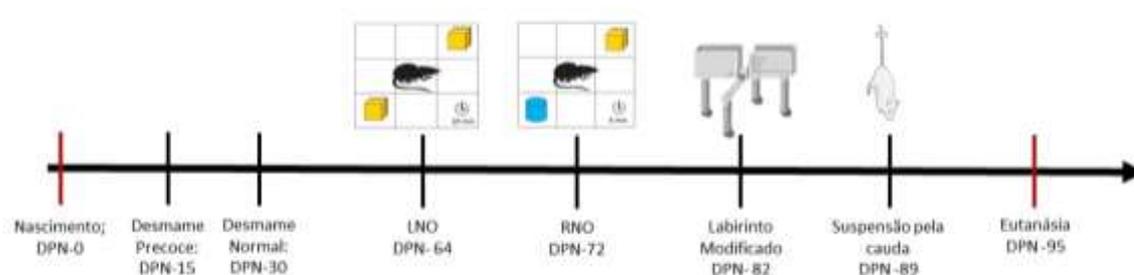
Todas as etapas deste estudo foram submetidas e aprovadas pelo comitê de ética em pesquisa com animais da Universidade Federal de Pernambuco, nº de protocolo 0020/2018.

5.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

A partir do 60º dia de vida pós-natal, os animais iniciaram os testes comportamentais. Esses testes ocorreram durante o ciclo escuro, e seguiram começando pelos menos aversivos até os mais aversivos. Desta forma, o primeiro teste foi o de localização de objetos, seguido pelo teste de reconhecimento de objetos (com ou sem manipulação farmacológica), o labirinto

em cruz modificado e, por fim, o teste de suspensão pela cauda (**figura 5**). Os animais que realizaram um determinado teste comportamental, retornam à suas respectivas gaiolas e repousam pelo período mínimo de 7 dias antes da performance em outro teste. Adicionalmente, os animais utilizados para analisar memória de objetos vide ativação do sistema serotoninérgico por fluoxetina, não foram mais utilizados em outros testes. Todas as etapas comportamentais foram filmadas por uma câmera digital (Sony Handycam DCR-DVD650).

Figura 5: Ordem de testes comportamentais realizados com os animais de cada grupo experimental.



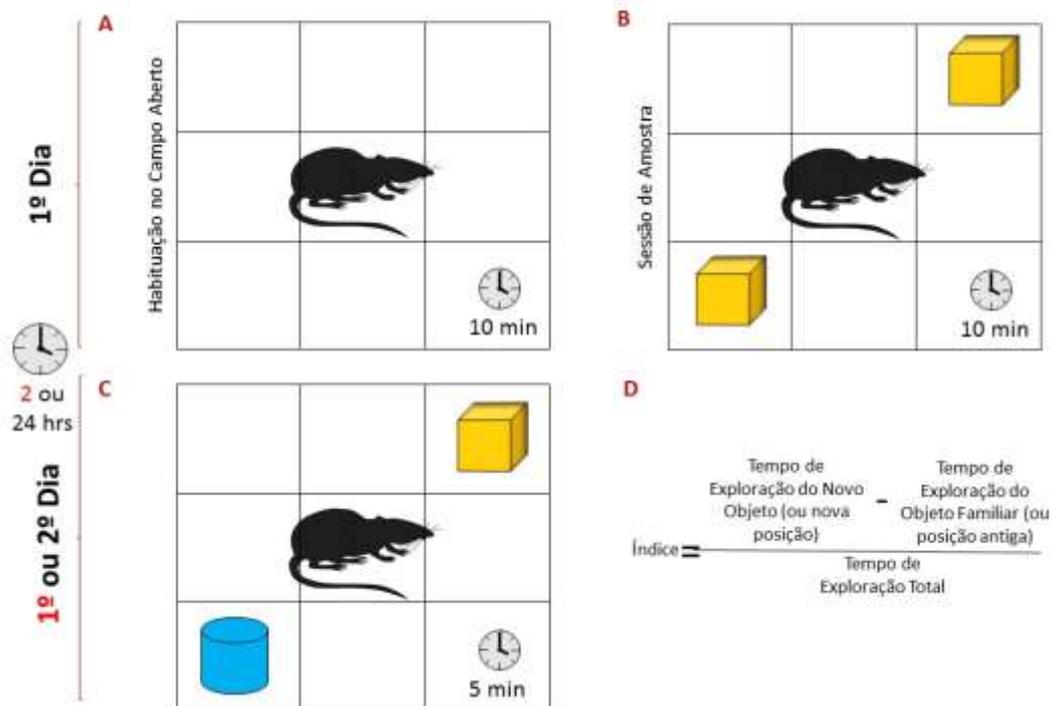
5.2.1 Teste de localização e de reconhecimento de objetos

Para analisar a memória hipocampo-dependente, foram utilizados os testes de localização e reconhecimento de objetos. Para cada um destes testes, foi investigado a memória de curta duração e de longa duração. O designer básico destes testes é semelhante. Todos eles foram constituídos por três etapas: Sessão Habituação, Sessão Amostra e Sessão Teste (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Na habituação, o animal é habituado em um campo aberto vazio por 10 minutos, retornando à sua gaiola e repousando por 60 minutos antes da próxima etapa. Na sessão amostra, dois objetos são colocados para exploração durante 10 minutos. Por fim, no teste o animal retorna ao campo aberto com os objetos e é permitido que os explore por 5 minutos, para que seja mensurado o aprendizado/memória (FERNANDEZ et al., 2017). Para analisar a memória de curta duração, o intervalo entre a sessão amostra e a sessão teste foi de 120 minutos, enquanto o intervalo para analisar a memória de longa duração foi de 24 horas.

Tanto no teste de localização de objetos, quanto no teste de reconhecimento de objetos, na sessão de treino são apresentados dois objetos semelhantes A e A' localizados em posições opostas do campo aberto (P_1 e P_2). Entretanto, na terceira etapa, o teste de localização e

reconhecimento são diferentes. No teste de localização, durante a sessão teste, os mesmos objetos apresentados na sessão amostra (A e A') estão presentes no campo aberto. Porém, a posição de um dos objetos (P₂) é modificada para uma nova posição (P₃). Já no teste de reconhecimento de objetos, as posições dos objetos da sessão amostra são as mesmas (P₁ e P₂). Entretanto, o objeto situado em P₂ é substituído por um novo objeto (B) (**figura 6**) (BUI et al., 2018; ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Estes testes são fundamentados pela curiosidade intrínseca dos animais de explorarem o novo (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

Figura 06: Etapas do teste de localização e reconhecimento do novo objeto para memória de curta e longa duração.



Durante a sessão teste, o tempo de exploração do objeto situado na posição P₁ e P₂ ou o tempo de exploração dos objetos A e B foram contabilizados para obtenção do índice de discriminação da nova posição (IDNP) ou o índice de discriminação do novo objeto (IDNO). Esse índice é calculado segundo a fórmula abaixo, onde o TEF é o tempo de exploração da posição ou do objeto familiar, o TEN é o tempo de exploração da nova posição ou do novo objeto, e o TET é o tempo de exploração total (ENNACEUR; DELACOUR, 1988; BUI et al., 2018). Esse índice varia entre -1 e 1, podendo ser multiplicado por 100 para melhores

representações gráficas. Maiores índices são associados com melhor desempenho de memória espacial e de memória de reconhecimento de objetos (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

$$\text{Índice} = \left(\frac{TEN - TEF}{TET} \right) \times 100$$

5.2.2 Teste do labirinto em cruz modificado

Para investigar a memória aversiva foi utilizado o labirinto em cruz modificado. O labirinto apresentava dois braços fechados e dois abertos. Externamente, em cada um dos lados do labirinto, foi posto uma pista espacial diferente. O teste foi feito em duas etapas. Na primeira, um dos braços fechados foi selecionado como braço aversivo. Para tanto, um objeto que expelia ar quente foi instalado acima deste braço, sendo acionado sempre que o animal entrasse com os quatro membros nesta área. Esta primeira etapa durou 10 minutos, e logo após o animal retornou à gaiola por 24 horas. Decorrido este tempo, o animal retornou ao labirinto por 180 segundos e o tempo de permanência no braço aversivo foi quantificado. Entretanto, durante esta sessão o estímulo aversivo não foi aplicado (SILVA e FRUSSA-FILHO, 2000).

5.2.3 Teste de suspensão pela cauda

O teste de suspensão da cauda é um teste comportamental para roedores, útil na avaliação de comportamento semelhante à depressivo. Para tanto, os ratos são suspensos por suas caudas, que são presas com fita adesiva numa barra, cuja posição não o permite escapar ou se agarrar a superfícies próximas. Neste teste é observado quanto tempo é gasto em uma postura imóvel de cabeça para baixo, desistindo de escapar da situação aversiva. Os animais foram submetidos ao teste em sessões de 6 minutos. Nos registros foi avaliado o tempo de imobilidade por um observador treinado, cego para as divisões dos grupos experimentais. Os ratos eram considerados imóveis somente quando pendurados passivamente e completamente imóveis por pelo menos 2 segundos.

5.3 MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA

Para investigar os efeitos da ação da ativação do sistema serotoninérgico na memória de objetos, os animais de cada grupo receberam uma dose aguda de fluoxetina (10mg/kg) ou solução salina (NaCl 0,9%) via intra-peritonal. Uma vez que objetivou-se investigar os efeitos do sistema serotoninérgico da consolidação da memória, o uso do fármaco foi empregado 20 minutos após a sessão do teste (ZHANG et al., 2016a). Desta forma, formou-se o grupo de

machos controle que receberam salina (CMs) e machos controle que receberam fluoxetina (CMf), tal como os machos desmamados precocemente que receberam salina (DPMs) e que receberam fluoxetina (DPMf). Procedimento semelhante foi realizado nas fêmeas, formando os grupos de fêmeas controle que receberam salina (CFs) ou fluoxetina (CFf), e fêmeas desmamadas precocemente que receberam salina (DPFs) ou fluoxetina (DPFf).

5.4 EXPRESSÃO DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS

Os hipocampus dos animais de cada grupo foram coletados e o RNA foi extraído pelo método TRizol (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 2006), de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, os homogenatos foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente, para permitir a dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas. Logo após, foi adicionado clorofórmio (0,2 mL) e a mistura foi centrifugada a $12000 \times g$ por 15 min a 4°C . Um volume de 0,5 ml de álcool isopropílico frio e acetato de amônio 2M (CHOMCZYNSKI, 1993) foi adicionado e em seguida foram centrifugados a $12000 \times g$ por 10 min a 4°C . O sedimento de RNA resultante foi lavado com etanol a 75% e centrifugado novamente a $12000 \times g$ por 10 min a 4°C . Em seguida, o sedimento foi seco ao ar, dissolvido em água livre de RNase e armazenado a -20°C .

O conteúdo de RNA foi determinado usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) e sua pureza foi avaliada usando a razão de absorvância de 260/280 nm. Experimentos de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para os genes de $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2\text{M}$), 5-HT1A, 5-HT1B e 5-HT2A foram realizados usando o SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, EUA). A reação foi realizada contendo 700 ng de RNA, 2x mistura de Reação Verde SYBR®, 10 μM de cada primer, mistura SuperScript® III RT / Platinum® Taq e água ultrapura - DEPC. As amostras foram processadas em duplicatas e os valores do limiar do ciclo (Ct) do gene alvo foram normalizados para o $\beta 2\text{M}$ Ct, determinado em uma amostra idêntica. A expressão relativa de mRNA foi determinada pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram tabulados em planilha digital. Em seguida, os valores foram submetidos aos testes Kolmogorov-Smirnov e Levene para identificar se a distribuição era normal e homogênea, respectivamente. A média e o desvio padrão das variáveis comportamentais mensuradas foram analisadas e comparadas pelo teste de *Mann-Whitney* e

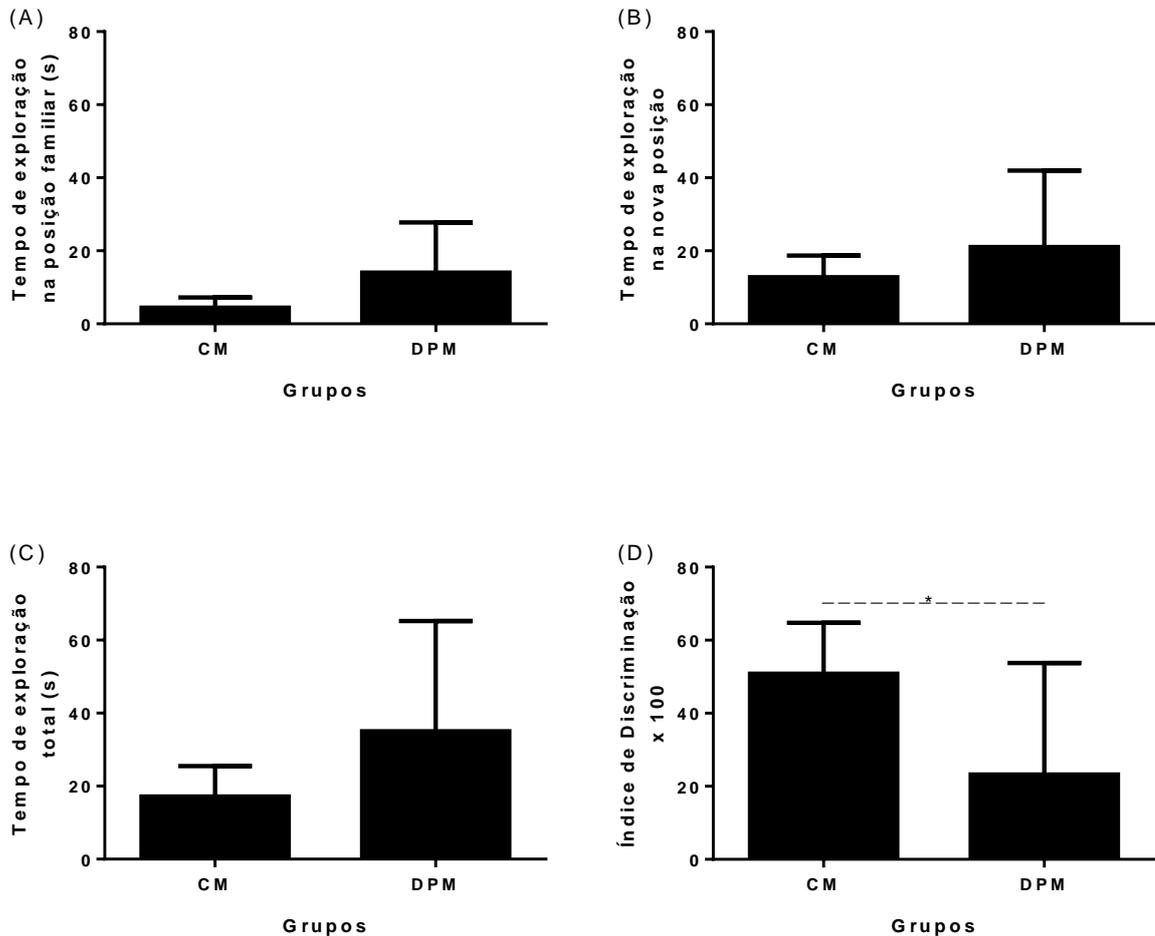
pelo ANOVA, utilizando o post-hoc de *Tukey's* sempre que o $p \leq 0,05$. Já para a análise da expressão relativa do RNAm para os receptores serotoninérgicos foi utilizado o teste T comparando a média entre os machos e a média entre as fêmeas. Em todas as análises estatísticas realizadas foi adotado $\alpha = 0,05$, e os valores foram representados em média \pm desvio padrão.

6 RESULTADOS

6.1 MEMÓRIA DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS EM MACHOS

Para a memória de localização de curta duração em machos, observou-se que o índice de discriminação do objeto foi significativamente menor no grupo CM ($23,23 \pm 30,52$) quando comparados com o grupo DPM ($50,85 \pm 13,89$; $p=0,041$). As demais variantes analisadas não apresentaram diferença estatística (**figura 7**).

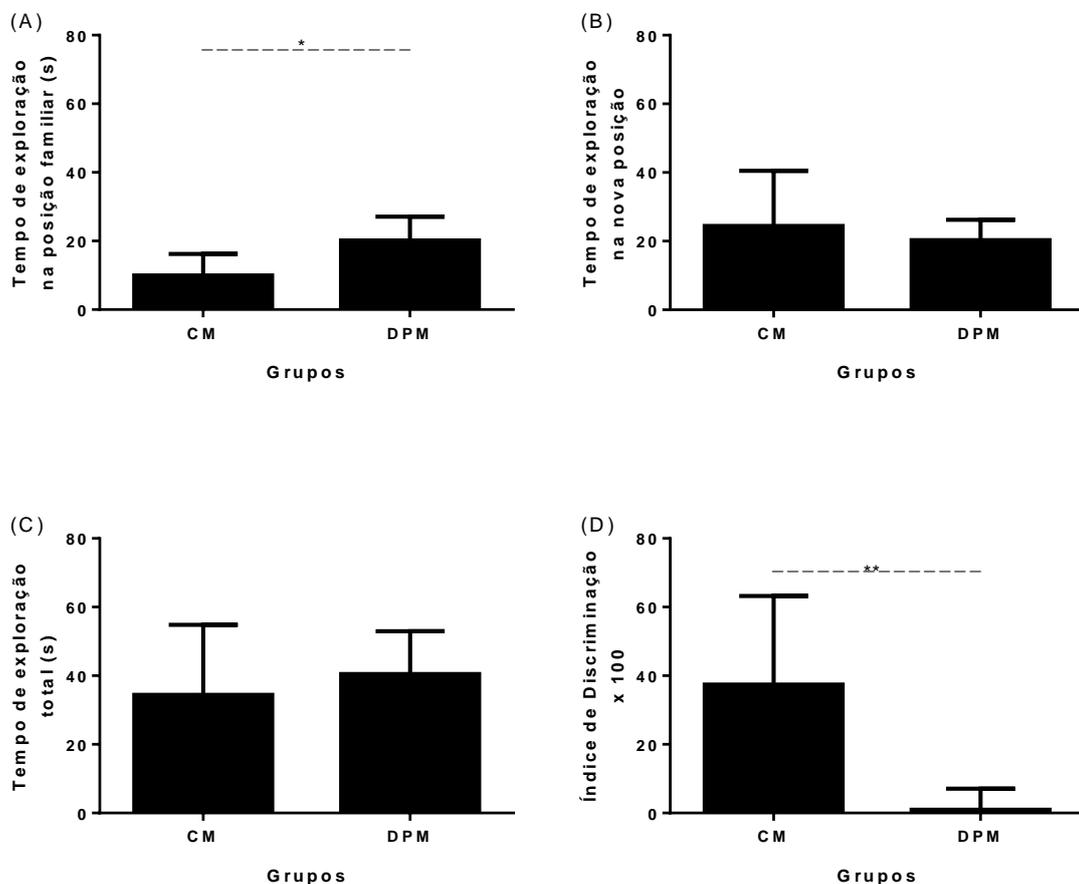
Figura 7: Memória de localização de objetos de curta duração em animais machos. CM: machos controle (n=6); DPM machos desmamados precocemente (n=6). Animais com 64 dias de vida. A – tempo de exploração do objeto na posição familiar: CM: $4,45 \pm 2,81$; DPM: $14,01 \pm 13,73$, $p = 0,132$; B – tempo de exploração do objeto na nova posição: CM: $12,74 \pm 5,93$; DPM: $21,03 \pm 20,93$, $p = 0,699$; C – tempo de exploração total: CM: $17,19 \pm 8,30$; DPM: $35,06 \pm 30,19$, $p = 0,340$; D – Índice de discriminação x100: CM: $50,85 \pm 13,89$; DPM: $23,23 \pm 30,52$, $p = 0,041$. *teste de *Mann-Whitney*.



