



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

MANUELLA DA LUZ DUARTE BARROS

**INIBIÇÃO NEONATAL DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA: exposição
perinatal a dieta hiperlipídica/hipercalórica e resposta a agonistas
serotoninérgicos**

Recife
2019

MANUELLA DA LUZ DUARTE BARROS

**INIBIÇÃO NEONATAL DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA: exposição
perinatal a dieta hiperlipídica/hipercalórica e resposta a agonistas
serotoninérgicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Orientador (a): Dr. Raul Manhães de Castro

Co-Orientadores: Dra. Lígia Cristina Monteiro Galindo; Dr. Omar Guzmán-Quevedo.

Recife
2019

Ficha catalográfica elaborada pelo
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

B277i	Barros, Manuella da Luz Duarte Inibição neonatal da recaptação de serotonina : exposição perinatal a dieta hiperlipídica/hipercalórica e resposta a agonistas serotoninérgicos / Manuella da Luz Duarte Barros. – 2019. 106 f. : il. Orientador : Raul Manhães de Castro. Co-orientadora : Ligia Cristina Monteiro Galindo. Co-orientador : Omar Guzman Quevedo. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2019. Inclui referências, apêndice e anexos. 1. Serotonina. 2. Adaptação Fisiológica. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Dieta hipercalórica. 5. Desenvolvimento somático. 6. Balanço energético. I. Castro, Raul Manhães de (Orientador). II. Galindo, Ligia Cristina Monteiro (Co-orientadora). III. Quevedo, Omar Guzman (Co-orientador). IV. Título. 612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2021-211)
-------	--

MANUELLA DA LUZ DUARTE BARROS

**INIBIÇÃO NEONATAL DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA: exposição
perinatal a dieta hiperlipídica/hipercalórica e resposta a agonistas
serotoninérgicos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Aprovada em: 26/11/2019.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Sandra Lopes de Souza (Departamento de Anatomia, UFPE)

Dra. Lígia Cristina Monteiro Galindo (Departamento de Anatomia, UFPE)

Dra. Raquel da Silva Aragão (Centro Acadêmico de Vitória, UFPE)

Dra. Kelli Nogueira Ferraz-Pereira Althoff (Centro Acadêmico de Vitória, UFPE)

Dra. Gisélia de Santana Muniz (Departamento de Nutrição, UFPE)

Dedico este trabalho a minha avó, Nair Souza da Luz, e a todos os meus antepassados e ancestrais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aos meus guias e protetores que me deram forças para concluir este trabalho.

A minha querida mãe e ao meu querido pai por todo amor, dedicação, criação... Pela moral e ética que me ensinaram que de tão forte foi inabalável apesar de todas as provas que passei ao longo desse caminho acadêmico. Agradeço também ao meu irmão pela calma e ternura.

Aos animais que fizeram parte de meus experimentos todo o meu amor e respeito. Essas vidas são sagradas e todos os pesquisadores deveriam entender isso ao pé da letra e por em prática...

Aos meus orientadores Raul Manhães de Castro e Lígia Cristina Monteiro Galindo, eu agradeço por ter realizado todas as condições necessárias para este trabalho.

Aos meus colegas de laboratório que sempre me ajudaram tanto profissionalmente quanto emocionalmente nesta caminhada. Em especial, eu agradeço a Diego Lacerda, mais que um colega, um amigo.

RESUMO

A exposição a dietas hiperlipídicas e hipercalóricas (DHH) vem sendo associada à obesidade e síndrome metabólica. Por outro lado, o aumento da disponibilidade de serotonina no período neonatal parece induzir um “*lean phenotype*”. O objetivo desta tese foi investigar adaptações fenotípicas no sistema serotoninérgico e na regulação hipotalâmica do balanço energético em ratos em resposta à inibição neonatal da recaptação de serotonina (INRS) e à exposição materna a uma DHH durante a gestação e lactação. No experimento 1, Ratas Wistar foram alimentadas com ração padrão de biotério ou com uma DHH desde a adaptação para o acasalamento até o desmame. Cada ninhada foi tratada com solução salina e fluoxetina do 1º ao 21º dia pós-natal. Desfechos relacionados ao desenvolvimento somático, balanço energético e indicadores do metabolismo foram avaliados na prole jovem. No experimento 2, as ninhadas foram submetidas apenas à intervenção farmacológica, semelhante ao experimento 1. Na vida adulta, a prole foi submetida à estereotaxia. O comportamento alimentar e a atividade neuronal no núcleo arqueado do hipotálamo foram avaliados após recuperação cirúrgica e injeção intracerebroventricular de agonistas dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B}. Observou-se que a INRS aumenta a sensibilidade das respostas associadas aos receptores 5-HT_{2C}. Frente à exposição perinatal a DHH, houve modificação do desenvolvimento somático e do metabolismo energético sem alterações no comportamento alimentar. Por fim, a INRS pode reverter ou atenuar alguns efeitos de uma DHH sobre o metabolismo energético.

Palavras-chave: Serotonina. Plasticidade fenotípica. Desenvolvimento somático. Balanço energético. Dieta hiperlipídica e hipercalórica.

ABSTRACT

Perinatal exposure to hyperlipidic and hypercaloric diets (DHH) has been associated with obesity and metabolic syndrome. On the other hand, the increased availability of serotonin in the neonatal period seems to induce a "*lean phenotype*". The aim of this research was to investigate phenotypic adaptations in the serotonergic system and hypothalamic control of energy balance in rats in response to neonatal serotonin reuptake inhibition (NSRI) and maternal exposure to a DHH during pregnancy and lactation. In experiment 1, *Wistar* rats were fed a standard diet or DHH from a mating adaptation to weaning. Each litter was treated with saline and fluoxetine from the 1st to the 21st postnatal day. Changes related to somatic development, energy balance and metabolism indicators were reduced in young offspring. In experiment 2, litters were only subjected to pharmacological intervention, similar to experiment 1. In adulthood, animals were submitted to stereotaxis. Feeding behavior and neuronal activity in the hypothalamus nucleus were evaluated after surgical recovery and intracerebroventricular injection of 5-HT_{2C} or 5-HT_{1B} receptor agonists. It was observed that INRS increases the sensitivity of 5-HT_{2C} receptor-related responses. Related to perinatal exposure to DHH, there were changes in somatic development and energy metabolism without changes in eating behavior. Finally, NSRI may reverse or attenuate some effects of a DHH on energy metabolism.