Já na memória de longa duração, observou-se que o grupo DPM também apresentou índice de discriminação menor ($0,94 \pm 6,18$) que o grupo CM ($37,42 \pm 25,79$; $p=0,004$). Além disso, o tempo de exploração do objeto na posição familiar foi maior no grupo DPM ($20,17 \pm$

6,93) que no grupo CM ($9,99 \pm 6,21$; $p=0,03$). As demais variantes não diferiram entre os grupos (**figura 8**).

Figura 8: Memória de localização de objetos de longa duração em animais machos. CM: machos controle (n=5); DPM machos desmamados precocemente (n=6). Animais com 66 dias de vida pós-natal A – tempo de exploração do objeto na posição familiar: CM: $9,99 \pm 6,21$; DPM: $20,17 \pm 6,93$, $p = 0,030$; B – tempo de exploração do objeto na nova posição: CM: $24,43 \pm 16,09$; DPM: $20,31 \pm 5,92$, $p= 1,000$; C – tempo de exploração total: CM: $34,43 \pm 20,38$; DPM: $40,48 \pm 12,51$, $p=1,000$; D – Índice de discriminação x100: CM: $37,42 \pm 25,79$; DPM: $0,94 \pm 6,18$, $p = 0,004$. *teste de *Mann-Whitney*, $p<0,05$; ** teste de *Mann-Whitney*, $p<0,01$.



6.2 MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM MACHOS

Em relação à memória de curta duração para reconhecimento de objetos em animais machos, nenhuma das variáveis analisadas diferiram entre os grupos (**tabela 1**). Entretanto, para a memória de reconhecimento de objetos de longa duração, observou-se que o grupo DPM apresentava índice de discriminação do novo objeto inferior ($-5,11 \pm 6,16$) ao grupo CM ($21,85 \pm 11,68$; $p=0,003$) (**figura 9**).

Figura 9: Memória de reconhecimento do novo objeto de longa duração em animais machos. CM: machos controle (n=5); DPM machos desmamados precocemente (n=7). Animais com 72 dias de vida pós-natal. A – tempo de exploração do objeto familiar: CM: $14,07 \pm 4,09$; DPM: $20,58 \pm 8,50$, $p = 0,149$; B – tempo de exploração do objeto na nova posição: CM: $23,46 \pm 12,24$; DPM: $18,06 \pm 6,12$, $p = 0,530$; C – tempo de exploração total: CM: $37,54 \pm 15,65$; DPM: $38,64 \pm 14,60$, $p = 1,000$; D – Índice de discriminação x100: CM: $21,85 \pm 11,68$; DPM: $-5,11 \pm 6,16$, $p = 0,003$. ** teste de *Mann-Whitney*, $p < 0,01$.

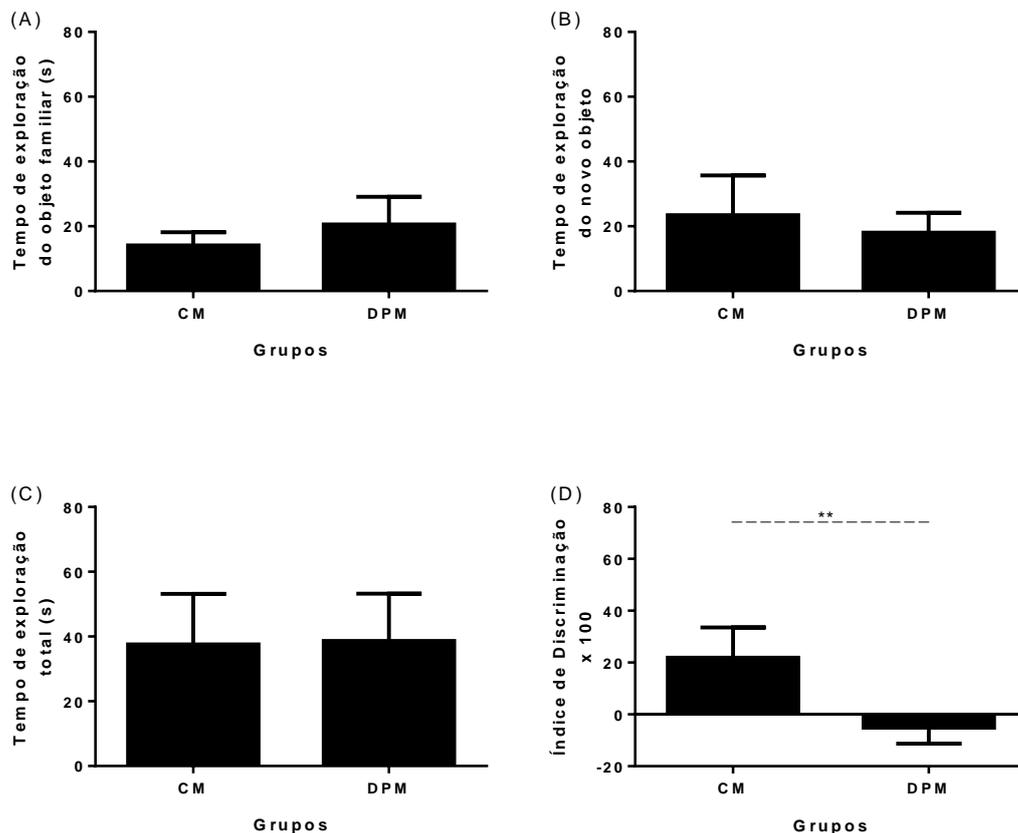


Tabela 1: Teste de reconhecimento do novo objeto em machos

	Memória de curta duração				<i>Mann-Whitney</i> Valor de p
	MC		DPM		
	MEDIA	DP	MEDIA	DP	
TEOF	7,01	3,84	10,46	8,32	0,548
TENO	13,93	10,00	10,36	6,52	0,690
TET	20,98	13,46	20,82	14,60	1,000
INDICE	30,36	17,84	3,59	15,82	0,056

6.3 MEMÓRIA AVERSIVA EM RATOS MACHOS

O tempo de latência para entrada no braço aversivo, tal como o tempo de permanência no centro não apresentou diferenças entre os animais do grupo DPM e CM (**tabela 2**).

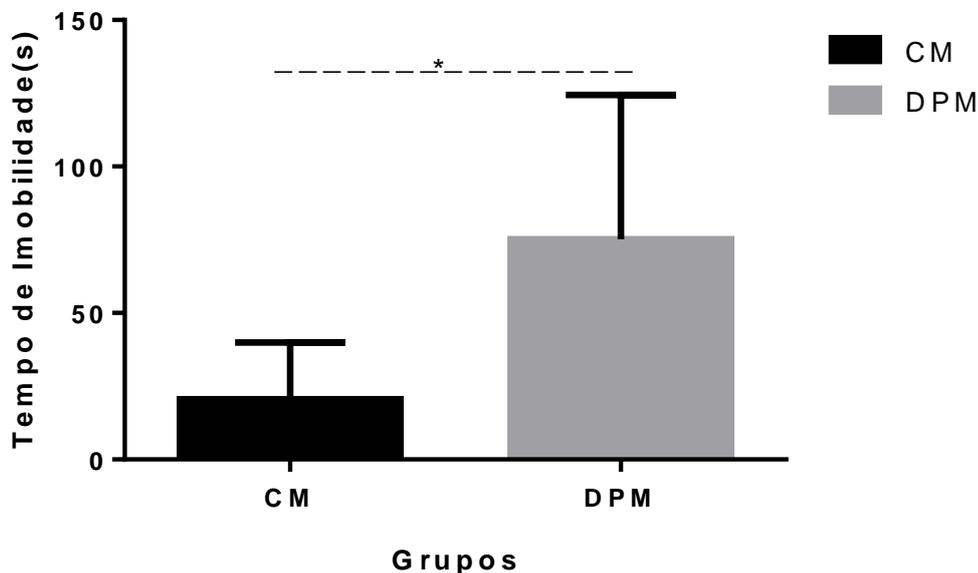
Tabela 2: Análise da memória aversiva em machos

	CM		DPM		P
	MEDIA	DP	MEDIA	DP	
Tempo de latência (s)	86,00	73,80	134,00	53,18	0,180
Tempo de permanência no centro (s)	4,16	4,35	5,55	9,81	0,937

6.4 COMPORTAMENTO SEMELHANTE A DEPRESSÃO EM RATOS MACHOS

As análises apontaram que os animais pertencentes ao grupo DPM apresentavam maior tempo de imobilidade ($75,22 \pm 49,16$) do que os animais pertencentes ao grupo CM ($20 \pm 19,46$; $p=0,026$) (**Figura 10**).

Figura 10: Tempo de imobilidade de ratos machos no teste de suspensão pela cauda. CM- machos controle; DPM- macho desmamado precocemente. Animais com 89 dias de vida pós-natal *Mann-Whitney test*, $p<0,05$.

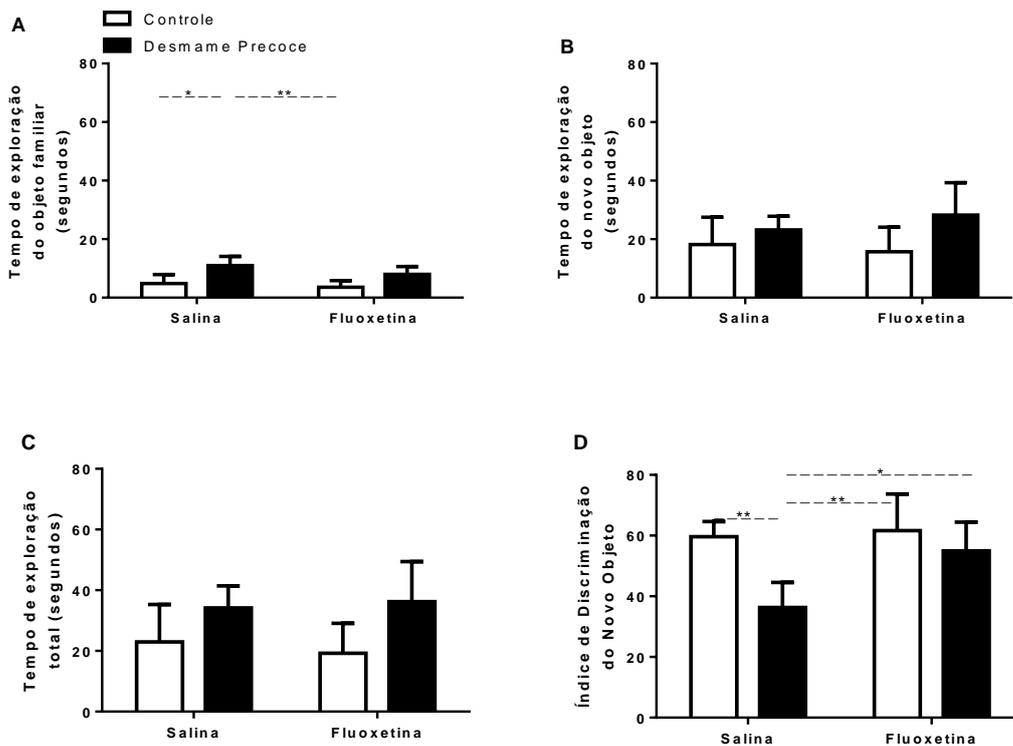


6.5 EFEITO DA FLUOXETINA NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS DE LONGA DURAÇÃO EM MACHOS

Em relação ao uso da fluoxetina, nossos resultados apontam que animais do grupo DPMs apresentam maior tempo de exploração do objeto familiar ($10,93 \pm 3,17$) que animais dos grupos CMs ($4,80 \pm 3,10$) e CMf ($3,5 \pm 2,25$) (**figura 11**). Além disso, demonstram ainda que o grupo DPMs apresentam menor índice de discriminação do novo objeto ($36,28 \pm 8,29$)

que o grupo CMs ($59,62 \pm 5,03$). Entretanto, após o uso da fluoxetina, o índice de discriminação do novo objeto do grupo DPMf ($54,96 \pm 9,5$) e CMf ($61,60 \pm 12,08$) não diferem. Adicionalmente, o IDNO do grupo DPMf é significativamente maior que o índice do grupo DPMs ($36,28 \pm 8,29$).

Figura 11: Efeito da fluoxetina sobre a memória de reconhecimento de objetos de longa duração em animais machos. Teste comportamental realizado 79º dia de vida pós-natal mediante administração de fluoxetina ou salina via intra-peritoneal, 20 minutos após a sessão teste. A- tempo de exploração do objeto familiar: CMs ($4,80 \pm 3,10$), CMf ($3,57 \pm 2,25$), DPMs ($10,93 \pm 3,17$), DPMf ($7,98 \pm 2,64$); B- tempo de exploração do novo objeto: CMs ($18,19 \pm 9,28$), CMf ($15,68 \pm 8,41$), DPMs ($23,9 \pm 4,63$), DPMf ($28,22 \pm 11,06$); C- tempo de exploração total: CMs ($22,00 \pm 12,30$), CMf ($19,25 \pm 9,83$), DPMs ($34,13 \pm 7,33$), DPMf ($36,20 \pm 13,24$); D- índice de discriminação do novo objeto: CMs ($59,62 \pm 5,03$), CMf ($61,60 \pm 12,08$), DPMs ($36,28 \pm 8,29$), DPMf ($54,96 \pm 9,5$). *Mann-Whitney test*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. As barras representam média \pm desvio padrão da média.

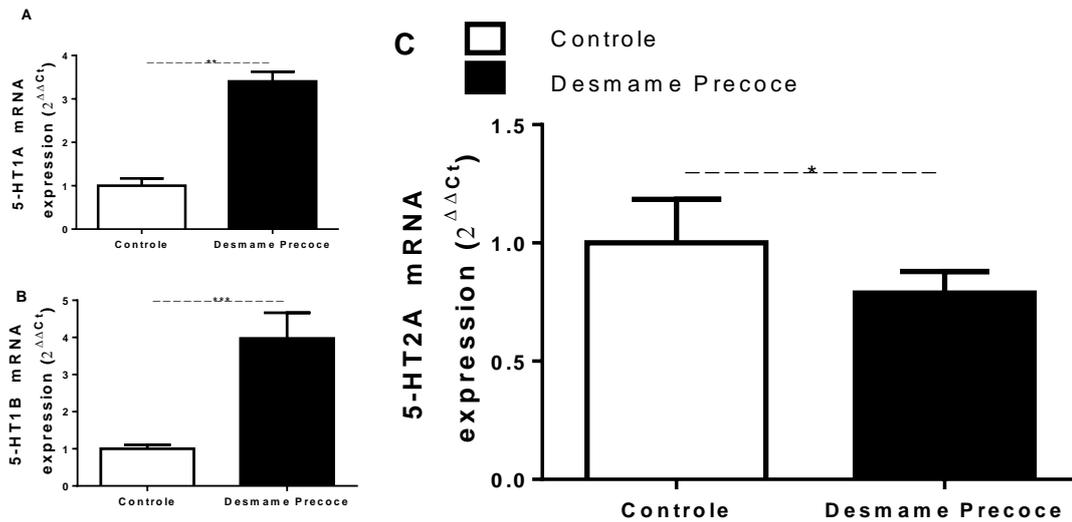


6.6 EXPRESSÃO DE RNAM PARA OS RECEPTORES 5-HT1A, 5-HT1B E 5-HT2A NO HIPOCAMPO DE RATOS MACHOS

Em relação à expressão dos receptores serotoninérgicos, observou-se que o desmame precoce em machos promove o aumento da expressão dos receptores 5-HT1A (*T test*, $p < 0,01$, **figura 12-A**) e 5-HT1B (*T test*, $p < 0,001$, **figura 12-B**), e a redução da expressão dos receptores 5-HT2A (*T test*, $p < 0,05$, **figura 12-C**) no hipocampo.

Figura 12: Expressão de RNAm para os receptores serotoninérgico no hipocampo de ratos machos.

A- expressão dos receptores 5-HT1A; B- expressão dos receptores 5-HT1B; C- expressão dos receptores 5-HT2A. Animais eutanasiados ao 95º dia de vida pós-natal pelo uso da guilhotina, entre as 9:00 e 12:00 horas. CM- animais machos do grupo controle (n=5); DPM- animais machos desmamados precocemente (n=5).