Keywords: Serotonin. Developmental plasticity. Energy metabolism. Somatic development. Hyperlipid and hypercaloric diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organograma dos grupos experimentais 1.	47
Figura 2 - Desenho experimental 1.	48
Figura 3 - Organograma dos grupos experimentais 2.	55
Figura 4 - Desenho experimental 2.	56
Figura 5 - Cirurgia de Estereotaxia.....	57
Figura 6 - (A) Peso corporal neonatal (1°-21° DPN) e (B) no 30° DPN.....	59
Figura 7 - Consumo alimentar diário (CAD) do 29° ao 32° DPN.....	63
Figura 8 - Consumo alimentar na Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) no 32° DPN.	63
Figura 9 - (A) Gasto energético total, (B) velocidade média, (C) distância total e (D) real no campo aberto no 28° DPN.....	64
Figura 10 - (A) Temperatura corporal e (B) peso relativo do tecido adiposo marrom (TAM) no 30° DPN.	65
Figura 11 - (A) Curva glicêmica e (B) “area under the curve” no 29° DPN.....	66
Figura 12 - (A) Peso corporal neonatal (1°-21° DPN) e (B) no 90° DPN.....	67
Figura 13 - Consumo alimentar (g/g)*100 durante a sequência comportamental de saciedade (SCS).	68
Figura 14 - (A e B) Tempos de alimentação, (C e D) limpeza e (E e F) descanso (segundos) durante a sequência comportamental de saciedade (SCS).	70
Figura 15 - Ponto de saciedade durante a sequência comportamental de saciedade (SCS).	71
Figura 16 - Ponto de saciedade durante a sequência comportamental de saciedade (SCS).	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal da dieta experimental hiperlipídica e hipercalórica.	46
Tabela 2 - Composição percentual de macronutrientes da dieta hiperlipídica e hipercalórica segundo o Valor Energético Total (VET).....	46
Tabela 3 - Medidas murinométricas no 2°, 7°, 14°, 21° e 30° DPN.....	62
Tabela 4 - Peso relativo de coxins tecido adiposo branco e órgãos no 30° DPN.....	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	PLASTICIDADE FENOTÍPICA	17
2.2	TRANSIÇÃO NUTRICIONAL	20
2.3	CONSUMO MATERNO DE DIETA HIPERLIPÍDICA NA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO: CONSEQUÊNCIAS EM CURTO E LONGO PRAZO SOBRE O BALANÇO ENERGÉTICO E METABOLISMO DOS DESCENDENTES	24
2.4	SISTEMA DE NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA: NEURODESENVOLVIMENTO E REGULAÇÃO HIPOTALÂMICA DO BALANÇO ENERGÉTICO E METABOLISMO	30
2.4.1	Serotonina e Neurodesenvolvimento	30
2.4.2	Serotonina e Balanço Energético via Arc no Hipotálamo	32
2.5	ALTERAÇÕES NO SISTEMA SEROTONINÉRGICO CENTRAL: RELAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO PERINATAL A DIETAS HIPERLIPÍDICAS E OS DISTÚRBIOS METABÓLICOS E NO BALANÇO ENERGÉTICO	36
2.6	REPERCUSSÕES PRECOSES E TARDIAS DA INIBIÇÃO NEONATAL DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA SOBRE O BALANÇO ENERGÉTICO E PERFIL METABÓLICO DA PROLE	39
3	JUSTIFICATIVA	41
4	HIPÓTESE	43
5	OBJETIVOS	44
5.1	OBJETIVO GERAL	44
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
6	MÉTODO	45
6.1	ANIMAIS	45
6.2	EXPERIMENTO 1	45
6.2.1	Peso corporal	48
6.2.2	Medidas murinométricas	48

6.2.3	Consumo Alimentar Diário (CAD)	48
6.2.4	Temperatura	49
6.2.5	Sequência Comportamental de Saciedade	49
6.2.6	Imunofluorescência contra proteína c-fos	50
6.2.7	Atividade locomotora (Campo aberto)	51
6.2.8	Teste de Tolerância à Glicose	52
6.2.9	Análises bioquímicas	52
6.2.10	Peso de tecido adiposo branco, marrom e órgãos.....	52
6.2.11	Estatística	53
6.3	EXPERIMENTO 2	53
6.3.1	Peso corporal	56
6.3.2	Estereotaxia	56
6.3.3	Sequência Comportamental de Saciedade com agonistas 5-HT.....	57
6.3.4	Imunofluorescência contra proteína c-fos	58
6.3.5	Estatística	58
7	RESULTADOS	59
7.1	EXPERIMENTO 1	59
7.2	EXPERIMENTO 2	67
8	DISCUSSÃO	73
8.1	EXPERIMENTO 1	73
8.2	EXPERIMENTO 2	77
9	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A - ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA (PUBLICADO).....	96
	ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA-UFPE) – EXPERIMENTO 1.	105

ANEXO B - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA-UFPE) – EXPERIMENTO 2.	106
---	------------

1 INTRODUÇÃO

Durante o período crítico para o desenvolvimento, que correspondente às fases de gestação e lactação, o organismo é mais responsivo aos estímulos ambientais os quais podem induzir adaptações fenotípicas e gerar repercussões ao longo da vida (STEARNS; DE JONG; NEWMAN, 1991; WEST-EBERHARD, 1986a; 2005a). Uma das variações melhor documentadas no estudo da plasticidade fenotípica é a nutrição. Tanto a escassez como o aumento quantitativo ou qualitativo da disponibilidade de nutrientes durante estes períodos parecem agir de forma permanente no desenvolvimento de sistemas fisiológicos (WEST-EBERHARD, 1986b) e sinalizar ao surgimento de doenças na idade adulta (ALFARADHI; OZANNE, 2011; BARKER; BULL; OSMOND; SIMMONDS, 1990). São muitas as publicações nacionais e internacionais, inclusive do nosso grupo de pesquisa, que visam o esclarecimento das possíveis alterações promovidas por agravos ambientais durante o período perinatal (DEIRO; MANHAES-DE-CASTRO; CABRAL-FILHO; BARRETO-MEDEIROS *et al.*, 2006; DEIRO; MANHAES-DE-CASTRO; CABRAL-FILHO; SOUZA *et al.*, 2004; MENDES-DA-SILVA; DE SOUZA; BARRETO-MEDEIROS; DE FREITAS-SILVA *et al.*, 2002; SILVA; GONCALVES; MANHAES-DE-CASTRO; NOGUEIRA, 2010). Temos nos concentrado em agressões nutricionais e farmacológicas (sobretudo no sistema serotoninérgico), algumas das quais sendo responsáveis, dentro da sociedade moderna, por distúrbios funcionais que culminam muitas vezes em processos patológicos na vida adulta.

O ambiente nutricional materno é determinante para o desenvolvimento da prole durante o período inicial da vida, dessa forma, a adequada alimentação durante a gestação e lactação é imprescindível (DESAI; HALES, 1997). No entanto, a alimentação da sociedade atual é marcada pelo consumo de dieta caracterizada por consumo elevado de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* (SHARMA; ZHUANG; GOMEZ-PINILLA, 2012). Neste contexto, o consumo materno perinatal de dieta rica em gorduras tem sido associada à maior susceptibilidade dos descendentes à obesidade. Em estudos experimentais, a prole de mães alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação apresentou menor peso ao nascer e maior peso corporal durante o desenvolvimento pós-natal; ao desmame, houve incremento no consumo alimentar e na adiposidade corporal bem como prejuízo no desenvolvimento do músculo esquelético e alterações metabólicas

associadas à resistência à insulina (BAYOL; SIMBI; STICKLAND, 2005; MELO; BENATTI; IGNACIO-SOUZA; OKINO *et al.*, 2014). Em longo prazo, animais adultos demonstraram maiores consumo alimentar e peso corporal, hipercolesterolemia e glicemia elevada, fatores que contribuem para o desenvolvimento de doenças metabólicas e crônico-degenerativas (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Vale destacar que, mesmo antes da concepção e gestação, o consumo materno de dieta hiperlipídica também foi capaz de aumentar a susceptibilidade ao fenótipo de síndrome metabólica e obesidade no animal adulto (PICONE; LAIGRE; FORTUN-LAMOTHE; ARCHILLA *et al.*, 2011; SRINIVASAN; KATEWA; PALANIYAPPAN; PANDYA *et al.*, 2006). Em relação ao sistema serotoninérgico, o consumo de dieta rica em gorduras provocou prejuízo na neurotransmissão serotoninérgica com diminuição dos níveis de serotonina no hipocampo e alterações metabólicas (ZEMDEGS; QUESSEVEUR; JARRIAULT; PENICAUD *et al.*, 2016). A redução na disponibilidade deste neurotransmissor pode ser consequência de aumento da sensibilidade da rafe dorsal ao autorreceptor 5-HT_{1A} (ZEMDEGS; QUESSEVEUR; JARRIAULT; PENICAUD *et al.*, 2016). Adicionalmente, o consumo de dieta hiperlipídica promoveu redução nos níveis plasmáticos desta monoamina (Kim *et al.*, 2013), aumento na densidade dos receptores 5-HT_{2C} hipotalâmicos (HUANG; HAN; STORLIEN, 2004) e promoveu perturbações no sistema serotoninérgico associadas a alterações comportamentais (SULLIVAN; GRAYSON; TAKAHASHI; ROBERTSON *et al.*, 2010).

A serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT) está intimamente relacionada à ingestão alimentar e, atualmente, são muitos os progressos acerca da compreensão de como este neurotransmissor regula o comportamento alimentar e o metabolismo (DONOVAN; TECOTT, 2013; HEISLER; JOBST; SUTTON; ZHOU *et al.*, 2006). A estreita relação entre o sistema serotoninérgico e a ingestão alimentar é ratificada por estudos que demonstraram a elevação dos níveis de 5-HT no hipotálamo como fator desencadeante de saciedade (SCHREIBER; SELBACH; ASMUSSEN; HESSE *et al.*, 2000) e sua redução como promotor de ingestão (HALFORD; HARROLD; LAWTON; BLUNDELL, 2005). A disponibilidade de 5-HT hipotalâmica ainda exerce importantes papéis na seleção de macronutrientes, no tamanho da refeição e no peso corporal (LEIBOWITZ; ALEXANDER, 1998). Cada função da serotonina pode ser mediada por uma variedade de receptores para 5-HT localizados em células neuronais e não neuronais (LAUDER, 1990). Estudos experimentais demonstraram

que a serotonina reduz a ingestão alimentar e aumenta o gasto energético através da ativação de neurônios hipotalâmicos que expressam neuropeptídeos anorexígenos (pró-opiomelanocortina – POMC e transcrito relacionado à cocaína e anfetamina – CART) e inibição de neurônios que expressam neuropeptídeos orexígenos (neuropeptídeo Y – NPY e peptídeo relacionado ao agouti – AgRP) (HEISLER; COWLEY; TECOTT; FAN *et al.*, 2002; HEISLER; JOBST; SUTTON; ZHOU *et al.*, 2006; LAM; PRZYDZIAL; RIDLEY; YEO *et al.*, 2008; XU; JONES; KOHNO; WILLIAMS *et al.*, 2008). Segundo Heisler e colaboradores (2006), a 5-HT atua reciprocamente sobre os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} para modular a ingestão alimentar (HEISLER; JOBST; SUTTON; ZHOU *et al.*, 2006). A ação anoréxica da serotonina sobre os receptores 5-HT_{2C} foi confirmada por estudos com camundongos *knockout* para este receptor. Estes animais desenvolveram hiperfagia crônica sinalizando para obesidade tardia (DONOVAN; TECOTT, 2013). Neste contexto, a alteração dos níveis encefálicos de serotonina durante o período crítico do desenvolvimento pode influenciar a expressão fenotípica do comportamento alimentar.