6.7 MEMÓRIA DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS EM FÊMEAS

Para a memória de localização de objetos de curta duração em fêmeas, observou-se que o tempo de exploração do objeto na posição familiar foi maior no grupo DPF ($21,55 \pm 9,04$) do que no grupo CF ($6,77 \pm 4,15$; $p=0,0030$). Por outro lado, o índice de foi menor no grupo DPF ($24,18 \pm 5,84$) do que no grupo CF ($51,27 \pm 16,35$; $p=0,017$) (**figura 13**). Não se observou diferenças no tempo de exploração do objeto na nova posição e nem no tempo de exploração total durante o teste de memória de curta duração. Entretanto, durante o teste para memória de longa duração, observou-se que no grupo DPF o tempo de exploração do objeto na posição familiar ($23,97 \pm 8,11$), na nova posição ($42,83 \pm 12,93$) e o tempo de exploração total ($66,81 \pm 15,61$) são maiores no grupo CF ($11,89 \pm 4,32$; $23,82 \pm 6,84$; $35,71 \pm 8,68$, respectivamente, $p<0,05$) (**figura 14**); embora o índice de discriminação não tenha apresentado diferença entre elas (**figura 14**).

Figura 13: Memória de localização de objetos de curta duração em animais fêmeas. Animais com 68 dias de vida pós-natal. CF: fêmeas controle (n=5); DPF fêmeas desmamadas precocemente (n=6). A – tempo de exploração do objeto na posição familiar: CF: $6,77 \pm 4,15$; DPF: $21,55 \pm 9,04$, $p = 0,030$; B – tempo de exploração do objeto na nova posição: CF: $19,20 \pm 7,81$; DPF: $34,87 \pm 14,22$, $p = 0,082$; C – tempo de exploração total: CF: $25,97 \pm 11,32$; DPF: $56,42 \pm 23,02$, $p = 0,052$; D – Índice de discriminação x100: CF: $51,27 \pm 16,35$; DPF: $24,18 \pm 5,84$, $p = 0,017$. *teste de *Mann-Whitney*, $p < 0,05$.

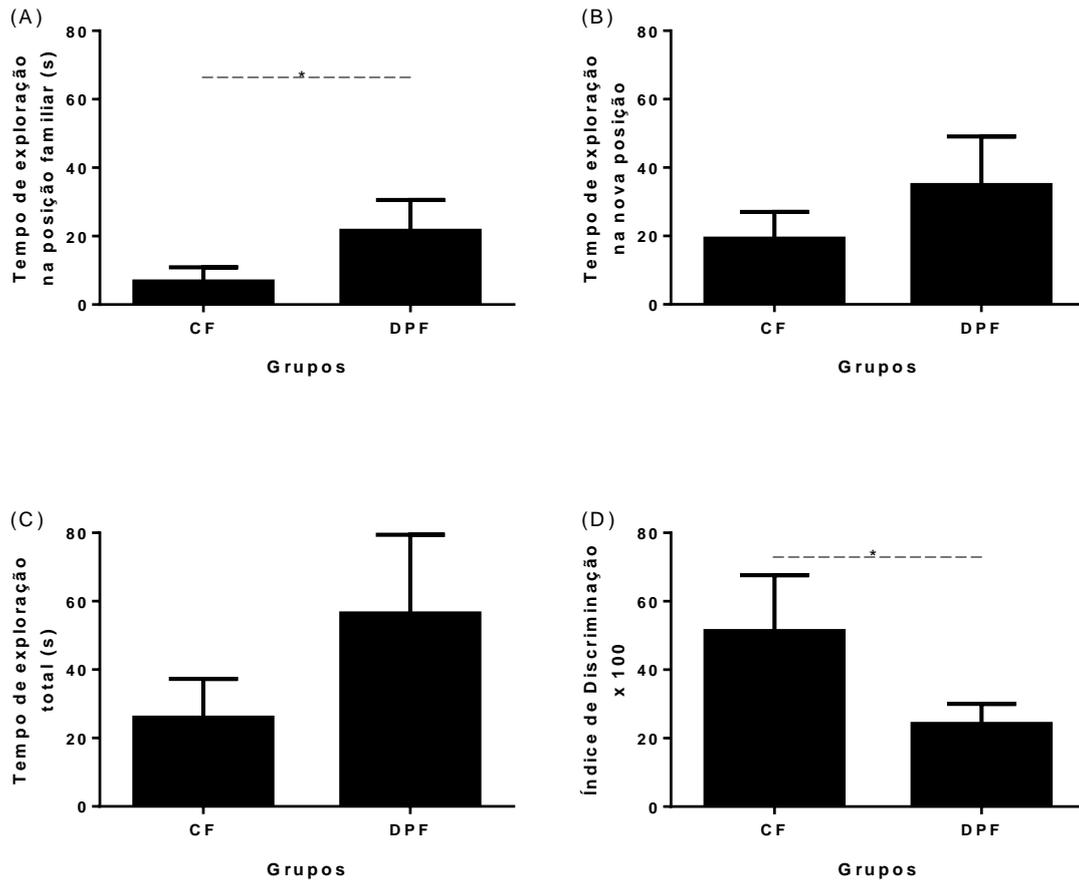
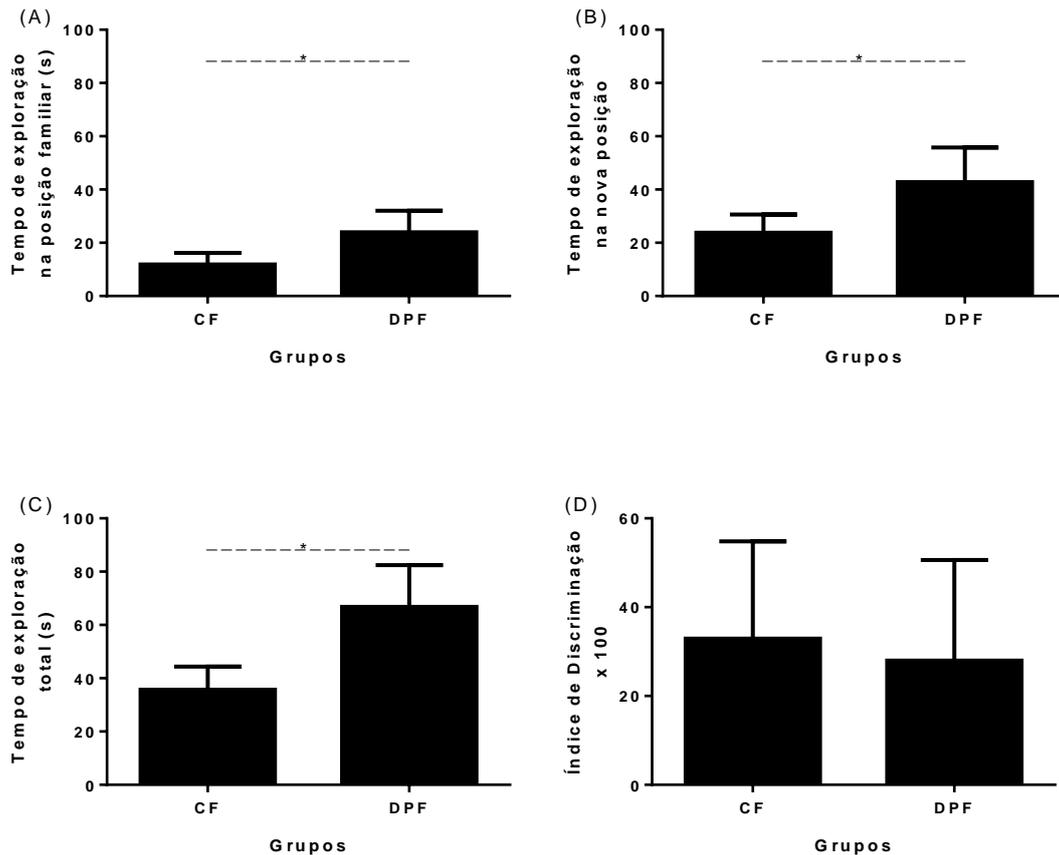


Figura 14: Memória de localização de objetos de longa duração em animais fêmeas. Animais com 70 dias de vida pós-natal. CF: fêmeas controle (n=5); DPF fêmeas desmamadas precocemente (n=6). A – tempo de exploração do objeto na posição familiar: CF: $11,89 \pm 4,32$; DPF: $23,97 \pm 8,11$, $p = 0,030$; B – tempo de exploração do objeto na nova posição: CF: $23,82 \pm 6,84$; DPF: $42,83 \pm 12,93$, $p = 0,030$; C – tempo de exploração total: CF: $35,71 \pm 8,68$; DPF: $66,81 \pm 15,61$, $p = 0,009$; D – Índice de discriminação x100: CF: $32,91 \pm 21,93$; DPF: $27,99 \pm 22,64$, $p = 1,000$. *teste de *Mann-Whitney*, $p < 0,05$.



6.8 MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM FÊMEAS

Em relação à memória de reconhecimento de objetos, observou-se que, durante as análises da memória de curta duração, o grupo DPF apresentou maior tempo de exploração do objeto familiar ($14,48 \pm 5,24$) que o grupo CF ($8,51 \pm 3,91$; $p=0,030$), embora esse aumento não tenha sido capaz de modificar o índice de discriminação do novo objeto (**figura 15**). Já na memória de longa duração (**figura 16**), nenhuma das variáveis mensuradas diferiram entre os grupos.

Figura 15: Memória de reconhecimento do novo objeto de curta duração em animais fêmeas. Animais com 74 dias de vida pós-natal. CF: fêmeas controle (n=5); DPF fêmeas desmamadas precocemente (n=6). A – tempo de exploração do objeto familiar: CF: $8,51 \pm 3,91$; DPF: $14,48 \pm 5,24$, $p=0,030$; B – tempo de exploração do objeto na nova posição: CF: $15,50 \pm 9,10$; DPF: $23,40 \pm 10,23$, $p = 0,177$; C – tempo de exploração total: CF: $24,02 \pm 10,57$; DPF: $37,85 \pm 13,75$, $p = 0,126$; D – Índice de discriminação x100: CF: $21,79 \pm 30,42$; DPF: $21,23 \pm 20,01$, $p=0,931$. *teste de *Mann-Whitney*, $p<0,05$.

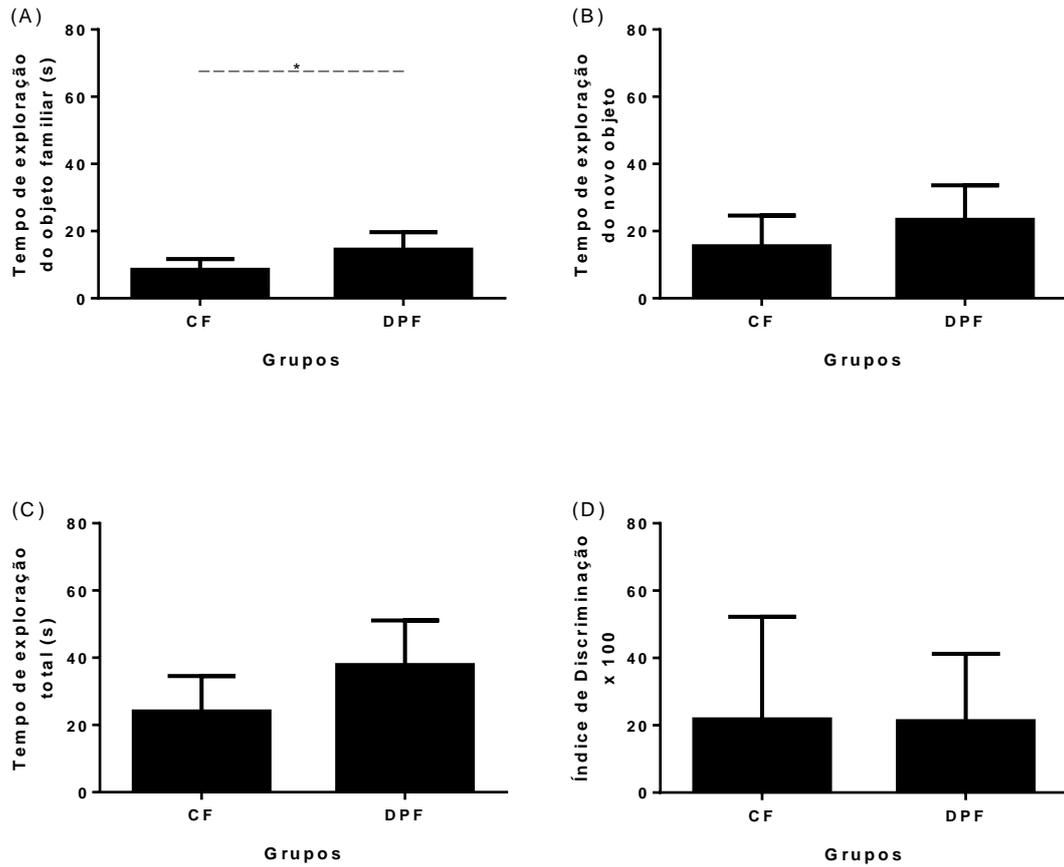
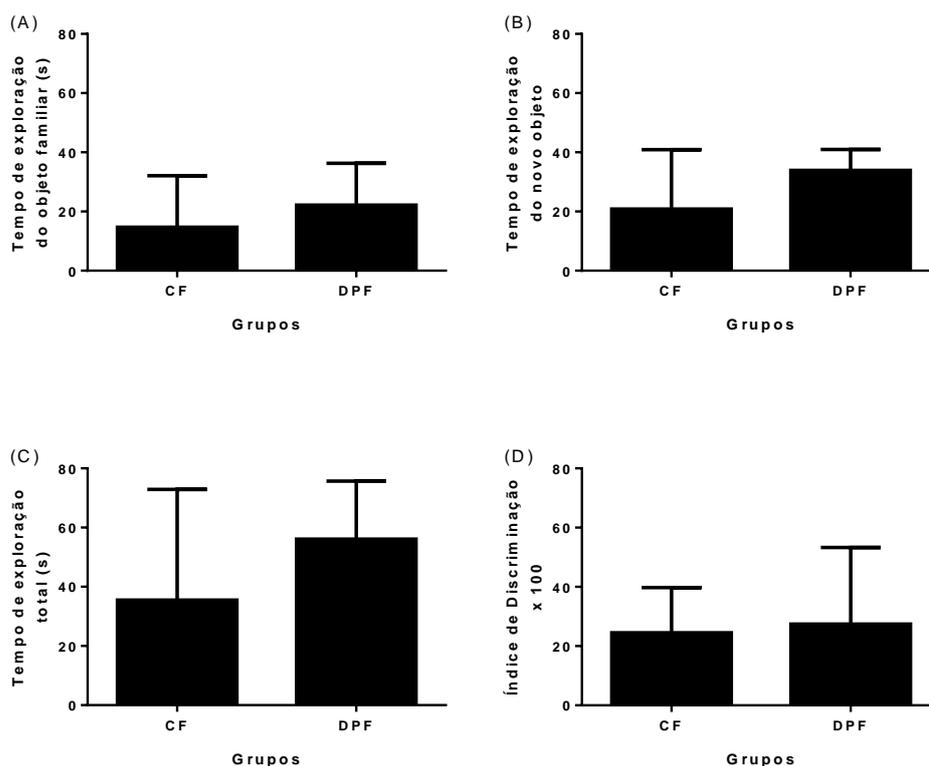


Figura 16: Memória de reconhecimento do novo objeto de longa duração em animais fêmeas.

Animais com 77 dias de vida pós-natal. CF: fêmeas controle (n=5); DPF fêmeas desmamadas precocemente (n=6). A – tempo de exploração do objeto familiar: CF: $14,67 \pm 17,42$; DPF: $22,16 \pm 14,13$, $p=0,329$; B – tempo de exploração do objeto na nova posição: CF: $20,84 \pm 20,06$; DPF: $33,93 \pm 7,01$, $p = 0,126$; C – tempo de exploração total: CF: $35,52 \pm 37,39$; DPF: $56,10 \pm 19,62$, $p = 0,126$; D – Índice de discriminação x100: CF: $24,49 \pm 15,31$; DPF: $27,42 \pm 25,91$. teste de *Mann-Whitney*.



6.9 MEMÓRIA AVERSIVA EM RATOS FÊMEAS

O tempo de latência para entrada no braço aversivo, tal como o tempo de permanência no centro não apresentou diferenças entre os animais do grupo DPF e CF (**tabela 3**).

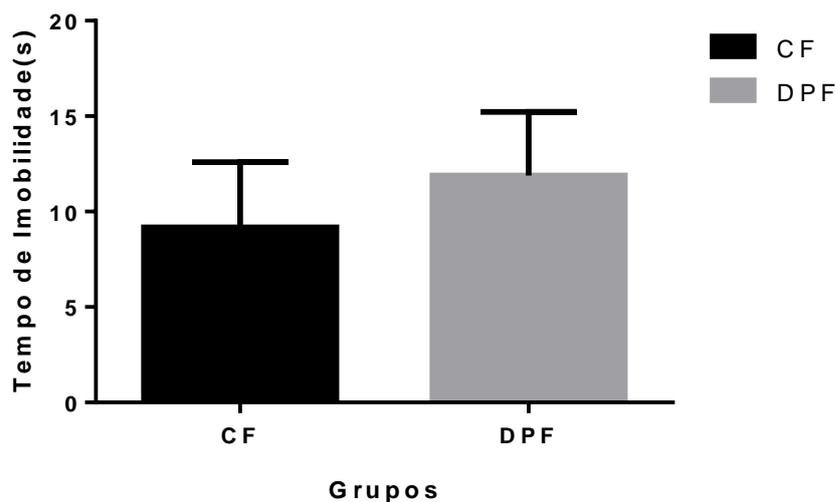
Tabela 3: Análise da memória aversiva em fêmeas

	CF		DPF		P
	MEDIA	DP	MEDIA	DP	
Tempo de latência (s)	71,75	61,13	103,75	56,16	0,283
Tempo de permanência no braço aversivo (s)	36,04	22,71	8,83	9,87	0,073

6.10 COMPORTAMENTO SEMELHANTE A DEPRESSÃO EM RATOS FÊMEAS

A análise do tempo de imobilidade apontou que não diferença ($p>0,05$) entre o grupo DPF ($9,16 \pm 3,43$) e CF ($11,88 \pm 3,33$) (**figura 17**).