Dessa forma, a exposição perinatal à fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS), tem sido estudada quanto aos seus efeitos em longo prazo sobre o consumo alimentar e gasto energético. Foi demonstrado que a inibição neonatal da recaptação de serotonina (INRS) promove menor peso corporal, hipofagia, redução da expressão de NPY em ratos adultos (DA SILVA; MONTEIRO GALINDO; NASCIMENTO; MOURA FREITAS *et al.*, 2014; GALINDO; BARROS MDA; PINHEIRO; SANTANA *et al.*, 2015). Além disso, a INRS reduziu o acúmulo de gordura abdominal e aumentou a expressão de 5-HT_{2C} em ratos adultos após 5 semanas de exposição a uma dieta hiperlipídica/hipercalórica (GALINDO; BARROS MDA; PINHEIRO; SANTANA *et al.*, 2015). Já a exposição perinatal de camundongos à sertralina (um ISRS) foi relacionada à maior ingestão calórica, aumento do consumo de oxigênio de repouso, composição corporal mais magra e menor peso corporal, caracterizando um estado hipermetabólico dos animais adultos (DA SILVA; BRAZ; PEDROZA; NASCIMENTO *et al.*, 2015; DA SILVA; BRAZ; SILVA-FILHO; PEDROZA *et al.*, 2015; KUMMET; HASKELL; HERMANN; NI *et al.*, 2012). Estudos ainda apontaram que a INRS modula a função mitocondrial nos tecidos controladores do metabolismo energético (hipotálamo, tecido adiposo marrom e

músculo esquelético), aumentando a capacidade respiratória mitocondrial (DA SILVA; BRAZ; PEDROZA; NASCIMENTO *et al.*, 2015; DA SILVA; BRAZ; SILVA-FILHO; PEDROZA *et al.*, 2015; DA SILVA; MONTEIRO GALINDO; NASCIMENTO; MOURA FREITAS *et al.*, 2014).

Desde o final do século 20, com mais intensidade, a manipulação farmacológica do sistema serotoninérgico já foi apontada para o tratamento da obesidade e distúrbios alimentares evidenciando a importância da regulação serotoninérgica no controle da ingestão alimentar (BLUNDELL, 1991; HILL; BLUNDELL, 1990). No entanto, não foram encontrados na literatura estudos sobre os efeitos da utilização da inibição neonatal da recaptação da serotonina sobre a prole submetida à dieta hiperlipídica/hipercalórica na gestação e lactação. Como a 5-HT possui um papel chave na regulação do comportamento alimentar, nós hipotetizamos que a inibição neonatal da recaptação da serotonina é capaz de atenuar os efeitos de uma dieta hiperlipídica/hipercalórica sobre o controle do comportamento alimentar e o perfil metabólico em prole jovem submetida, perinatalmente, a este tipo de dieta e aumentar a atividade das vias anorexígenas no Arc do hipotálamo em ratos adultos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLASTICIDADE FENOTÍPICA

Durante a segunda guerra mundial, houve restrição no fornecimento de alimentos em diversos países da Europa, dentre eles a Holanda (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976). Neste período (1944-1945) houve um fenômeno de escassez de alimentos que ficou conhecido como “*Dutch Famine*” (Fome Holandesa) e seus efeitos em longo prazo sobre homens jovens expostos a esta restrição alimentar durante o desenvolvimento foram observados por Ravelli e demais autores em 1976 (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976). Este *cohort* realizado com 300 mil adultos jovens, constatou que a desnutrição durante a primeira metade da gestação resultou em taxas significativamente maiores de obesidade e alterações metabólicas associadas (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976).

Posteriormente, diversos estudos apontaram que a desnutrição perinatal também pode promover alterações metabólicas em longo prazo. Esses achados corroboraram com a *Hipótese do Fenótipo Poupador* – “*Thrifty Phenotype Hypothesis*” –, inicialmente formulada por Hales e Barker em 1992 (HALES; BARKER, 1992). Neste estudo, a desnutrição perinatal foi associada ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (HALES; BARKER, 1992). Outros estudos epidemiológicos e experimentais também vieram elucidar que a desnutrição perinatal e o subsequente prejuízo no desenvolvimento somático levam a alterações permanentes no metabolismo dos carboidratos, à intolerância à glicose assim como à resistência à insulina (e glucagon) (HALES, 1997; HALES; BARKER, 2001). Consequentemente, essas alterações metabólicas levam ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 e síndrome metabólica na vida adulta (HALES, 1997; HALES; BARKER, 2001). Ou seja, essa hipótese propõe que a privação nutricional perinatal gera uma série de adaptações metabólicas que se desdobram em maior risco de obesidade e doenças crônico-degenerativas em longo prazo, ainda que o organismo esteja sob ambiente nutricional adequado (HALES, 1997; HALES; BARKER, 1992; 2001).