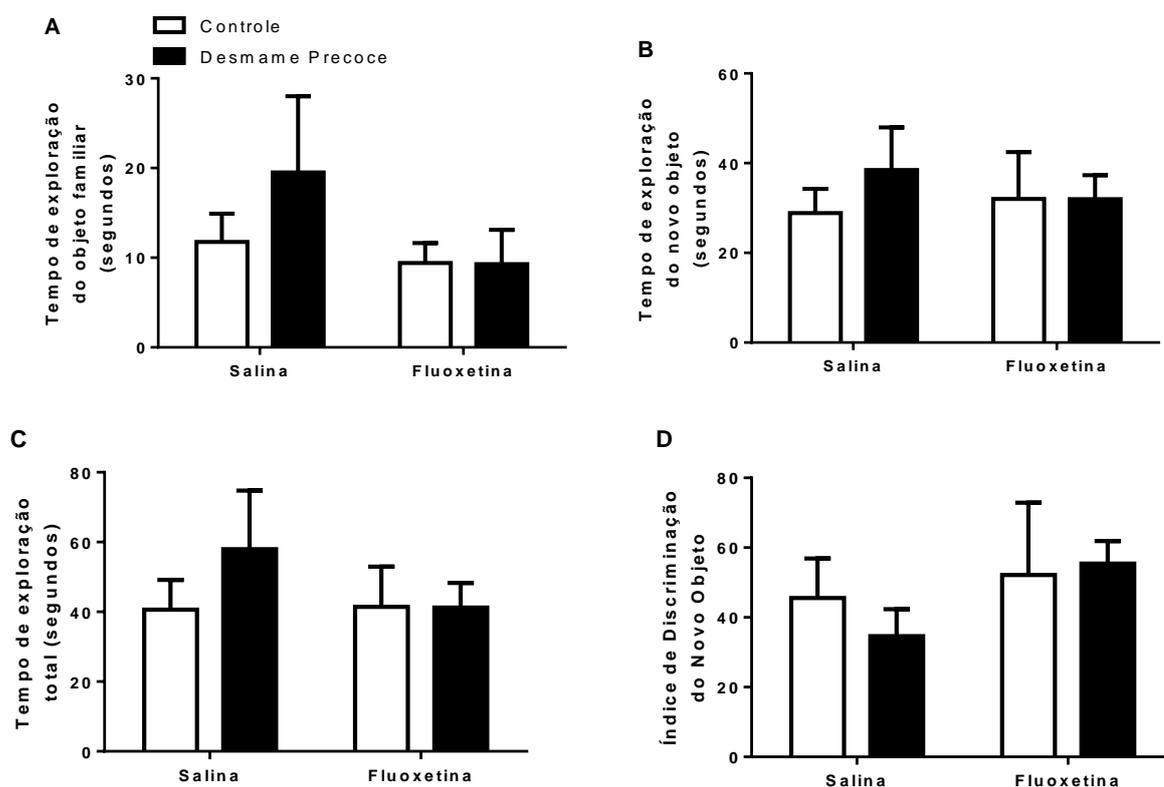
Figura 17: Tempo de imobilidade durante o teste de suspensão pela cauda em fêmeas. CF- animais fêmeas do grupo controle; DPF- animais fêmeas do grupo desmamado precocemente. Animais com 90 dias de vida pós-natal. *Mann-Whitney test*, $p>0,05$.



6.11 EFEITO DA FLUOXETINA NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS DE LONGA DURAÇÃO EM FÊMEAS

Em relação as fêmeas, o tempo de exploração do objeto familiar, o tempo de exploração do novo objeto, o tempo de exploração total e o índice de discriminação do novo objeto não diferiram entre os grupos examinados (**figura 18**).

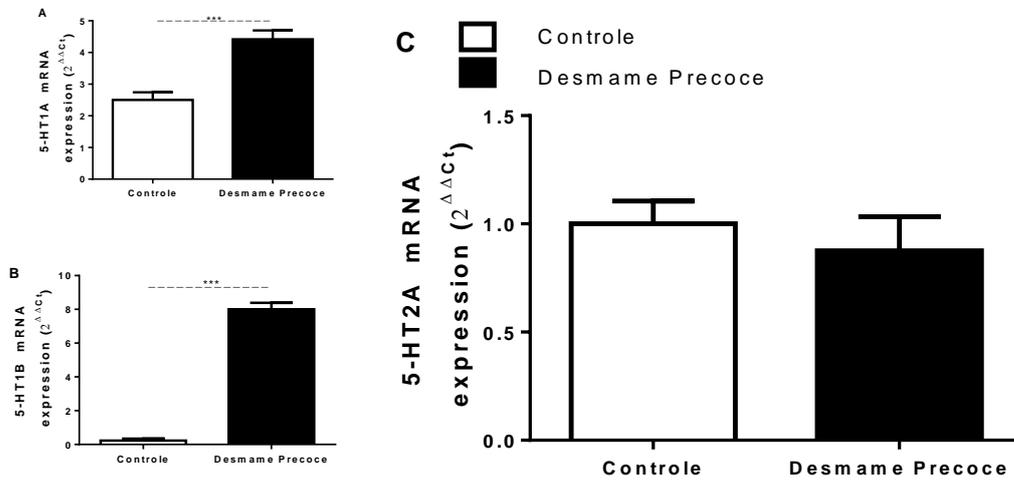
Figura 18: Teste de reconhecimento de objetos para memória de longa duração mediante administração de fluoxetina em fêmeas. O teste foi realizado no 81º dia de vida pós-natal, entre as 7:00 e as 13:00 horas. O ANOVA não identificou nenhuma diferença entre as variáveis mensuradas ($p > 0,05$). A- tempo de exploração do objeto familiar: CFs ($11,75 \pm 7,06$), CFf ($9,41 \pm 4,99$), DPFs ($19,52 \pm 8,49$), DPFf ($9,28 \pm 3,82$); B- tempo de exploração do novo objeto: CFs ($28,86 \pm 12,14$), CFf ($32,00 \pm 23,45$), DPFs ($38,47 \pm 9,51$), DPFf ($31,95 \pm 5,39$); C- tempo de exploração total: CFs ($40 \pm 19,15$), CFf ($41,41 \pm 25,87$), DPFs ($57,99 \pm 16,80$), DPFf ($41,23 \pm 7,06$); D- índice de discriminação do novo objeto: CFs ($45,58 \pm 11,32$), CFf ($52,15 \pm 20,73$), DPFs ($34,66 \pm 17,21$), DPFf ($55,46 \pm 14,37$).



6.12 EXPRESSÃO DE RNAM PARA OS RECEPTORES 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} E 5-HT_{2A} NO HIPOCAMPO DE RATOS FÊMEAS

Em relação à expressão dos receptores serotoninérgicos das fêmeas, observou-se que houve aumento na expressão dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} no hipocampo, embora que os receptores 5-HT_{2A} não tiveram sua expressão modificada (**figura 19**).

Figura 19: Expressão de RNAm para os receptores serotoninérgico no hipocampo de ratos fêmeas. A- expressão dos receptores 5-HT1A; B- expressão dos receptores 5-HT1B; C- expressão dos receptores 5-HT2A. Animais eutanasiados ao 95º dia de vida pós-natal pelo uso da guilhotina, entre as 9:00 e 12:00 horas. CF- animais fêmeas do grupo controle (n=5); DPF- animais fêmeas desmamadas precocemente (n=5). Teste T; *p<0,001.



7 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que o DP afeta diferentemente machos e fêmeas durante a execução de testes de memória. Na memória espacial de curta duração para localização de objetos, o DP promove prejuízo tanto em machos como em fêmeas. Entretanto, a memória de reconhecimento de objetos de curta duração não é afetada pelo DP. Já no caso da memória de longa duração, o DP promoveu prejuízo apenas nos machos, tanto para o reconhecimento quanto para localização de objetos. As diferentes alterações promovidas na memória de curta e longa duração observadas neste estudo, evidenciam que os mecanismos celulares e moleculares relacionados com as estas modalidades temporais de memória são distintos (QUEVEDO et al., 2004; VIANNA et al., 1999, 2000).

Estudos utilizando camundongos demonstraram que a ativação dos receptores 5-HT_{2A}, vide administração intra-hipocampal do agonista TCB-2, promove melhor desempenho no teste de reconhecimento do novo objeto (ZHANG et al., 2016a). Entretanto, o melhor desempenho ocorre quando o esse agonista é administrado após a sessão de amostra, indicando que os receptores 5-HT_{2A} estão relacionados com o processo de consolidação da memória (ZHANG et al., 2016a). Resultados benéficos à memória podem ser observados ainda em ratos. Neles, a administração do TCB-2, em animais com sintomas da Doença de Alzheimer induzido por estreptomicina, promove maiores IDNO, redução de placas β -amilóides e aumento nos níveis de BDNF no hipocampo (AFSHAR et al., 2018). A ativação dos receptores 5-HT_{2A} pelo TCB-2, promove ainda maior sobrevida dos neurônios hipocampais (AFSHAR et al., 2018) e aumento no disparo desses neurônios, promovendo maior efluxo de glutamato (ZHANG et al., 2016a)

A redução dos receptores 5-HT_{2A}, juntamente com o aumento dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} no hipocampo promovida pelo desmame precoce, reforçam ainda mais o papel do sistema serotoninérgico na memória. Além disso, estudos demonstram que o DP promove redução de BDNF no hipocampo (KIKUSUI et al., 2019; KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009), e a redução de BDNF, por sua vez, promove prejuízo a funcionalidade da SERT e dos receptores 5-HT_{1A} (POPOVA; ILCHIBAEVA; NAUMENKO, 2017). Recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou que o DP promove aumento na expressão de SERT no tronco encefálico e no hipotálamo (TAVARES et al., 2020a, 2020b). E neste estudo, observamos o aumento dos receptes 5-HT_{1A} tal como redução dos receptores 5-HT_{2A}. Com isso, é possível que o aumento na expressão do receptor 5-HT_{1A} e do receptor 5-HT_{1B} se deva a uma

upregulation devido a dessensibilização promovida pela redução do BDNF já observada neste modelo animal (POPOVA; ILCHIBAEVA; NAUMENKO, 2017). Outro ponto importante, é identificar se as alterações moleculares obtidas neste estudo são devido a mudanças pré ou pós-sinápticas.

O aumento dos receptores 5-HT1A e 5-HT1B nos terminais pré-sinápticos reduzem os níveis de serotonina liberada pelos núcleos da rafe no hipocampo. Já a ativação destes receptores nos terminais pós-sinápticos de neurônios hipocámpais promovem a hiperpolarização de neurônios piramidais (BERUMEN et al., 2012). Desta forma, uma vez que tanto a redução da serotonina no hipocampo como a hiperpolarização de neurônios piramidais podem promover prejuízo à memória de objetos (FERNANDEZ et al., 2017), não fica claro em qual via houve o aumento da expressão dos receptores aqui observados. Já para os receptores 5-HT2A, as análises comportamentais apontam que esta redução se deu nos terminais pós-sinápticos, uma vez que a ativação dos receptores nestes terminais promovem uma maior consolidação da memória (ZHANG et al., 2016b).

Para investigar se o aumento dos receptores 5-HT1A e 5-HT1B pode ter se dado nos terminais pré-sinápticos e, devido a isso, reduzindo a liberação de serotonina no hipocampo provocando prejuízo à memória de objetos observada nos machos, utilizou-se a administração aguda de fluoxetina após a sessão amostra. Observamos, então, que o prejuízo à memória de longa duração para reconhecimento de objetos promovido pelo DP nos machos, foi revertido após a administração da fluoxetina. Ou seja, o aumento na biodisponibilidade de serotonina nos animais desmamados precocemente reestabeleceu as diferenças encontradas no comportamento dos machos desmamados precocemente comparados com os machos que mamaram até o trigésimo dia de vida pós-natal. Esse resultado aponta para hipótese de que o prejuízo na memória pode ser consequência de uma redução nos níveis de serotonina promovida pelos receptores 5-HT1A e 5-HT1B pré-sináptico.

Reforçando ainda mais a teoria de que o DP promove redução na biodisponibilidade de serotonina no hipocampo, observamos que animais machos desmamados precocemente apresentam maior comportamento depressivo (YOHN; GERGUES; SAMUELS, 2017). A depressão é uma condição psiquiátrica na qual o distúrbio no humor está associado com a redução nos níveis de monoaminas, dentre as quais está a serotonina (YOHN; GERGUES; SAMUELS, 2017). Devido a isso, a modulação do sistema serotoninérgico é um dos principais alvos do tratamento da depressão maior (DALE et al., 2016; YOHN; GERGUES; SAMUELS,

2017), estando a fluoxetina entre os fármacos mais utilizados neste tratamento (WAGNER, 2015; YAN; GOLDMAN, 2019). Além disso, há ainda uma relação entre a redução dos receptores 5-HT_{2A} com a depressão (GUIARD; DI GIOVANNI, 2015; MINTUN et al., 2004).

Estudos *in vivo* com seres humanos, demonstram que pacientes diagnosticados com depressão maior apresentam menor marcação para os receptores 5-HT_{2A} no hipocampo (MINTUN et al., 2004). Adicionalmente, a ativação hipocampal dos receptores 5-HT_{2A} promovem ainda maior ativação GABAérgica pós-sináptica (GUIARD; DI GIOVANNI, 2015), sendo esta uma das respostas observadas na depressão. Devido a isso, o aumento no comportamento depressivo promovido pelo desmame precoce em machos pode estar associado a redução do RNAm para os receptores 5-HT_{2A} no hipocampo, o que também justifica a ausência desse padrão comportamental nas fêmeas.

Nosso estudo observou ainda que embora o DP não alterasse a memória aversiva em machos e nem em fêmeas. O DP está associado com a hiperatividade do eixo HPA (KIKUSUI; MORI, 2009), acarretando num maior comportamento ansioso e na maior liberação de glicocorticoides (GCs) em machos (DAUN et al., 2020; KIKUSUI; MORI, 2009). Embora os GCs liberados durante o estresse agudo promova prejuízo à memória de objeto (BOWMAN et al., 2009) e reduza a neurogênese hipocampal (NUMAKAWA; ODAKA; ADACHI, 2017), ele também favorece a formação de determinadas modalidades de memória, tal como a memória aversiva (OSBORNE; PEARSON-LEARY; MCNAY, 2015), podendo estes GCs terem exercido papel favorável à memória aversiva. Associado a isso, as influências dos hormônios gonadais também devem ser investigadas, visto que machos e fêmeas apresentam comportamentos distintos após o DP (KIKUSUI; MORI, 2009).

De fato, as fêmeas apresentam respostas diferentes às alterações promovidas pelo desmame precoce (KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007; KIKUSUI; MORI, 2009). Embora o DP provoque aumento no comportamento ansioso e cause prejuízo à formação de bainha de mielina em machos, nas fêmeas esses efeitos são amenizados (KIKUSUI; KIYOKAWA; MORI, 2007; KODAMA et al., 2008). De forma semelhante a redução na neurogênese hipocampal, embora afete ambos os sexos, incide de forma mais branda nas fêmeas (KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009). Em estudos anteriores observamos que o DP promove alteração na expressão gênica de elementos do sistema serotoninérgico (TAVARES et al., 2020a, 2020b, 2020c).

Em relação aos receptores 5-HT1B e 5-HT2C presentes no tronco encefálico, o DP promove aumento da expressão de RNAm tanto em ratos machos quanto fêmeas (TAVARES et al., 2020a, 2020b, 2020c). Entretanto, no hipotálamo, houve redução dos receptores 5-HT2C apenas nas fêmeas (TAVARES et al., 2020a, 2020c), demonstrando mais uma vez que algumas respostas ao desmame precoce são sexo-dependentes. Um dos motivos para estas observações, é a ação neuroprotetora e estimulante da neurogênese exercida pelo estrogênio (BRANN et al., 2007; KIKUSUI et al., 2013; TIBREWAL et al., 2018). Desta forma, visto que os níveis hormonais variam de acordo com o período do ciclo estral, o desempenho das fêmeas em testes de memória também difere de acordo com essas oscilações (NASCIMENTO et al., 2019). Com isso, fica claro que a interação de diversos sinalizadores celulares, como os GCs, estrogênio e serotonina, agem de forma sinérgica nos animais desmamados precocemente e, juntos, exercem as diferenças sexo-dependente nos testes de memória.

Tanto nos processos relacionados com a memória de curta duração quanto nos de longa duração, a ativação da Proteína Kinase A (PKA) e da Proteína Kinase C (PKC) exercem papel fundamental. Entretanto, a ação destas moléculas na memória acontecem em períodos diferentes (QUEVEDO et al., 2004; VIANNA et al., 1999, 2000). A atividade da PKA é indiretamente bloqueada pela ativação dos receptores 5-HT1A e 5-HT1B, uma vez que estes receptores inibem a adenilato ciclase, reduzindo os níveis citoplasmáticos de AMPc (BERUMEN et al., 2012; ZARINDAST; NASEHI; HOSEINPOURFARD, 2014). Uma vez que o aumento no AMPc é necessário para ativação da PKA, a ação dos receptores 5-HT1A e 5-HT1B atuam como antagonistas para o funcionamento da PKA.

Já a PKC é ativada pela ação dos segundos mensageiros produzidos pela ativação dos receptores 5-HT2A. Estes receptores acionam a fosfolipase C (PLC), a qual converte o PIP 2 da membrana plasmática em DAG e IP3 (BERUMEN et al., 2012; MIKOSHIBA, 2015; ZARINDAST; NASEHI; HOSEINPOURFARD, 2014). O aumento do IP3 promove a liberação de Ca^{+2} no meio intracelular, enquanto o aumento do DAG promove a maior afinidade da PKC com o Ca^{+2} , acarretando em sua ativação (BERUMEN et al., 2012; MIKOSHIBA, 2015). Desta forma, aumento do DAG e do IP3 promovem a maior atividade da maquinaria de liberação de neurotransmissores (MIKOSHIBA, 2015).

Em estudos sobre a memória, observou-se que o bloqueio da atividade da PKA antes do evento de aprendizagem ou imediatamente após, promove prejuízo a memória de curta e longa duração (QUEVEDO et al., 2004; VIANNA et al., 1999). Entretanto, o bloqueio da PKA nos

primeiros 90 minutos após o evento de aprendizagem promove prejuízo na memória de curta duração, sem prejudicar a memória de longa duração (VIANNA et al., 1999). Esse resultado destaca a importância da ativação prévia da PKA para os processos de codificação das memórias de curta e longa duração, e sua ativação precoce para os processos relacionados à memória de curta duração (QUEVEDO et al., 2004; VIANNA et al., 1999). Já o bloqueio da atividade da PKA após 170 minutos do evento de aprendizagem, prejudica apenas a memória de longa duração, destacando o papel da ativação tardia da PKA para a consolidação da memória de longa duração (VIANNA et al., 1999).

Partindo para análise da contribuição da PKC para os processos relacionados à memória de curta e longa duração, observa-se efeitos semelhantes aqueles constatados na PKA. Tal como a PKA, o bloqueio prévio e precoce da PKC, antes e 50 minutos após o evento de aprendizagem, promove prejuízo na memória de curta e longa duração, prejudicando ainda a evocação da memória já consolidada (VIANNA et al., 2000). Entretanto, no que concerne a memória de curta duração, apenas o bloqueio das isoformas α e β II da PKC afetam a memória de curta duração (VIANNA et al., 2000). Os receptores 5-HT_{2A}, os quais constamos a redução da expressão de RNAm no hipocampo, são membros da família de receptores acoplados a proteína G, que promovem o aumento da atividade da PKC (MENESES, 2007; NICHOLS, 2012). Estes receptores estão associados com a cognição, tomada de decisão e execução de tarefas, além de estar envolvido em distúrbios psiquiátricos. Eles estão distribuídos tanto em terminais pré-sinápticos como pós-sinápticos de neurônios piramidais do hipocampo (ZHANG; STACKMAN JR, 2015) exercendo, ainda, importante papel no processo de consolidação da memória de objetos (MIGUEL et al., 2020), justamente por acionar a maquinaria gênica via PKC.

Em conjunto, a preferência por dietas palatáveis com alto teor calórico, assim como o atraso no ponto de saciedade, após períodos de jejum, mostram que o desmame precoce promove uma maior adaptação no quesito alimentar, promovendo rápida resposta a escassez de nutrientes gerando um comportamento que favorece o ganho energético (OLIVEIRA et al., 2011a, 2011b; TAVARES et al., 2020b, 2020a, 2020c). A hiperatividade do eixo HPA e o maior comportamento agressivo observado nos estudos anteriores (KIKUSUI et al., 2019; KIKUSUI; ICHIKAWA; MORI, 2009; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2004; ONO et al., 2008) demonstram que o desmame precoce fortalece o instinto de defesa nos animais, o que aumenta a chance de sucesso adaptativo. Além disso, as vias relacionadas com a agressividade também promovem prejuízo a memória declarativa, o que pode ser observado tanto pelo aumento dos

glicocorticoides (KIM; HALLER, 2009) como alterações em determinadas condições neuropatológicas (NOWRANGI; LYKETSOS; ROSENBERG, 2015) que aumentam a agressividade em detrimento de déficits de memória.

Desta forma, este estudo aponta que o desmame precoce promove maior adaptabilidade frente a eventos estressores, embora também favoreça a instalação de distúrbios psiquiátricos. Essa maior adaptabilidade envolve a modificação de diversos sistemas de neurotransmissores e várias modalidades comportamentais, sendo a serotonina um destes sistemas de neurotransmissores e o aprendizado-memória um destas modalidades comportamentais.

8 CONCLUSÃO

O DP por SM promove prejuízo à memória espacial e memória de objetos, afetando diferentemente machos e fêmeas. O prejuízo à memória de objetos observado em machos foi revertido pelo aumento da sinalização serotoninérgica realizado pela administração de um fármaco inibidor de recaptção de serotonina. Com isso, vimos que a via serotoninérgica está alterada nos processos mnemônicos deste modelo, com modificações na expressão gênica dos receptores 5-HT1A, 5-HT1B e 5-HT2C. Portanto, concluímos que o sistema serotoninérgico é um dos responsáveis pelo prejuízo à memória promovido pelo desmame precoce.

REFERÊNCIAS

- AFSHAR, S. et al. The effect of NAD-299 and TCB-2 on learning and memory , hippocampal BDNF levels and amyloid plaques in Streptozotocin-induced memory deficits in male rats. **Psychopharmacology**, v. 235, p. 2809–2822, 2018.
- AHOLA, M. K.; VAPALAHTI, K. Early weaning increases aggression and stereotypic behaviour in cats. **Scientific Reports**, p. 1–9, 2017.
- ALBERINI, C. M. et al. C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in *Aplysia*. **Cell**, v. 76, n. 6, p. 1099–1114, 1994.
- AMODEO, D. A. et al. 5-HT₆ receptor agonist EMD386088 impairs behavioral flexibility and working memory. **Behavioural Brain Research**, v. 349, n. April, p. 8–15, 2018.
- ÁSGEIRSDÓTTIR, H. N.; COHEN, S. J.; STACKMAN, R. W. Object and place information processing by CA1 hippocampal neurons of C57BL / 6J mice. **J. Neurophysiology**, v. 123, p. 1247–1264, 2020.
- AUGUSTINACK, J. C. et al. H.M.'s Contributions to Neuroscience: A Review and Autopsy Studies. **Physiology & behavior**, v. 24, n. 11, p. 139–148, 2014.
- AZMITIA, E. C. Serotonin Neurons, Neuroplasticity, and Homeostasis of Neural Tissue. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 34S-45S, 1999.
- AZMITIA, E. C. Serotonin and Brain: Evolution, Neuroplasticity, and Homeostasis. **International Review of Neurobiology**, v. 77, p. 31–56, 2007.
- BAHREYNIAN, M.; FEIZI, A.; KELISHADI, R. Is fatty acid composition of breast milk different in various populations? A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 7, n. 0, p. 1–12, 2020.
- BAILEY, C. H. et al. Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing hebbian plasticity and memory? **nat rev neurosci**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2000.
- BERGER, P. K. et al. Carbohydrate composition in breast milk and its effect on infant health. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 23, n. 00, p. 1, 2020.
- BERUMEN, L. C. et al. Serotonin receptors in hippocampus. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.
- BEST, J.; NIJHOUT, H. F.; REED, M. Serotonin synthesis, release and reuptake in terminals: A mathematical model. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 7, n. 1, p. 1–26, 2010.
- BIJATA, M. et al. Synaptic Remodeling Depends on Signaling between Serotonin Receptors and the Extracellular Matrix. **Cell Reports**, v. 19, n. 9, p. 1767–1782, 2017.
- BOADLE-BIBER, M. C. Regulation of serotonin synthesis. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 60, p. 1–15, 1993.
- BOWMAN, R. E. et al. Sex-dependent changes in anxiety, memory, and monoamines

following one week of stress. **Physiology and Behavior**, v. 97, n. 1, p. 21–29, 2009.

BRANN, D. W. et al. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications. **Steroids**, v. 72, n. 5, p. 381–405, 2007.

BRAZ, G. R. F. et al. Chronic serotonin reuptake inhibition uncouples brown fat mitochondria and induces beiging / browning process of white fat in overfed rats. **Life Sciences**, v. 245, n. January, p. 117307, 2020.

BUHOT, M. C.; PATRA, S. K.; NAÏLI, S. Spatial memory deficits following stimulation of hippocampal 5-HT_{1B} receptors in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 285, n. 3, p. 221–228, 1995.

BUI, A. D. et al. Dentate gyrus mossy cells control spontaneous convulsive seizures and spacial memory. **Neuroscience**, v. 359, n. February, p. 787–790, 2018.

CAI, X. et al. Local potentiation of excitatory synapses by serotonin and its alteration in rodent models of depression. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 4, p. 464–472, 2013.

CELADA, P.; PUIG, M. V.; ARTIGAS, F. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. v. 7, n. April, p. 1–20, 2013.

CHOMCZYNSKI, P. A Reagent for the Single-step Simultaneous Isolation of RNA , DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples. **BioTechniques**, v. 15, n. 3, 1993.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction : twenty-something years on. v. 1, n. 2, p. 581–585, 2006.

COHEN, S. J. et al. The Rodent Hippocampus Is Essential for Nonspatial Object Memory. **Current Biology**, v. 23, n. September, p. 1685–1690, 2013.

CZARNABAY, D. et al. Neurobiology of Learning and Memory Repeated three-hour maternal deprivation as a model of early-life stress alters maternal behavior , olfactory learning and neural development. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 163, n. October 2018, p. 107040, 2019.

DALE, E. et al. Effects of serotonin in the hippocampus: How SSRIs and multimodal antidepressants might regulate pyramidal cell function. **CNS Spectrums**, v. 21, n. 2, p. 143–161, 2016.

DAUN, K. A. et al. Early Maternal and Social Deprivation Expands Neural Stem Cell Population Size and Reduces Hippocampus / Amygdala-Dependent Fear Memory. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, n. 22, p. 1–14, 2020.

DE LUCA, S. N. et al. Early life overfeeding impairs spatial memory performance by reducing microglial sensitivity to learning. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2016.

DENERIS, E.; GASPAR, P. Serotonin neuron development: shaping molecular and structural identities. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.**, v. 7, n. 1, p. 139–148, 2018.

DUDAI, Y.; KARNI, A.; BORN, J. Perspective The Consolidation and Transformation of Memory. **NEURON**, v. 88, n. 1, p. 20–32, 2015.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1988.

ERIKSSON, P. S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1313–1317, 1998.

FARMER, C. G. Parental Care , Destabilizing Selection , and the Evolution of Tetrapod Endothermy. **Physiology**, v. 35, p. 160–176, 2020.

FERNANDEZ, S. P. et al. Constitutive and Acquired Serotonin Deficiency Alters Memory and Hippocampal Synaptic Plasticity. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, p. 512–523, 2017.

FRAGA, M. C. et al. Maternal prolactin inhibition at the end of lactation affects learning/memory and anxiety-like behaviors but not novelty-seeking in adult rat progeny. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 1, p. 165–173, 2011.

FRAGA, M. C. et al. Anxiety-like, novelty-seeking and memory/learning behavioral traits in male Wistar rats submitted to early weaning. **Physiology and Behavior**, v. 124, p. 100–106, 2014.

FREUNDL, T. F.; BUZSÁKI, G. Interneurons of the Hippocampus. **hippocampus**, v. 6, p. 347–470, 1996.

GHAVAMI, A. et al. Differential effects of regulator of G protein signaling (RGS) proteins on serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, and dopamine D₂ receptor-mediated signaling and adenylyl cyclase activity. **Cellular Signalling**, v. 16, n. 6, p. 711–721, 2004.

GUIARD, B. P.; DI GIOVANNI, G. Central serotonin-2A (5-HT_{2A}) receptor dysfunction in depression and epilepsy: The missing link? **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. MAR, p. 1–17, 2015.

GUTIERREZ ACEVES, G. A. et al. Fractal anatomy of the hippocampal formation. **Surgical and Radiologic Anatomy**, v. 40, n. 11, p. 1209–1215, 2018.

HAIDER, S. et al. Role of Somatodendritic and Postsynaptic 5-HT_{1A} Receptors on Learning and Memory Functions in Rats. **Neurochem Res**, v. 37, p. 2161–2166, 2012.

HAYMAN, L. A. et al. The Hippocampus : Normal Anatomy and Pathology. **AJR**, v. 171, p. 1139–1146, 1998.

HÖGLUND, E.; ØVERLI, Ø.; WINBERG, S. Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: A comparative review. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 2019.

HORMOZI, M. et al. Association study of TPH1 (rs1800532) and TPH2 (rs4570625) Polymorphisms in Type 1 Bipolar Disorder in Iran. **Gene, Cell and Tissue**, v. 5, n. 4, 2019.

JENKINS, T. A. et al. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. **Nutrients**, v. 8, n. 56, p. 1–15, 2016.

KAANG, B. K.; KANDEL, E. R.; GRANT, S. G. N. Activation of cAMP-Responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in aplysia sensory neurons. **Neuron**, v. 10, n. 3, p. 427–435, 1993.

KAHLE, W.; FROTSCHER, M. Telencéfalo. In: **Anatomia: texto e atlas v.3**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. p. 438.

KANARI, K. et al. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. **Behavioural Brain Research**, v. 156, n. 1, p. 45–52, 2005.

KANDEL, E. et al. Capítulo 65: Aprendizagem e Memória. In: **Princípios de Neurociências**. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 1256–1273.

KANDEL, E. R. **Em busca da memória: o nascimento de uma nova ciência da mente**. São Paulo: Companhia das letras, 2009.

KANDEL, E. R.; DUDAI, Y.; MAYFORD, M. R. The molecular and systems biology of memory. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 163–186, 2014.

KIKUSUI, T. et al. Organizational effects of estrogen on male-type vulnerability to early weaning. **Hormones and Behavior**, v. 64, n. 1, p. 37–43, 2013.

KIKUSUI, T. et al. Early weaning increases anxiety via brain-derived neurotrophic factor signaling in the mouse prefrontal cortex. **Scientific Reports**, v. 9, n. 3991, p. 1–10, 2019.

KIKUSUI, T.; ICHIKAWA, S.; MORI, Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. 762–772, 2009.

KIKUSUI, T.; KIYOKAWA, Y.; MORI, Y. Deprivation of mother – pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. **Brain Research**, v. 1133, p. 115–122, 2007.

KIKUSUI, T.; MORI, Y. Behavioural and Neurochemical Consequences of Early Weaning in Rodents Neuroendocrinology. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 8, p. 427–431, 2009.

KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice. **Physiology & behavior**, v. 81, p. 37–42, 2004.

KIM, J. J.; HALLER, J. Glucocorticoid Hyper- and Hypofunction: Stress Effects on Cognition and Aggression. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1113, p. 291–303, 2009.

KODAMA, Y. et al. Effects of Early Weaning on Anxiety and Prefrontal Cortical and Hippocampal Myelination in Male and Female Wistar Rats. **Developmental Psychobiology**, v. 50, p. 332–342, 2008.

LI, C. et al. Immunomodulatory constituents of human breast milk and immunity from bronchiolitis. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 43, n. 8, p. 1–7, 2017.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Analysis of real-time pcr data**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LU, C. W. et al. 5-HT 1B receptor agonist CGS12066 presynaptically inhibits glutamate release in rat hippocampus. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 86, n. May, p. 122–130, 2018.

LYONS, E. et al. Breast Milk , a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. **Nutrients**, v. 12, p. 1–30, 2020.

MARTIN, K. C. et al. Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: A function for local protein synthesis in memory storage. **Cell**, v. 91, n. 7, p. 927–938, 1997.

MCCOARD, S. A. et al. Impact of early weaning on small intestine, metabolic, immune and endocrine system development, growth and body composition in artificially reared lambs. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 1, 2020.

MCCORVY, J. D.; ROTH, B. L. Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 150, p. 129–142, 2015.

MELO, C. DOS S.; GONÇALVES, R. M. Aleitamento materno versus aleitamento artificial. **Estudos**, v. 41, p. 7–14, 2014.

MENESES, A. Could the 5-HT_{1B} receptor inverse agonism affect learning consolidation? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 2, p. 193–201, 2001.

MENESES, A. Stimulation of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors or 5-HT uptake inhibition: Short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 184, n. June, p. 81–90, 2007.

MIGUEL, R. D. DA S. et al. Is there a relationship between hippocampus-dependent memory and 5-HT_{2A} receptors? Insights from a systematic review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 2355–2373, 2020.

MIKOSHIBA, K. Role of IP₃ receptor signaling in cell functions and diseases. **Advances in Biological Regulation**, v. 57, p. 217–227, 2015.

MINTUN, M. A. et al. Decreased hippocampal 5-HT_{2A} receptor binding in major depressive disorder: In vivo measurement with [¹⁸F]altanserin positron emission tomography. **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 3, p. 217–224, 2004.

NAKAMURA, K. et al. Changes in social instigation- and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5HT_{1B} mRNA receptor expression in male mice from early weaning. **Behavioural Brain Research**, v. 187, n. 2, p. 442–448, 2008.

NAKAMURA, K.; HASEGAWA, H. Developmental role of tryptophan hydroxylase in the nervous system. **Molecular Neurobiology**, v. 35, p. 45–53, 2007.

NASCIMENTO, E. B. et al. Memory impairment induced by different types of prolonged stress is dependent on the phase of the estrous cycle in female rats. **Hormones and Behavior**, v. 115, n. August, p. 104563, 2019.

NAUMENKO, V. S. et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor on behavior and key members of the brain serotonin system in genetically predisposed to behavioral disorders mouse strains. **Neuroscience**, v. 214, p. 59–67, 2012.

NICHOLS, D. E. Structure – activity relationships of serotonin 5-HT 2A agonists. **Advanced Review**, v. 1, n. October, p. 559–579, 2012.

NOVÁKOVÁ, V. et al. Effect of early and late weaning on learning in adult rats. **Nature**, v. 193, n. 280, 1962.

NOWRANGI, M. A.; LYKETSOS, C. G.; ROSENBERG, P. B. Principles and management of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's dementia. **Alzheimer's Research and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2015.

NUMAKAWA, T.; ODAKA, H.; ADACHI, N. Actions of brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoid stress in neurogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

OLIVEIRA, L. DOS S. et al. Early weaning programs rats to have a dietary preference for fat and palatable foods in adulthood. **Behavioural Processes**, v. 86, n. 1, p. 75–80, 2011a.