A *Hipótese da Programação Metabólica* – “*Programming*” – também foi proposta a partir de estudos sobre os efeitos tardios da desnutrição perinatal sobre o metabolismo energético. Remale e colaboradores (2011) demonstraram que o crescimento intrauterino comprometido pela desnutrição seguido de “*catch up*” de

crescimento (com a normalização da dieta) programa hiperfagia, obesidade e desordens cardiovasculares em longo prazo (REMACLE; BIESWAL; BOL; REUSENS, 2011). Em roedores, Ozanne e Hales (2002) demonstraram que a desnutrição protéica intrauterina e neonatal também programa disfunções no metabolismo da insulina-glicose (OZANNE; HALES, 2002). A desnutrição na gestação induz à programação fetal que corresponde ao esforço de adaptação do feto às condições adversas in útero (REMACLE; BIESWAL; BOL; REUSENS, 2011). Essas adaptações visam a sobrevivência do conceito e se mantêm benéficas se o menor aporte nutricional se mantiver ao longo da vida (REMACLE; BIESWAL; BOL; REUSENS, 2011). Caso haja normalização ou abundância nutricionais, essas adaptações favorecem o aparecimento da síndrome metabólica (REMACLE; BIESWAL; BOL; REUSENS, 2011).

A *Hipótese do Fenótipo Poupador* faz associações entre a nutrição perinatal e o risco de doenças degenerativas na vida adulta. Já o *Modelo da Capacidade-Carga Metabólica* vem explicar porque existe essa associação entre o crescimento intrauterino/peso ao nascer e o desenvolvimento de doenças tardias (WELLS, 2010; 2011). Este modelo associa o surgimento de tais doenças à alta carga metabólica na vida adulta (estilo de vida = sedentarismo e alto consumo calórico) após crescimento fetal prejudicado (baixa capacidade metabólica) (WELLS, 2010; 2011). Para explicar este modelo, utilizam-se como base algumas hipóteses, dentre elas a *Hipótese da Resposta Adaptativa Preditiva* segundo a qual o organismo frente à desnutrição perinatal “prevê” baixa oferta energética ao longo da vida e desenvolve alterações metabólicas com a finalidade de adaptação (WELLS, 2010; 2011). Ademais, as evidências de que alterações metabólicas emergem na infância em exposição a ambiente obesogênico após crescimento inicial (fetal) restritivo em resposta à desnutrição corroboram com este modelo (WELLS, 2010; 2011).

A *Hipótese do Fenótipo Poupador* e o *Modelo da Capacidade-Carga Metabólica* estão inseridos na *Hipótese da Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença* – “*Developmental Origin of Health and Disease: DOHaD*”. Segundo esta nova perspectiva fundamentada na teoria da biologia evolucionista, eventos precoces associados a predisposições genéticas influenciam respostas adaptativas do organismo ao ambiente e podem favorecer o surgimento de doenças na idade adulta (GLUCKMAN; HANSON; LOW, 2011). Neste caso, há relação entre o

ambiente perinatal e a plasticidade do organismo o qual é eficiente em curto-prazo, porém, pode apresentar como efeitos o surgimento precoce das seguintes doenças metabólicas: diabetes tipo 2; obesidade; hipertensão; doenças cardiovasculares e distúrbios do comportamento alimentar (GLUCKMAN; HANSON; LOW, 2011).

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

As fases de gestação e lactação são consideradas períodos críticos de vulnerabilidade para o desenvolvimento do sistema nervoso (RICE; BARONE, 2000). Isso significa que durante período crítico de desenvolvimento o organismo é mais responsivo aos estímulos ambientais, os quais têm maior potencial de induzir alterações morfofuncionais e comportamentais (RICE; BARONE, 2000). No entanto, tais adaptações fenotípicas podem se expressar ou não durante a vida do organismo, a depender dos fatores ambientais incidentes sobre ele após o período perinatal (GLUCKMAN; HANSON; BATESON; BEEDLE *et al.*, 2009; GLUCKMAN; HANSON; LOW, 2011).

Dessa forma, o ambiente perinatal é determinante para o fenótipo resultante. Ao longo da história científica, diversos estudos vêm avaliando os efeitos em curto e longo prazo de alterações nutricionais perinatais. Esses estudos e seus resultados deram origem a algumas teorias, hipóteses e modelos sobre a relação entre o ambiente nutricional perinatal e o fenótipo do metabolismo energético na vida adulta. Especialmente, devido ao contexto social e econômico do século 20, a pobreza e a fome em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, as intervenções nutricionais que compreenderam esses estudos, em sua maioria, se basearam no modelo de desnutrição proteica. No entanto, há algumas décadas, o problema mundial relativo à nutrição está mudando.

2.2 TRANSIÇÃO NUTRICIONAL

Diversas análises e estudos realizados na segunda metade do século 20 apontam uma mudança importante no perfil de nutrição global a qual é denominada *Transição Nutricional* (DREWNOWSKI; POPKIN, 1997). Especificamente, os países de baixa e média renda estão passando por rápidas mudanças na dieta, atividade física e composição corporal (POPKIN, 1998). Muitos fatores compõem a origem desse fenômeno, dentre eles a redução do preço de determinados alimentos (DREWNOWSKI; POPKIN, 1997). A disponibilidade de alimentos ricos em gordura e de baixo custo em países de baixa e média renda levou ao aumento do consumo de gordura desconstruindo a relação clássica entre renda e ingestão de gorduras (DREWNOWSKI; POPKIN, 1997). Além dos alimentos com alto teor de gordura, houve também a queda em larga escala do preço da carne bovina (POPKIN, 2009).

A transição nutricional ocorre em famílias de baixa renda e é potencializada também pela urbanização (DREWNOWSKI; POPKIN, 1997; POPKIN, 1998). Isso é evidenciado, pois as pessoas que vivem em áreas urbanas apresentam padrões alimentares diferentes de suas contrapartes rurais, particularmente no que diz respeito ao consumo de alimentos preparados fora de casa (POPKIN, 2001a; b). O aumento do acesso aos supermercados, as mudanças no sistema agrícola e o crescimento subsequente dos setores modernos de varejo e serviços alimentares em todas as regiões e países, o acesso aos meios de comunicação em massa e a penetração de sistemas alimentares modernos em todas as sociedades devido à urbanização também são fatores subjacentes fundamentais (POPKIN, 2001a; 2009; 2015).

A alimentação vem mudando universalmente, com mais intensidade a partir da década de 1970 (POPKIN; ADAIR; NG, 2012). Essa alimentação é caracterizada por: consumo de alimentos altamente processados (os quais possuem considerável teor de gordura, açúcar e sal); adição de óleo vegetal comestível durante a preparação dos alimentos (frituras); bebidas açucaradas; maior ingestão de edulcorantes calóricos, alimentos de origem animal e carboidratos refinados; assim como redução do consumo de leguminosas e outros vegetais e frutas (HAWKES, 2005; POPKIN, 2009; 2015; POPKIN; ADAIR; NG, 2012; POPKIN; LU; ZHAI, 2002). Outras explicações sobre o crescente ganho de peso da população mundial também é a tendência do consumo de refeições já preparadas e os restaurantes que estão

em desenvolvimento contínuo e que aumentam a ingestão de alimentos fora de casa, levando ao alto consumo de alimentos ricos em açúcar e gordura (BELAHSEN, 2014; POPKIN; ADAIR; NG, 2012).

Essa mudança no perfil dos alimentos que são consumidos foi induzida principalmente por mudanças nos preços e disponibilidade de alimentos bem como na renda, mas também pela indústria alimentar moderna (AMUNA; ZOTOR, 2008; POPKIN, 2001a). Hawkes e demais autores (2005) mostraram que há um papel importante do investimento estrangeiro direto (IED) na indústria de alimentos altamente processados sobre a transição nutricional (HAWKES, 2005). Na década de 1980, o IED na industrialização e comercialização de alimentos processados por empresas transnacionais de alimentos em países desenvolvidos aumentou rapidamente (HAWKES, 2005). Isso permitiu a redução de custos (redução dos preços) e o aumento do poder de mercado, levando afiliadas estrangeiras de empresas transnacionais de alimentos para países de baixa e média renda (HAWKES, 2005). O efeito disso foi a globalização de alimentos altamente processados (HAWKES, 2005).

A introdução de cadeias de *fast-food* e hábitos alimentares ocidentalizados que proporcionam refeições com características de *fast-food* (grandes tamanhos de porções com alta densidade de energia e refrigerantes ricos em açúcar) parece ser um marcador da crescente prevalência de obesidade (ASTRUP; DYERBERG; SELLECK; STENDER, 2008). Esses alimentos apresentam níveis inaceitavelmente elevados de ácidos graxos *trans* produzidos industrialmente que possuem poderosos efeitos biológicos e contribuem para diabetes tipo 2 e doença arterial coronariana (ASTRUP; DYERBERG; SELLECK; STENDER, 2008).

Além da alteração das características do consumo alimentar, o padrão e nível de atividade física também mudaram intensamente. Em países de baixa renda, devido às mudanças no sistema agrícola, a transição do trabalho agrícola para o emprego em fábricas e serviços implicou em redução no gasto de energia (POPKIN, 2001a; 2015). As reduções na atividade física e o aumento do comportamento sedentário também começaram a ser vistos (POPKIN; ADAIR; NG, 2012). Os padrões de atividades no trabalho, lazer, viagens e em casa também estão mudando rapidamente tendendo para redução do gasto de energia (POPKIN, 2009).

Subjacente a esta transição, as mudanças tecnológicas também afetam a atividade física aumentando o sedentarismo (POPKIN, 2015).

Os efeitos negativos da *Transição Nutricional* só foram claramente reconhecidos no início da década de 1990, principalmente em populações de baixa e média renda, quando as doenças crônicas não-transmissíveis começaram a dominar o globo (POPKIN; ADAIR; NG, 2012). Vários estudos apontaram diversas alterações na composição corporal na população mundial como consequência desse novo padrão alimentar e de atividade física (POPKIN, 2001b). A alta ingestão de gordura *trans* pode produzir obesidade abdominal, um fator importante na síndrome metabólica (ASTRUP; DYERBERG; SELLECK; STENDER, 2008). Na maioria dos países há crescente aumento do índice de massa corporal (IMC), da circunferência abdominal (CA) e da relação CA/IMC (POPKIN, 2015). Além disso, a prevalência de obesidade e doenças relacionadas à dieta como diabetes, hipertensão e demais doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, hiperlipidemia, e câncer vêm aumentando no mundo, mas especificamente em países em desenvolvimento na América Latina e na Ásia (ASTRUP; DYERBERG; SELLECK; STENDER, 2008; BELAHSEN, 2014; POPKIN, 1998; 2001a; 2015). Como reflexo, os efeitos adversos para a saúde da transição nutricional também incluem taxas crescentes de obesidade infantil (DREWNOWSKI; POPKIN, 1997). Dessa forma, a transição nutricional é uma preocupação de saúde pública devido a sua conexão com a crescente carga de obesidade e doenças crônicas (HAWKES, 2005).

Tanto os países desenvolvidos como os de baixa e média renda estão passando por uma pandemia de obesidade e doenças crônicas não-transmissíveis devido ao processo da *Transição Nutricional* (POPKIN, 2009). No entanto, nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento a herança e a realidade da desnutrição encontram-se com o aumento do consumo de alimentos ricos em gordura e açúcares (SHETTY, 2013). Consequentemente, o fardo existente da desnutrição na saúde pública é agravado pelos efeitos adversos dessa transição nutricional, como a crescente prevalência de obesidade e doenças crônicas não-transmissíveis (POPKIN, 2015; SHETTY, 2013). Popkin (2001) apontou para o surgimento de uma grande proporção de famílias com membros atualmente desnutridos e com excesso de peso em vários países asiáticos e latino-americanos (POPKIN, 2001b). Amuna e Zotor (2008) também relataram que as novas doenças

não-transmissíveis relacionadas à dieta e ao estilo de vida, como a síndrome metabólica, o diabetes tipo 2 e as doenças cardiovasculares têm aumentado nas últimas décadas em países em desenvolvimento (AMUNA; ZOTOR, 2008). Dessa forma, enquanto os problemas da fome e da subnutrição persistem e coexistem com a transição nutricional, há uma escalada de doenças não transmissíveis relacionadas à dieta, fazendo com que esses países enfrentem ambos os lados da desnutrição (subnutrição e hipernutrição) (BELAHSEN, 2014).