OLIVEIRA, S. et al. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. **Behavioural Processes**, v. 86, n. 1, p. 119–124, 2011b.

ONO, M. et al. Early weaning induces anxiety and precocious myelination in the anterior part of the basolateral amygdala of male balb / c mice. **Neurosci**, v. 156, p. 1103–1110, 2008.

OSBORNE, D. M.; PEARSON-LEARY, J.; MCNAY, E. C. The neuroenergetics of stress hormones in the hippocampus and implications for memory. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. May, p. 1–16, 2015.

PASCALAU, R. et al. Anatomy of the Limbic White Matter Tracts as Revealed by Fiber Dissection and Tractography. **World Neurosurgery**, v. 113, p. e672–e689, 2018.

PEIXOTO, T. C. et al. Early weaning alters the thermogenic capacity of brown adipose tissue in adult male and female rats. **European Journal of Nutrition**, v. 00, n. 0123456789, 2019.

PIETROBON, C. B. et al. Early weaning induces short- and long-term effects on pancreatic islets in Wistar rats of both sexes. v. 3, p. 489–502, 2020.

PIKE, D. A. et al. Surf and turf: predation by egg-eating snakes has led to the evolution of parental care in a terrestrial lizard. **Nature Publishing Group**, v. 6, n. October 2015, p. 2–8, 2016.

PLANCHEZ, B.; SURGET, A.; BELZUNG, C. Adult hippocampal neurogenesis and antidepressants effects. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 50, p. 88–95, 2020.

PLAUT, S. M. ; DAVIS, J. M. Effects of mother-litter separation on survival, growth, and brain amino acid levels. **PhysiolBehav**, v. 8, 1972.

POPOVA, N. K.; ILCHIBAEVA, T. V; NAUMENKO, V. S. Neurotrophic Factors (BDNF and GDNF). **Biochemistry**, v. 82, n. 3, p. 308–317, 2017.

PORTERO-TRESSERRA, M. et al. Maternal separation increases alcohol- drinking behaviour and reduces endocannabinoid levels in the mouse striatum and prefrontal cortex. **European Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 4, p. 499–512, 2018.

PURCELL, A. L. et al. Activation of a tyrosine kinase-MAPK cascade enhances the induction of long-term synaptic facilitation and long-term memory in *Aplysia*. **Neuron**, v. 37, n. 3, p. 473–484, 2003.

QUEVEDO, J. et al. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 154, p. 339–343, 2004.

RAJASETHUPATHY, P. et al. Characterization of Small RNAs in *Aplysia* Reveals a Role for miR-124 in Constraining Synaptic Plasticity through CREB. **Neuron**, v. 63, n. 6, p. 803–817, 2009.

RAMON Y CAJAL, S. La fine structure des centres nerveux. **Proc. R. Soc. Lond.**, v. 55, p. 444–468, 1894.

SALARI, A. A. et al. Small litter size impairs spatial memory and increases anxiety- like behavior in a strain-dependent manner in male mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

SALLABERRY, C. et al. Sex differences in the effects of pre- and postnatal caffeine exposure on behavior and synaptic proteins in pubescent rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, n. March 2017, p. 416–425, 2018.

SANTOS, V. R. et al. Life and death in the hippocampus: What's bad? **Epilepsy and Behavior**, v. 20, n. 106595, p. 01–15, 2019.

SCHACTER, D. L.; TULVING, E. What are the memory systems of 1994? In: SCHACTER, D. L.; TULVING, E. (Eds.). . **Memory systems of 1994**. London: Cambridge Massachusetts, 1994. p. 1–38.

SENESE, N. et al. Role of hippocampal 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like phenotype of mice expressing RGS-insensitive Gα_{i2} protein. **Neuropharmacology**, v. 141, p. 296–304, 2018.

SHAHIDI, S. et al. Protective effects of 5-ht_{1a} receptor inhibition and 5-ht_{2a} receptor stimulation against streptozotocin-induced apoptosis in the hippocampus. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 26, n. 2, p. 40–51, 2019.

SHAPIRO, Z. R. et al. 5-HT_{1a} receptor involvement in temporal memory and the response to temporal ambiguity. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. JUL, p. 1–19, 2018.

SILVA, M. C. et al. Perinatal stress: Characteristics and effects on adult eating behavior.

Revista de Nutrição, v. 26, n. 4, 2013.

SOUZA, J. A. et al. Early life stress induced by maternal separation during lactation alters the eating behavior and serotonin system in middle-aged rat female offspring. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 192, n. March, p. 172908, 2020a.

SOUZA, J. A. et al. Dual exposure to stress in different stages of development affects eating behavior of male Wistar rats. **Physiology & Behavior**, v. 214, p. 112769, 2020b.

SPENCER, S. J.; TILBROOK, A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 8, p. 1133–1143, 2009.

SQUIRE, L. R. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 82, n. 3, p. 171–177, 2004.

SQUIRE, L. R. The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. **Neuron**, v. 61, n. 1, p. 6–9, 2009.

STEVENS, C. F. CREB and Memory Consolidation Minireview. **Cell**, v. 13, p. 769–770, 1994.

SUMNER, B. E. H. et al. Early weaning results in less active behaviour, accompanied by lower 5-HT_{1A} and higher 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in specific brain regions of female pigs. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 8, p. 1077–1092, 2008.

TAVARES, G. A. et al. Early weaning modulates eating behavior and promotes hypofunction of the serotonergic (5HT) system in juvenile male rats. **Internatona Journal of Developmental Neuroscience**, v. 00, p. 1–11, 2020a.

TAVARES, G. A. et al. Early weaning leads to disruption of homeostatic and hedonic eating behaviors and modulates serotonin (5HT) and dopamine (DA) systems in male adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 383, n. January, 2020b.

TAVARES, G. A. et al. Early weaning disrupts feeding patterns in female juvenile rats through 5HT- system modulations. **Behavioural Processes**, v. 170, n. November 2019, p. 103981, 2020c.

TEIXEIRA, C. M. et al. Hippocampal 5-HT Input Regulates Memory Formation and Schaffer Collateral Excitation. **Neuron**, v. 98, n. June, p. 1–13, 2018.

TIBREWAL, M. et al. Disruption of Interneuron Neurogenesis in Premature Newborns and Reversal with Estrogen Treatment. **The Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 5, p. 1100–1113, 2018.

TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. Immunomodulatory Components of Human Colostrum and Milk. **Immunology of milk and lactation**, v. 94, p. 1–10, 2020.

TWARKOWSKI, H.; HAGENA, H.; MANAHAN-VAUGHAN, D. The 5-Hydroxytryptamine 4 Receptor Enables Differentiation of Informational Content and Encoding in the Hippocampus. **Hippocampus**, v. 26, n. 7, p. 875–891, 2016.

VIANNA, M. R. M. et al. Intrahippocampal infusion of inhibitor of protein kinase A separates short- from long-term memory. **Behavioural Pharmacology**, v. 10, p. 223–227, 1999.

VIANNA, M. R. M. et al. Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. **Psychopharmacology**, v. 150, p. 77–84, 2000.

WAGNER, G. A. Treatment of depression in older adults beyond fluoxetine. **Revista de Saude Publica**, v. 49, 2015.

WEI, M. et al. Investigation of amino acids and minerals in Chinese breast milk. **J Sci Food Agric**, v. 24, 2020.

WELFORD, R. W. D. et al. Serotonin biosynthesis as a predictive marker of serotonin pharmacodynamics and disease-induced dysregulation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Organization's infant-feeding recommendation. v. 73, p. 165–74, 1995.

YAN, T.; GOLDMAN, R. D. Time-to-effect of fluoxetine in children with depression. **Canadian Family Physician**, v. 65, n. 8, p. 549–551, 2019.

YOHAN, C. N.; GERGUES, M. M.; SAMUELS, B. A. The role of 5-HT receptors in depression Tim Bliss. **Molecular Brain**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

YOUNES-RAPOZO, V. et al. Early weaning by maternal prolactin inhibition leads to higher neuropeptide Y and astrogliosis in the hypothalamus of the adult rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 3, p. 536–545, 2015.

YOUNG, S. N.; LEYTON, M. The role of serotonin in human mood and social interaction : Insight from altered tryptophan levels. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 71, 2002.

ZARINDAST, M.; NASEHI, M.; HOSEINPOURFARD, M. A Mini Review of Serotonin and Its Receptors. **International Journal of Medical Reviews**, v. 1, n. 1, p. 39–45, 2014.

ZHANG, G. et al. Examination of the hippocampal contribution to serotonin 5-HT_{2A}receptor-mediated facilitation of object memory in C57BL/6J mice. **Neuropharmacology**, v. 109, p. 332–340, 2016a.

ZHANG, G. et al. Examination of the hippocampal contribution to serotonin 5-HT_{2A} receptor-mediated facilitation of object memory in C57BL/6J mice. **Neuropharmacology**, v. 109, p. 332–340, 2016b.

ZHANG, G.; STACKMAN JR, R. W. The role of serotonin 5-HT 2A receptors in memory and cognition. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. October, p. 1–17, 2015.

ZHANG, J. et al. CREB-mediated synaptogenesis and neurogenesis is crucial for the role of 5-HT_{1a} receptors in modulating anxiety behaviors. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–14, 2016c.

ZHOU, J.; CAO, X.; MAR, A. C. Activation of postsynaptic 5-HT 1A receptors improve stress adaptation. **Psychopharmacology**, v. 231, p. 2067–2075, 2014.

APÊNDICE A - ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO

Brazilian Journal of health Review

Is there a relationship between hippocampus-dependent memory and 5-HT_{2a} receptors? Insights from a systematic review

Há uma relação entre a memória hipocampo-dependente e receptores 5-HT_{2a}? Insights de uma revisão sistemática

DOI:10.34119/bjhrv3n2-086

Recebimento dos originais: 09/02/2020

Aceitação para publicação: 26 /03/2020

Rafael Danyllo da Silva Miguel

Mestre em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento

Instituição: Universidade Federal de Alagoas

Endereço: Av. Manoel Severino Barbosa, s/n, Bom Sucesso, Arapiraca-AL

E-mail: rafael.miguel@arapiraca.ufal.br

José Elias Bezerra Barros

Acadêmico de Medicina

Instituição: Universidade Federal de Alagoas – Campus Arapiraca

Endereço: Av. Manoel Severino Barbosa, s/n, Bom Sucesso, Arapiraca-AL

E-mail: jose.bezerra@arapiraca.ufal.br

Gilmar Franca Nobre Junior

Acadêmico de Medicina

Instituição: Universidade Federal de Alagoas – Campus Arapiraca

Endereço: Av. Manoel Severino Barbosa, s/n, Bom Sucesso, Arapiraca-AL

E-mail: gilmar_fnjr@hotmail.com

Isabella Cristinna da Silva Costa

Acadêmico de Medicina

Instituição: Universidade Federal de Alagoas – Campus Arapiraca

Endereço: Av. Manoel Severino Barbosa, s/n, Bom Sucesso, Arapiraca-AL

E-mail: isabellacristinna0895@gmail.com

José Emerson Xavier

Mestre em Morfotecnologia

Instituição: Faculdade Regional da Bahia

Endereço: Rodovia AL 220, 3630 Senador Arnon De Melo - Planalto, Arapiraca - AL

E-mail: joseemersonxavier@gmail.com

Lisiane dos Santos Oliveira

Doutora em Nutrição

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE

E-mail: lisiane.nutricao@yahoo.com

Bruna Del Vechio Koike

Doutora em Psicobiologia, com 2 pós-doutorados.
Instituição: Universidade Federal do Vale do São Francisco
Endereço: Av. José de Sá Maniçoba, S/N - Centro, Petrolina - PE
E-mail: brunadvk@gmail.com

Sandra Lopes de Souza

Doutora em Ciências Morfofuncionais
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE
E-mail: sanlopesufpe@gmail.com

ABSTRACT

This is a systematic review with the aim of analyzing the role of 5-HT_{2A} receptors in hippocampal-dependent memory. In order to do this, we searched the PubMed, Science Direct, and Neuron databases between October 23 and 29, 2018, using the following descriptor combinations: memory, 5-HT_{2A}, and hippocampus, present in the title, abstract, or keywords, with no restrictions on study date or language. Following search and selection, we analyzed risk of bias, and the results were subsequently synthesized according to the experimental model. Out of 40 articles, four were included in qualitative analysis. The data indicate that the 5-HT_{2A} receptors in the hippocampus play an important role in the memory consolidation process, although they do not interfere in the encoding or retrieval processes of these memories. Additionally, chronic use of receptor agonists in models of Alzheimer's disease also demonstrates better performance in the object recognition tests. The action of 5-HT_{2A} receptors has also been shown to be important to aversive memory formation, thus attributing a prominent role to these receptors in hippocampal-dependent memory processes.

Keywords: Memory, Hippocampus, Serotonin, 5-HT_{2A} receptor

RESUMO

Esta é uma revisão sistemática com o objetivo de analisar o papel dos receptores 5-HT_{2A} na memória dependente do hipocampo. Para fazer isso, pesquisamos os bancos de dados PubMed, Science Direct e Neuron entre 23 e 29 de outubro de 2018, usando as seguintes combinações de descritores: memória, 5-HT_{2A} e hipocampo, presentes no título, resumo ou palavras-chave, sem restrições na data ou idioma do estudo. Após a busca e seleção, analisamos o risco de viés e os resultados foram sintetizados posteriormente de acordo com o modelo experimental. Dos 40 artigos, quatro foram incluídos na análise qualitativa. Os dados indicam que os receptores 5-HT_{2A} no hipocampo desempenham um papel importante no processo de consolidação da memória, embora não interfiram nos processos de codificação ou recuperação dessas memórias. Além disso, o uso crônico de agonistas de receptores em modelos da doença de Alzheimer também demonstra melhor desempenho nos testes de reconhecimento de objetos. A ação dos receptores 5-HT_{2A} também demonstrou ser importante para a formação aversiva da memória, atribuindo assim um papel proeminente a esses receptores nos processos de memória dependentes do hipocampo.

Palavras-chave: Memória, Hipocampo, Serotonina, Receptor 5-HT_{2A}

1 INTRODUCTION

For more than 40 years, researchers around the world have studied the brain in order to understand mechanisms related to memory (Kandel 2009). From the beginning, it has been possible to observe the existence of two distinct forms of memory, one which depends primarily on the cerebral cortex (explicit memory) and one which depends on subcortical structures (implicit memory) (see KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014). The hippocampus is one of the main cortical regions related to mechanisms of learning and memory (Cohen et al. 2013). Among the diverse modalities of memory, the ones that most depend on functional integrity of the hippocampus are spatial memory (Bui et al. 2018; Teixeira et al. 2018) and object recognition (Cohen et al. 2013; Hammond, Tull, and Stackman 2004; Zhang et al. 2013). In order to perform these functions, the hippocampus requires interaction of diverse neurotransmitter systems (for review, see PALACIOS-FILARDO; MELLOR, 2019), which include the serotonergic system (Teixeira et al. 2018).

The role of serotonin in associative memory and behavioral sensitization of invertebrates has been firmly established in the literature (Bailey et al. 2000). The means by which this neurotransmitter acts on declarative memory systems in mammals, however, continues to be the focus of diverse studies. Dense serotonergic projections from the raphe nuclei reach the hippocampus (Mokler et al. 1998; Nichols 2012) and inhibit long-term potentiation (LTP), responsible for memory consolidation. Nonetheless, reduced tryptophan or serotonin are associated with cognitive deficiencies observed in patients affected by major depression, and patients recover from these deficiencies following administration of drugs that increase serotonergic signaling (Micheli et al. 2018; Yohn, Gergues, and Samuels 2017). Furthermore, recent studies have shown that optogenetic stimulation of serotonergic terminals in region 1 of Ammon's horn (CA1) promotes improvements in spatial memory and potentiates transmission at CA3-to-CA1 synapses (Teixeira et al. 2018). These findings indicate that the serotonergic system plays an important role in hippocampus-dependent memory, thus making it necessary to identify the main serotonergic neuroreceptors present in the hippocampus in order to comprehend the correlation between their functions and memory.

To date, 14 subtypes of serotonergic receptors, all of which are present in the hippocampus, have been described. One of these receptors is 5-HT_{2A}, a member of the G protein-coupled receptor family, which is distributed mainly in the frontal cortex and the hippocampus (Meneses 2007; Nichols 2012). This receptor is associated with cognition,

decision making, and task performance, and it is involved in psychiatric disorders (ZHANG and STACKMAN JR 2015). The distribution of 5-HT_{2A} receptors in the hippocampus suggests that this receptor may contribute to memory, acting on both pre- and post-synaptic terminals (ZHANG and STACKMAN JR 2015). The true role of 5-HT_{2A} receptors on hippocampus-dependent memory, however, has yet to be analyzed in a systematic review, which is the objective of this study.

2 METHODS

To perform the systematic review, the authors jointly developed a search and selection protocol for articles and chose methods for assessing risk of bias in the included articles. In all of the steps described below, analyses were independently carried out by two researchers (RDSM and JEBB), and the degree of agreement between these researchers was subsequently calculated by kappa coefficient, using IBM SPSS Statistic 21 software. The analyses and elaboration of this study were based on the guidelines provided by The Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA), and the protocol utilized was registered in PROSPERO under n°122117.

2.1 ARTICLE SEARCH AND SELECTION METHODS

Bibliographic searches were carried out between 23 and 29 October 2018 on PubMed, Science Direct, and Neuron, using the following MeSH descriptors: *5-HT_{2A}*, *memory*, and *hippocampus*, present in the title, abstract, or keywords of articles available on the investigated databases. No restrictions were applied regarding study date or language. Following the collection of articles found on the databases and exclusion of duplicate articles, the titles and abstracts were read, in order to select studies that correlated 5-HT_{2A} receptors' function in the hippocampus with their role in memory. To this end, the authors developed a sequence of inclusion and exclusion criteria for analysis.

Firstly, only the following were included: 1- original articles; 2- articles on rodents (rats or mice), given that the distribution and density of receptors vary according to species; 3- articles with a control group, in order to infer better or worse performance due to pharmacological manipulation of the animal model studied; 4- articles that used manipulation of 5-HT_{2A} hippocampal with receptor agonists or antagonists, seeing that the objective of our study was to analyze the function of these receptors in memory. We

excluded articles in which the control group did not receive placebo (saline solution or vehicle) at the moments when the test group received the drug of interest, thus avoiding dubious results owing to potential manipulation of the animals. Finally, we excluded articles in which no memory tests were performed before, during, or after the proposed analyses.

No restrictions were applied regarding the breed of the rats or mice utilized in the articles selected for analysis, provided that they adhered to the aforementioned criteria. Studies that used systematic application of an agonist or antagonist were included only when they performed memory tests and, following euthanasia, conducted some form of analysis of the hippocampus that might correlate performance on the test in question with the functions of 5-HT_{2A} receptors in the hippocampus. Purely morphological studies that did not evaluate the functions of 5-HT_{2A} receptors specifically in the hippocampus were also excluded.

2.2 DATA ANALYZED IN SELECTED ARTICLES

For each article included in this systematic review, the authors investigated the animal species utilized, age at the moment of the experiment, the number of animals per cage, temperature and dietary conditions, type of drug used, drug dose, means of drug administration, and the moment the drug was administered. Furthermore, the authors analyzed the type of memory test applied, as well as each study's objectives, results, and conclusions. For studies that used data referring to investigations related to functions of 5-HT_{2A} receptors in the hippocampus. Additionally, experimental groups whose analyses were not directly focused on functions of 5-HT_{2A} receptors or whose analyses did not relate to the control group were also excluded from the description of results.

2.3 RISK OF BIAS ASSESSMENT FOR SELECTED ARTICLES

To assess risk of bias, the SYstematic Review Center for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE) was utilized. This analyzes 6 different types of bias, namely: 1- selection bias; 2- performance bias; 3- detection bias; 4- attrition bias; 5- reporting bias, and; 6- other biases. For each of the risks analyzed, symbols were attributed to indicate high risk of bias (+), moderate risk of bias (\pm), or low risk of bias (-). As high risk of bias is associated with significant tendencies, the results of these studies cannot be considered definitive.

2.4 SYNTHESIS STRATEGIES

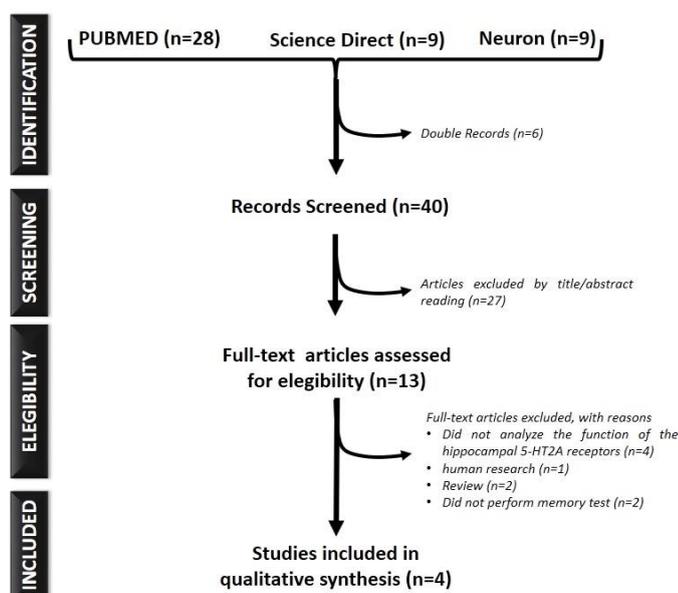
The synthesis of the results obtained was carried according to the homogeneity of the included studies, taking into consideration the animal species, animal age, animal living conditions, drug type, drug dose, means of pharmacological administration, and memory test applied.

3 RESULTS

3.1 ARTICLE SEARCH AND SELECTION

Following the bibliographic search and exclusion of duplicates, 40 articles were found in the sources utilized. However, following selection and analysis of complete texts for eligibility, only four articles were included for qualitative synthesis. A flowchart illustrating each step of the search and inclusion process is represented in **Figure 1**.

Figure 1: Flowchart showing the steps to the article search and inclusion process.



3.2 RISK OF BIAS ASSESSMENT

Risk of bias was assessed, maintaining a significantly relevant ($p > 0.001$) level of agreement between investigators, with a kappa index of 0.686. Risk of bias classification for each article included is summarized in **Table 1**.

Table 1: Risk of bias assessment

	<i>NASEHI et al., 2014</i>	<i>ZHANG et al., 2016</i>	<i>NASEHI et al., 2017</i>	<i>AFSHAR; SHAHIDI, 2018</i>
<i>Selection bias</i>	±	±	-	±
<i>Performance Bias</i>	±	±	±	±
<i>Detection Bias</i>	±	±	±	±
<i>Attrition Bias</i>	±	+	±	±
<i>Reporting Bias</i>	-	-	-	±
<i>Other Bias</i>	-	-	-	±

(+ High risk of bias; ± Unclear risk of bias; – Low risk of bias)

3.3 SYNTHESIS OF INCLUDED ARTICLES

Three of the four articles included for qualitative analysis worked with mice; two used the NMRI breed, and one used the C57BL/6J breed. One study worked with Wistar rats. In the studies with mice models, pharmacological microinfusion was administered directly in CA1, whereas in the rat model the drug was administered via intracerebroventricular (ICV) injection. The study that utilized a Wistar rat model, on the other hand, performed morphological analyses of the hippocampus. As these analyses were correlated with the behavioral results obtained, however, these results are considered in the discussions. The general characteristics of the animal models utilized and information regarding the drugs administered are summarized in **Table 2**.

Table 2: Main descriptions of animal model and experimental study design

CITATION	SPECIES	AGE	SUBSTANCE/DOSE	PHARMACOLOGICAL MANIPULATION
ZHANG, 2016	Mice C57BL/6J	8-12 weeks	TCB-2 ¹ (1.0 mg/kg i.p. or 1.0µg/0.5µl in CA1) MDL 11.939 ² (0.5mg/kg, i.p)	1. TCB-2 or vehicle was administered i.p. among the groups: - 20 min before the sample session - right after the sample session - 20 min before the test session The test was done 24h after the sample session. This design yielded the following groups: C1: Vehicle/Vehicle/Vehicle T1: TCB-2/Vehicle/Vehicle T2: Vehicle/TCB-2/Vehicle T3: Vehicle/Vehicle/TCB-2 2. MDL administration produced a new group: T4: MDL + TCB-2 right after the sample, 10 minutes before TCB-2 administration 3. In order to evaluate the TCB-2 effect directly in CA1: T5: TCB-2 in CA1. C2: Cerebrospinal fluid in CA1.
NASEHI ET AL., 2017	Mice NMRI	5-8 weeks	Agonist (α -methyl 5-HT [5-HT2A, B e C]) or Antagonist (Cinancerine [5-HT2]) in CA1: 0.5, 5.0 e 50 ng/ mice.	The agonist or antagonist administration was performed before the inhibitory avoidance test session (first day). T1-T3 groups received increasing doses of the agonist, while T4-T6 groups received the antagonist increasing doses. The control groups C1 (agonist's control) and C2 (antagonist's control) received saline solution.
NASEHI ET AL., 2014	Mice NMRI	5-8 weeks	Agonist (α -methyl 5-HT) or Antagonist (Cinancerine) CA1 microinfusion: 0.005, 0.05 e 5ng/mice.	The agonist or antagonist administration was performed before the inhibitory avoidance test session (first day). T1-T3 groups received increasing doses of the agonist, while T4-T6 groups received the antagonist increasing doses. The control groups C1 (agonist's control) and C2 (antagonist's control) received saline solution.
AFSHAR ET AL., 2018	Wistar rats	Non informed	C1: Streptozotocin ³ (3.0 mg/kg, 10µl, i.c.v.) T1: TCB-2 (5µg/1 µl, i.c.v.)	In this study, the researchers analyzed the role of TCB-2 agonist in the memory of animals models for Alzheimer's disease (AD) induced by streptozotocin. In C1 group, AD was induced, and in T1 group, in addition to streptozotocin, TCB-2 was administered to test memory and the to evaluate the number of intact hippocampal neurons.

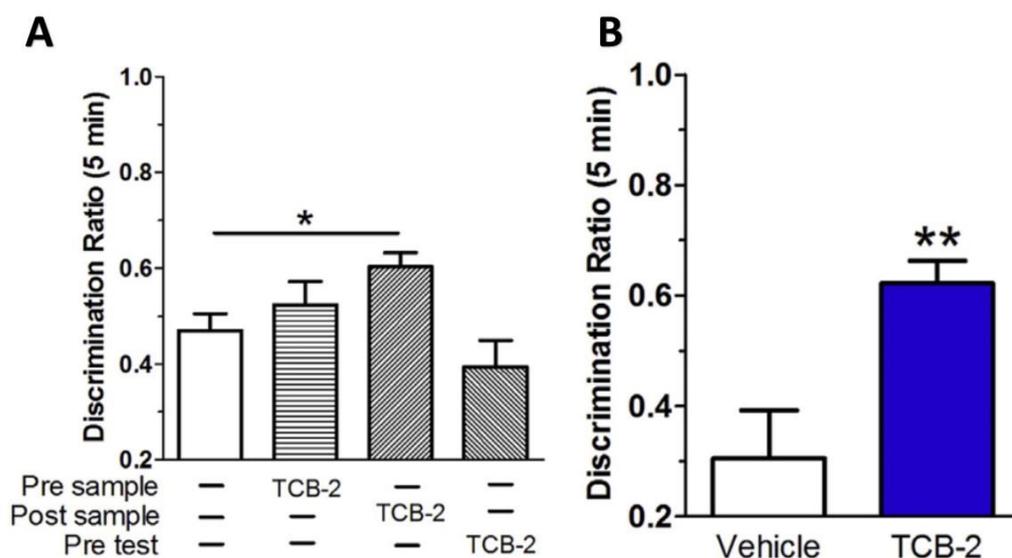
¹ TCB-2 ((7R)-3-bromo-2,5-dimethoxy-bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-trien-7yl)² MDL (α -Phenyl-1-(2-phenylethyl)-4-piperidinemethanol)³Streptozotocin

3.4 THE ROLE OF 5-HT_{2A} RECEPTORS IN THE ENCODING, CONSOLIDATION, AND RETRIEVAL PHASES OF OBJECT MEMORY

To identify the roll of 5-HT_{2A} receptor activation in encoding, consolidation, and retrieval processes of object memory, Zhang and collaborators (2016) organized four experimental groups (Zhang, Cinalli, Cohen, Knapp, Rios, Martínez-Hernández, et al. 2016). These groups received three intraperitoneal injections of either a 5-HT_{2A} receptor agonist (TCB-2) or a vehicle; the injections were administered before a novel object recognition (NOR) training session, immediately after the training session, and before the test session, forming the following four groups: I. control group (vehicle/vehicle/vehicle); II. experimental group 1 (TCB-2/vehicle/vehicle); III. experimental group 2 (vehicle/TCB-2/), and; IV. experimental group 3 (vehicle/vehicle/TCB-2), in order to analyze the processes of encoding, consolidation, and retrieval, respectively.

The results of this study indicated that only administration of the agonist immediately after the training session improved performance on the object recognition memory test, in comparison with the control, which received only the vehicle (**Figure 2A**). Given that administration of the drug was systemic, however, it would not be possible to affirm that the results obtained were truly due to activation of 5-HT_{2A} receptors in the hippocampus. For this reason, another experiment was conducted, wherein a cannula was inserted into the CA1 field of the hippocampus, infusing the vehicle (0.5 µl, n = 7) or TCB-2 (1.0 µg/0.5 µl, n = 8), immediately after the training session. This experiment verified that activation of 5-HT_{2A} receptors in the hippocampus was, in fact, related to better performance on the NOR test (**Figure 2B**). These data suggest that 5-HT_{2A} receptor activation in the CA1 field of the hippocampus plays an important role in the process of memory consolidation, although it did not alter encoding and retrieval processes (Zhang, Cinalli, Cohen, Knapp, Rios, Martínez-Hernández, et al. 2016).

Figure 2: Systemic or local intrahippocampal administration of TCB-2 enhances consolidation of novel object memory. (A) Mice received TCB-2 before the sample session (TCB-2 + vehicle + vehicle, $n = 10$), immediately after the sample session (vehicle + TCB-2 + vehicle, $n = 12$), or before the test session (vehicle + vehicle + TCB-2, $n = 10$), which occurred 24 h later, to test object encoding, consolidation, and retrieval, respectively. Mice treated with TCB-2 after the sample session demonstrated stronger preference in new object recognition during the test session than the vehicle-treated mice (vehicle + vehicle + vehicle, $n = 10$), as measured by the discrimination ratio scores ($p < 0.05$). (B) Mice that received bilateral microinfusion of TCB-2 ($1.0 \mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$, $n = 8$) into the CA1 region exhibited enhanced performance during the test session, in comparison with mice that received intra-CA1 artificial cerebrospinal fluid ($0.5 \mu\text{l}$, $n = 7$). Adapted from ZHANG et al., 2016.



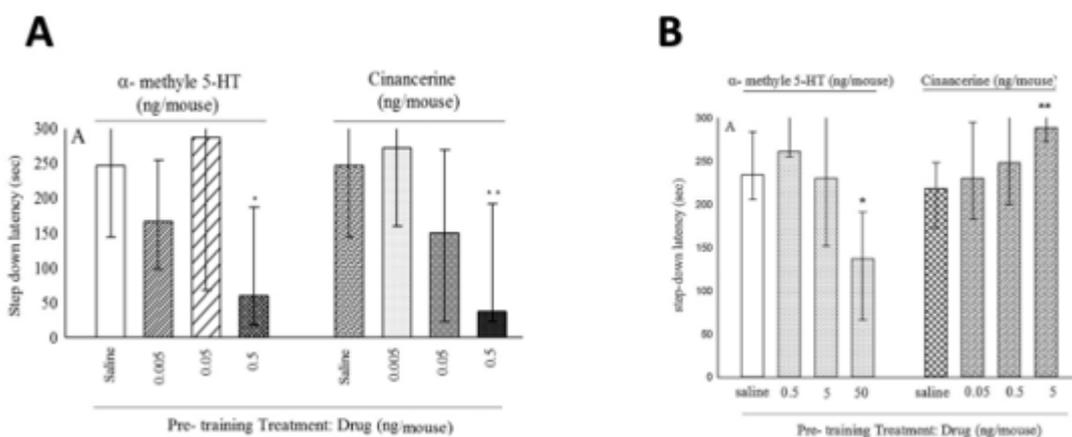
A longer protocol, in which ICV administration of TCB-2 ($5 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$) was carried out for 30 days preceding the memory test, also verified the benefits of 5-HT_{2A} receptor activation for improving performance on object recognition tests (Afshar et al. 2018). This study, however, utilized Wistar rat models with Alzheimer's disease (AD) (induced by streptozotocin 3.0 mg/kg , $10 \mu\text{l}$, ICV). In this experiment, the discrimination index in the NOR test was shown to improve in animals with AD that received TCB-2, in comparison with animals in the control group (AD + vehicle). Although this study used ICV injection, it verified the effects that this means of administration promoted with regards to survival of hippocampal neurons. They verified that ICV administration of TCB-2 promotes better neuron survival in the CA1 field of the hippocampus in rats, suggesting that 5-HT_{2A} receptor activation may improve memory via its neuroprotective action.

3.5 THE ROLE OF 5-HT_{2A} IN AVERSIVE MEMORY

Two of the four articles included performed an inhibitory avoidance test (IAT). In both articles, intrahippocampal administration of agonists, antagonists, or saline solution occurred five minutes before the training session (Nasehi et al. 2014, 2017). In the study performed in 2014, the agonist utilized was α -methyl 5-HT in concentrations of 0.005, 0.05, and 0.5 ng/mouse). This drug is a 5-HT_{2A/2B/2C} receptor agonist. Cinancerine, which acts as a 5-HT₂ receptor antagonist, was used in increasing concentrations of 0.005, 0.05, and 0.5 ng/mouse (Nasehi et al. 2014). In the 2017 article, the authors carried out an analysis using higher doses of the same agonists and antagonists administered in the previous study. The agonist concentrations were 0.5, 5.0, and 50 ng/mouse, and the antagonist concentrations were 0.05, 0.5, and 5.0 ng/mouse (Nasehi et al. 2017).

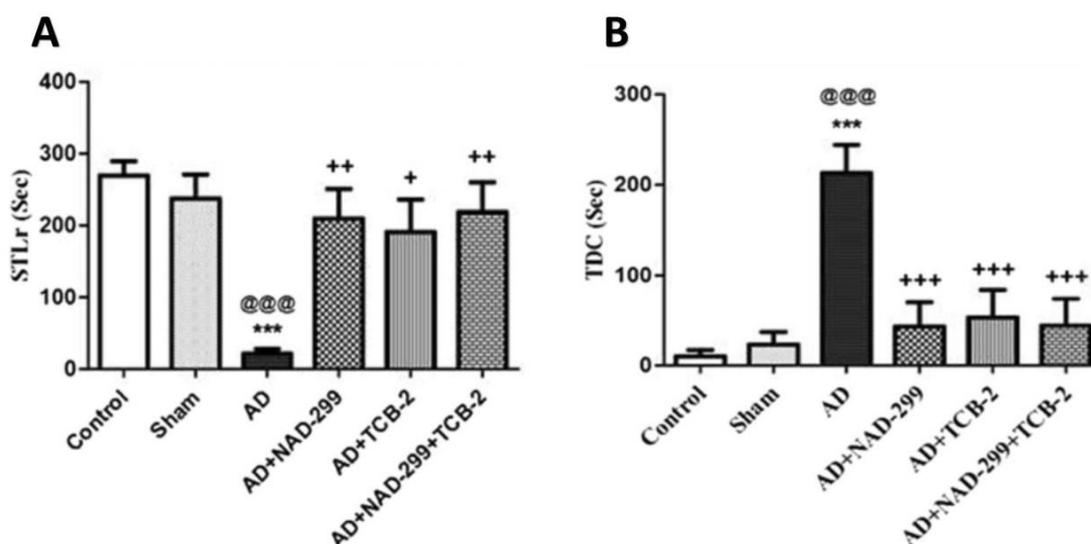
Both studies found shorter latency periods, following the highest dose of α -methyl 5-HT, suggesting that activation of 5-HT₂ receptors in the hippocampus before an aversive event impairs the aversive memory encoding process (**Figure 3**) (NASEHI et al., 2014, 2017). With cinancerine, however, they found that doses of 0.5 ng/mouse showed detrimental effects on aversive memory encoding (Nasehi et al. 2014) (**Figure 3A**). Doses of 5ng/mouse, however, showed beneficial effects on the retention of this type of memory (Nasehi et al. 2017) (**Figure 3B**).