A soma dos agravos na saúde pública relacionados à desnutrição proteica e à transição nutricional em países de baixa e média renda pode ter origem no desenvolvimento perinatal. Com base na teoria da plasticidade fenotípica e no “*DOHaD*”, a desnutrição perinatal induz distúrbios metabólicos e nos mecanismos de controle do balanço energético como resposta adaptativa, com tendência à obesidade e co-morbididades a depender do ambiente nutricional pós-natal em longo prazo (GLUCKMAN; HANSON; LOW, 2011). Ou seja, em países onde co-existem a desnutrição e a hipernutrição, o ambiente obesogênico trazido pela transição nutricional pode consistir no gatilho que desencadeia a obesidade e demais doenças crônicas associadas resultantes das adaptações fenotípicas perinatais frente a desnutrição materna (AMUNA; ZOTOR, 2008; POPKIN, 2001a). Sendo assim, existem grupos de indivíduos que passam pela desnutrição perinatal e se deparam com o excesso na disponibilidade de alimentos pobres com alto teor de gordura.

No Brasil, Monteiro e colaboradores (1995) observou as mudanças no estado nutricional de crianças e adultos em todas as regiões nas décadas de 70 e 80 (MONTEIRO; MONDINI; DE SOUZA; POPKIN, 1995). Neste contexto, a desnutrição ainda é aspecto relevante entre crianças de famílias de baixa renda (MONTEIRO; MONDINI; DE SOUZA; POPKIN, 1995). Mas, a desnutrição está diminuindo em crianças e adultos de todos os estratos econômicos com aumento simultâneo da obesidade adulta com maior proporção de aumento entre famílias de baixa renda (MONTEIRO; MONDINI; DE SOUZA; POPKIN, 1995). Assim, a questão da baixa renda não protege contra o ganho de peso devido ao novo tipo de dieta consumida que é de alto teor calórico e baixo custo. Sendo assim, o Brasil passou rapidamente de um problema de desnutrição para um problema de excesso de dieta (MONTEIRO; MONDINI; DE SOUZA; POPKIN, 1995). Em outro estudo retrospectivo, Monteiro e demais autores (2004) apontaram que em 1975 havia

quase 2 casos de baixo peso para 1 caso de obesidade, enquanto que em 1997 já havia mais de 2 casos de obesidade para 1 caso de insuficiência ponderal (MONTEIRO; CONDE; POPKIN, 2004). Nesse mesmo ano, as mulheres brasileiras de baixa renda eram significativamente mais suscetíveis que as mulheres de alta renda ao baixo peso e obesidade (MONTEIRO; CONDE; POPKIN, 2004). Em 2008-2009, 1 em cada 7 cidadãos era obeso e os adultos mais pobres e mais ricos apresentaram taxas incrementais positivas de obesidade (CONDE; MONTEIRO, 2014). De 1974-1975 a 2008-2009, a taxa anual de aumento da obesidade para homens foi de 4,7% ao ano e de 2,5% para mulheres (CONDE; MONTEIRO, 2014). Hoje, a atual prevalência de excesso de peso é pelo menos 3 vezes maior do que a desnutrição, pois as políticas sociais inclusivas conseguiram reduzir a pobreza, mas também identificar novos desafios relacionados ao controle ou redução da obesidade (CONDE; MONTEIRO, 2014).

2.3 CONSUMO MATERNO DE DIETA HIPERLIPÍDICA NA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO: CONSEQUÊNCIAS EM CURTO E LONGO PRAZO SOBRE O BALANÇO ENERGÉTICO E METABOLISMO DOS DESCENDENTES

Como reflexo da sociedade como um todo, há também um aumento do consumo de dieta caracterizada por consumo elevado de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* pelas mulheres inclusive nas fases de gestação e lactação (Sharma et al, 2012). Diversos estudos experimentais e em humanos apontam que o consumo materno perinatal de dieta rica em gorduras gera alterações na composição corporal e no balanço energético assim como distúrbios metabólicos os quais estão associados ao desenvolvimento de obesidade e doenças crônicas na prole em curto e longo prazo.

Em camundongos, a prole de mães alimentadas com dieta hiperlipídica durante a lactação apresentou maiores peso e gordura corporal ao desmame (LIANG; YANG; ZHANG; MARICELLI *et al.*, 2016). O consumo materno de dieta hiperlipídica também promoveu aumento do peso corporal durante a fase neonatal (HERNANDEZ; GRAYSON; YADAV; SEELEY *et al.*, 2012). Corroborando com tais achados, Benatti e demais autores (2014) recentemente demonstraram que consumo de dieta hiperlipídica na gestação e lactação também promove maior peso corporal e maior quantidade de tecido adiposo, em camundongos logo após desmame (BENATTI; MELO; BORGES; IGNACIO-SOUZA *et al.*, 2014).

Por outro lado, Mendes-da Silva e demais autores identificaram que ratos *Wistar* neonatos expostos à dieta hiperlipídica na gestação ou lactação apresentam menor crescimento somático e peso corporal durante a lactação (MENDES-DA-SILVA; GIRIKO; MENNITTI; HOSOUME *et al.*, 2014). Em outros estudos experimentais, a prole de mães alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação também apresentou menor peso ao nascer e, ao desmame, houve prejuízo no desenvolvimento do músculo esquelético (Bayol *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2014). No entanto, esses achados foram seguidos de maior peso corporal e incremento na adiposidade corporal durante o desenvolvimento pós-natal (Bayol *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2014). Dessa forma, parece que o consumo materno e pós-natal de dieta hiperlipídica promove redução do peso corporal fetal, mas essa prole apresenta um “*catch-up*” de crescimento e um aumento do peso corporal em longo prazo (SULLIVAN; RIVERA; TRUE; FRANCO *et al.*, 2017).