Figure 3: The latency period of the step-down test. (A) The graphs exhibit the effects of pre-training administration of α -methyl 5-HT (left, 0.5, 5 and 50 ng/mouse) and cinancerine (right, 0.05, 0.5, and 5 ng/mouse) on memory acquisition. (B) The effects of pre-training administration of α -methyl 5-HT (left, 0.005, 0.05, and 0.5 ng/mouse) and cinancerine (right, 0.005, 0.05, and 0.5 ng/mouse) on memory acquisition. Each bar is the mean \pm standard error of the mean *p < 0.05 and **p < 0.01 when compared to saline/saline group (Adapted from NASEHI et al., 2014, 2017).



In the passive avoidance learning (PAL) task, it was found that animals with AD that were treated with TCB-2 had longer latency times to enter the dark compartment during the test session (**Figure 4A**). Moreover, these animals remained less time in the dark compartment, in comparison with animals with AD alone (**Figure 4B**) (Afshar et al. 2018). These data indicate that, in addition to participating in mechanisms of object recognition memory, 5-HT_{2A} receptors are also related to aversive memory. However, given that, in this study, TCB-2 was administered via ICV injection, the correlations between receptor action and memory can only be inferred when correlated to hippocampal neuron survival.

Figure 4: Activity of serotonergic receptors on aversive memory in mice. (A) Step-through latency during the retention trial (STLr). (B) Time spent in the dark compartment during the retention trial (TDC). Data are expressed as means \pm standard error of the mean (n = 9 per group). Comparisons were made with a one-way ANOVA, which was followed by a post hoc Tukey test. ***p < 0.001 as compared with the control group. @@p < 0.001 when compared with the sham group. +p < 0.05; ++p < 0.01; +++p < 0.001 compared to AD group.



4 DISCUSSIONS

The 5-HT_{2A} receptors are G protein-coupled receptors, which, when activated, promote increased phospholipase C action, thus promoting greater calcium concentrations in the cytoplasmic compartment (Hagberg et al. 1998; Parrish et al. 2005). They are widely distributed throughout the central nervous system, showing an increased density in the frontal cortex and the hippocampus (ZHANG and STACKMAN JR 2015). Although they are strongly associated with psychiatric alterations, evidence has shown that these receptors

may be related to memory processes (see ZHANG and STACKMAN, 2015), given that gene polymorphisms in these receptors (HTR2A) are associated with cognitive deficiencies (Sigmund et al. 2008; Zhu et al. 2013). In CA1, it is possible to identify the presence of 5-HT2A receptors in the plasma membrane, dendrites, and dendritic spines (ZHANG et al., 2016), and they are colocalized with NMDA glutamatergic receptors (Peddie et al. 2008). Furthermore, immunoparticles for the 5-HT2A receptors have also been observed in pre-synaptic terminals of excitatory synapses with dendrites of CA1 pyramidal cells (ZHANG et al., 2016).

To analyze the effects of these receptors, it is possible to utilize one of their agonists. There are several agonists for 5-HT2A receptors, all of which have different physical-chemical properties and specificities (Nichols 2012; Parrish et al. 2005). Of these agonists, ([4-Bromo-3,6-dimethoxybenzocyclobuten-1-yl] methylamine hydrobromide), known as TCB-2, exhibits a high affinity with 5-HT2A receptors (Zhang et al. 2013). In the analyzed studies that utilized TCB-2, this agonist was observed to promote benefits for the object memory consolidation processes, both in normal mice (Zhang, Cinalli, Cohen, Knapp, Rios, and Stackman 2016) and in rat models of AD (Afshar et al. 2018). Both studies correlated the object recognition test (Bui et al. 2018; Cohen et al. 2013) with the action of 5-HT2A receptors, using TCB-2.

In CA1, serotonin promotes increased cellular excitability, given that it inhibits potassium channels and promotes activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, facilitating LTP (Cai et al. 2013; Celada, Puig, and Artigas 2013; Teixeira et al. 2018). On the other hand, the serotonin released in CA3 inhibits LTP or long-term depression (LTD), promoted by the mossy fibers of the dentate gyrus (Twarkowski, Hagen, and Manahan-vanhan 2016). In the study by Zhang and collaborators (2016), the agonist was administered with the assistance of a cannula directly inserted into CA1 (Zhang, Cinalli, Cohen, Knapp, Rios, and Stackman 2016).

Optogenetic analyses have shown the presence of serotonergic fibers in the stratum radiatum and the stratum lacunosum-moleculare of the hippocampus, and they indicate that the photorelease of serotonin in CA1 increases excitability of pyramidal cells to stimuli from the Schaffer collaterals, although it did not increase the response to stimuli coming from the entorhinal cortex via the perforant path (Teixeira et al. 2018). In this manner, knowing that object memory depends on the hippocampus (Bui et al. 2018; Cohen et al. 2013) and that serotonin increases neural excitability to stimuli coming from the Schaffer collaterals

(Teixeira et al. 2018), it is probable that the benefits in memory consolidation observed in the study by Zhang and collaborators (2016) is due to the increase in this excitability promoted by serotonin.

In addition to the increased excitability of pyramidal cells in CA1, the activation of 5-HT_{2A} receptors further promotes a transitory increase in dendritic spine genesis (Yoshida et al. 2011), as well as greater expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) (Vaidya et al. 1997). BDNF is a neurostimulating substance that promotes neurogenesis in the hippocampus (Cameron, Hazel, and McKay 1998). Due to this, chronic use of the agonist TCB-2 increased release of BDNF in the AD model, which both improved discrimination index and increased hippocampal neuron survival (Afshar et al. 2018). These findings indicate that the stimulation of 5-HT_{2A} receptors in CA1 is important for object recognition memory. However, with respect to aversive memory, these receptors play another role.

Three studies analyzed aversive memory using different methods. In the studies by NASEHI (2014 and 2017), the effects of 5-HT_{2A/2B/2C} receptor activation were analyzed via administration of the agonist α -methyl 5-HT and the antagonist cinancerine (5-HT₂). As stated in the results, they verified that the administration of 0.5 ng/mouse of the agonist induced detriments to memory, showing a shorter latency time on the IAT (NASEHI et al., 2014). This result, however, was not repeated with a similar dose in the same animal model in subsequent studies, and it was only expressive with a dose of 50 ng/mouse (NASEHI et al., 2017).

Another point of divergence between these two studies was observed in the administration of the antagonist cinancerine, regarding latency time on the IAT. Whereas, in the first study, the dose of 0.5 ng/mouse induced shortened latency time (NASEHI et al., 2014), it did not promote any differences in the subsequent study when applied at the same dose (NASEHI et al., 2017). On the other hand, when cinancerine was administered at a dose of 5 ng/mouse, there was an increase in latency time, indicating an improvement in the aversive memory encoding process following previous use of this drug (NASEHI et al., 2017). This result is in opposition to the one obtained by the administration of the same drug at a dose of 0.5 ng/mouse in the prior study (NASEHI 2014). Notwithstanding these points of divergence, these two studies featured no differences regarding experimental model applied, age, living conditions, number of animals per group, memory tests, or other experimental procedures; the only difference was the concentrations of the drugs

administered. In this manner, there remains only one noncontroversial study that verified the function of 5-HT_{2A} receptors in aversive memory.

Afshar and collaborators (2018) verified that chronic administration of TCB-2 (5µg/1 µl, ICV) promoted benefits to aversive memory on the PAL test in animals with AD (Afshar et al. 2018). This benefit may be observed during the retention test, and in the experimental session carried out 24 hours later, where the animals exhibited increased time spent in the dark compartment. It is, however, necessary for studies utilizing intrahippocampal injections of TCB-2 to be carried out in order to infer whether this observation is due to specific activation of 5-HT_{2A} receptors present in the hippocampus.

Another point that deserves to be highlighted is that, in all the articles listed, there was a high level of unclear bias, especially with respect to performance, detection, and attrition. In animal studies, cages are not routinely stored in the animal room or vivarium in a random fashion (Kilkenny et al. 2009). Random allocation of animals is necessary in order to avoid situations where, for reasons of convenience, a given experimental group may be allocated to positions where environmental conditions are different than those provided in other positions. This is very relevant with respect to the serotonergic system, given that differences in environmental temperature and light may lead to alterations in the release of this neurotransmitter (Novotná and Janský 1976). Furthermore, in their texts, few articles using animal models specify whether the animal caregivers and the researchers carried out the analysis blindly with respect to the interventions applied to each experimental group, which implies a detection bias.

For this reason, this study highlights that even though 5-HT_{2A} receptors in the hippocampus are strongly associated with benefits to object recognition memory and aversive memory in PAL, it is necessary that further studies are conducted on this theme, thus minimizing risks of bias.

5 CONCLUSIONS

Activation of 5-HT_{2A} receptors in the hippocampus promotes improved performance in object recognition tests and improves aversive memory encoding processes in PAL. However, concerning analysis of aversive memory using the IAT, data were not conclusive. For this reason, it is not possible to infer whether the activation of these receptors promotes better or worse performance on this test.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

- Afshar, Simin et al. 2018. "The Effect of NAD-299 and TCB-2 on Learning and Memory , Hippocampal BDNF Levels and Amyloid Plaques in Streptozotocin-Induced Memory Deficits in Male Rats." *Psychopharmacology* 235: 2809–22.
- Bailey, Craig H et al. 2000. "Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing hebbian plasticity and memory ?" 1(October): 1–10.
- Bui, Anh D et al. 2018. "Dentate Gyrus Mossy Cells Control Spontaneous Convulsive Seizures and Spacial Memory." *Neuroscience* 359(February): 787–90.
- Cai, Xiang et al. 2013. "Local Potentiation of Excitatory Synapses by Serotonin and Its Alteration in Rodent Models of Depression." *Nature Publishing Group* 16(4): 464–72. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3355>.
- Cameron, HA, TG Hazel, and RD Mckay. 1998. "Regulation of Neurogenesis by Growth Factors and Neurotransmitters." *Journal of Neurobiology* 36(2): 287–306.
- Celada, Pau, M Victoria Puig, and Francesc Artigas. 2013. "Serotonin Modulation of Cortical Neurons and Networks." 7(April): 1–20.
- Cohen, Sarah J et al. 2013. "The Rodent Hippocampus Is Essential for Nonspatial Object Memory." *Current Biology* 23(September): 1685–90.
- Hagberg, Gul-Britt et al. 1998. "Stimulation of 5-HT 2A Receptors on Astrocytes in Primary Culture Opens Voltage-Independent Ca²⁺ Channels." *Neurochemistry international* 32: 153–62.
- Hammond, Rebecca S, Laura E Tull, and Robert W Stackman. 2004. "On the Delay-Dependent Involvement of the Hippocampus in Object Recognition Memory." *Neurobiology of Learning and Memory* 82(April): 26–34.
- Kandel, Eric R. 2009. "The Biology of Memory : A Forty-Year Perspective." *The journal of neuroscience* 29(41): 12748–56.
- Kandel, Eric R, Yadin Dudai, and Mark R Mayford. 2014. "Review The Molecular and Systems Biology of Memory." *Cell* 157(1): 163–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>.

- Kilkenny, Carol et al. 2009. "Survey of the Quality of Experimental Design , Statistical Analysis and Reporting of Research Using Animals." *Plos onde* 4(11).
- Meneses, Alfredo. 2007. "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." *Behavioural Brain Research* 184(june): 81–90.
- Micheli, Laura, Manuela Ceccarelli, Giorgio D Andrea, and Felice Tirone. 2018. "Depression and Adult Neurogenesis : Positive Effects of the Antidepressant Fluoxetine and of Physical Exercise." *Brain Research Bulletin* 143(September): 181–93. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.09.002>.
- Mokler, David J et al. 1998. "Serotonin Neuronal Release From Dorsal Hippocampus Following Electrical Stimulation of the Dorsal and Median Raphe ´ Nuclei in Conscious Rats." *Hippocampus* 273(8): 262–73.
- Nasehi, Mohammad, Fatemeh Ghadimi, Fatemeh Khakpai, and Mohammad-reza Zarrindast. 2017. "Interaction between Harmane, a Class of β -Carboline Alkaloids, and the CA1 Serotonergic System in Modulation of Memory Acquisition." *Neuroscience Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2017.03.011>.
- Nasehi, Mohammad, Mehdi Jamshidi-mehr, Fatemeh Khakpai, and Mohammad-reza Zarrindast. 2014. "Possible Involvement of CA1 5-HT1B/1D and 5-HT2A/2B/2C Receptors in Harmaline-Induced Amnesia." *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* (2013): 1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2014.08.007>.
- Nichols, David E. 2012. "Structure – Activity Relationships of Serotonin 5-HT 2A Agonists." *Advanced Review* 1(October): 559–79.
- Novotná, R, and L Janský. 1976. "Effect of Different Environmental Temperatures on the Serotonin Concentration and Turnover in the Brain Stem of a Hibernator." *Physiol Bohemoslov*. 25(1).
- Palacios-filardo, Jon, and Jack R Mellor. 2019. "Neuromodulation of Hippocampal Long-Term Synaptic Plasticity." *Current Opinion in Neurobiology* 54: 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.08.009>.
- Parrish, Jason C, Michael R Braden, Emily Gundy, and David E Nichols. 2005. "Differential Phospholipase C Activation by Phenylalkylamine Serotonin 5-HT 2A Receptor Agonists." *Journal of Neurochemistry* 95(july): 1575–84.
- Peddie, C J et al. 2008. "Colocalisation of Serotonin 2A Receptors with the Glutamate Receptor Subunits NR1 and GluR2 in the Dentate Gyrus : An Ultrastructural Study of a

Modulatory Role ☆.” 211: 561–73.

Sigmund, Jessica C et al. 2008. “Fine-Mapping at the HTR2A Locus Reveals Multiple Episodic Memory-Related Variants.” *Biological psychology* 79: 239–42.

Teixeira, Catia M et al. 2018. “Hippocampal 5-HT Input Regulates Memory Formation and Schaffer Collateral Excitation.” *Neuron* 98(june): 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.030>.

Twarkowski, Hannah, Hardy Hagen, and Denise Manahan-vaughan. 2016. “The 5-Hydroxytryptamine 4 Receptor Enables Differentiation of Informational Content and Encoding in the Hippocampus.” 891(September 2015): 875–91.

Vaidya, Vidita A, Gerard J Marek, George K Aghajanian, and Ronald S Duman. 1997. “5-HT 2A Receptor-Mediated Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA in the Hippocampus and the Neocortex.” 17(8): 2785–95.

Yohn, Christine N., Mark M. Gergues, and Benjamin Adam Samuels. 2017. “The Role of 5-HT Receptors in Depression Tim Bliss.” *Molecular Brain* 10(1): 1–12.

Yoshida, Hiroyuki et al. 2011. “Subtype Specific Roles of Serotonin Receptors in the Spine Formation of Cortical Neurons in Vitro.” *Neuroscience Research* 71(3): 311–14.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2011.07.1824>.

Zhang, Gongliang et al. 2013. “Stimulation of Serotonin 2A Receptors Facilitates Consolidation and Extinction of Fear Memory in C57BL / 6J Mice.” *Neuropharmacology* 64: 403–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.007>.

Zhang, Gongliang, David Cinalli, Sarah J. Cohen, Kristina D. Knapp, Lisa M. Rios, José Martínez-Hernández, et al. 2016. “Examination of the Hippocampal Contribution to Serotonin 5-HT_{2A} Receptor-Mediated Facilitation of Object Memory in C57BL/6J Mice.” *Neuropharmacology* 109: 332–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.04.033>.

Zhang, Gongliang, David Cinalli, Sarah J Cohen, Kristina D Knapp, Lisa M Rios, and Robert W Stackman. 2016. “Examination of the Hippocampal Contribution to Serotonin 5-HT 2A Receptor-Mediated Facilitation of Object Memory in C57BL / 6J Mice.” *Neuropharmacology* 109: 332–40.

ZHANG, GONGLIANG, and ROBERT W. STACKMAN JR. 2015. “The Role of Serotonin 5-HT 2A Receptors in Memory and Cognition.” *Frontiers in Pharmacology* 6(October): 1–17.

Zhu, Bi et al. 2013. “Neurobiology of Learning and Memory True but Not False Memories Are Associated with the HTR2A Gene.” *Neurobiology of Learning and Memory* 106: 204–

9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2013.09.004>.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Recife, 04 de julho de 2018

Ofício nº 53/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Sandra Lopes de Souza**
Departamento de Anatomia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0020/2018

Certificamos que a proposta intitulada "**Desmame precoce e comportamento alimentar: um estudo do sistema serotoninérgico.**", Registrada com o nº 0020/2018 sob a responsabilidade de **Prof.ª Sandra Lopes de Souza** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 04/07/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/06/2018 a 06/06/2021
Espécie/inhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	78
Peso/Idade	Macho 250-300g/180 dias e Femea 200g/120 dias
Sexo	Macho (10) e Femea (68)
Origem	Departamento de Nutrição - UFPE

Atenciosamente,



Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691