Em animais adultos, também se observou maior peso corporal associado a outros fatores que contribuem para o desenvolvimento de doenças metabólicas e crônico-degenerativas (Oliveira *et al.*, 2011). Em camundongos, a prole de mães alimentadas com dieta hiperlipídica durante a lactação apresentou maiores peso e gordura corporal (LIANG; YANG; ZHANG; MARICELLI *et al.*, 2016). Além disso, observou-se aumento do peso relativo do tecido adiposo em ratos *Wistar* de mães alimentadas com dieta hiperlipídica (DOS SANTOS PEREZ; SANTANA DOS SANTOS; DOS SANTOS CORDEIRO; MATOS PARAGUASSU *et al.*, 2015). Corroborando com esses autores, Seet e colaboradores (2015) e Benatti e colaboradores (2014) demonstraram que a dieta materna hiperlipídica promove maiores peso corporal, adiposidade e níveis de colesterol em animais na vida adulta (BENATTI; MELO; BORGES; IGNACIO-SOUZA *et al.*, 2014; SEET; YEE; JELLYMAN; HAN *et al.*, 2015). Há também menor tolerância à glicose e resistência à insulina (BENATTI; MELO; BORGES; IGNACIO-SOUZA *et al.*, 2014). Embora diversos mecanismos sejam estudados e apontados na literatura, nestes trabalhos esse fenótipo é associado à alteração do metabolismo hepático dos ácidos graxos devido ao aumento da expressão da proteína *Stearoyl-CoA desaturase* (SCD-1) (BENATTI; MELO; BORGES; IGNACIO-SOUZA *et al.*, 2014; SEET; YEE; JELLYMAN; HAN *et al.*, 2015). Ademais, a continuação da exposição a dieta

hiperlipídica após desmame incrementa o aumento da massa corporal acompanhada por hipertrofia dos adipócitos (GREGORIO; SOUZA-MELLO; MANDARIM-DE-LACERDA; AGUILA, 2013).

Em relação ao comportamento alimentar, diversas alterações são observadas na prole de mães alimentadas com dieta hiperlipídica, inclusive ainda na fase de lactação (KOJIMA; CATAVERO; RINAMAN, 2016). Por exemplo, ratos neonatos apresentam antecipação do início da alimentação independente e apresentam maior ingestão calórica de dieta sólida na terceira semana pós-natal (KOJIMA; CATAVERO; RINAMAN, 2016). Outros estudos experimentais observam que a prole de mães alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação apresentou incremento no consumo alimentar ao desmame (Bayol et al, 2005; Oliveira et al, 2011; Melo et al, 2014). Em longo prazo, animais adultos expostos perinatalmente à dieta hiperlipídica também demonstraram maior consumo alimentar (Oliveira et al, 2011; (FERRO CAVALCANTE; MARCELINO DA SILVA; LIRA; DO AMARAL ALMEIDA *et al.*, 2014). No entanto, apesar do aumento do peso corporal, não se observou alteração no consumo alimentar em ratos *Wistar* provindos de mães alimentadas com dieta hiperlipídica (DOS SANTOS PEREZ; SANTANA DOS SANTOS; DOS SANTOS CORDEIRO; MATOS PARAGUASSU *et al.*, 2015).

Além do controle homeostático, a exposição perinatal à dieta hiperlipídica também promove alterações no sistema hedônico. Rivera e colaboradores (2015) avaliaram os efeitos do consumo de dieta hiperlipídica e obesidade materna durante o desenvolvimento utilizando modelo de primatas não-humanos e observaram maior ingestão de açúcares e gordura, o que foi associado à redução da quantidade de fibras dopaminérgicas e dos receptores D1 e D2 na prole, comprometendo a sinalização dopaminérgica (RIVERA; KIEVIT; KIRIGITI; BAUMAN *et al.*, 2015). Esse efeito pode aumentar o risco de obesidade na prole uma vez que há o comprometimento do sistema de recompensa alimentar e aumento do consumo de alimento palatável e de alta densidade energética (RIVERA; KIEVIT; KIRIGITI; BAUMAN *et al.*, 2015).

No tocante ao gasto de energia, o outro lado do balanço energético, foi observada redução da atividade termogênica e redução da expressão da UCP-1 no tecido adiposo marrom da prole após exposição materna a dieta hiperlipídica, o que pode estar associado à obesidade (LIANG; YANG; ZHANG; MARICELLI *et al.*,

2016). Também foi demonstrado que a atividade física da prole masculina foi reduzida em resposta ao consumo materno e pós-desmame de dieta hiperlipídica (THOMPSON; VALLEAU; BARLING; FRANCO *et al.*, 2017). Houve redução do desempenho de exercício e eficiência de treinamento em camundongos cujas nutrizes consumiram dieta hiperlipídica durante gestação e lactação (WALTER; KLAUS, 2014). Neste estudo, os autores demonstram que tal fenômeno deve resultar de alterações no metabolismo da glicose e de lipídeos no músculo esquelético, o que levaria a uma insuficiência muscular em realizar exercícios prolongados predispondo à menor atividade física e obesidade na vida adulta (WALTER; KLAUS, 2014).

O consumo materno de dietas hiperlipídicas durante a gestação/lactação está associado ainda a alterações metabólicas em curto e longo prazo. Em estudos experimentais, animais adultos demonstraram hipercolesterolemia e glicemia elevada, após exposição perinatal a dietas hiperlipídicas (Oliveira *et al.*, 2011). Outros estudos também apontaram prejuízo no desenvolvimento do músculo esquelético e alterações metabólicas associadas à resistência à insulina em animais submetidos a tais tipos de dietas (Bayol *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2014). Essas alterações metabólicas levariam a distúrbios metabólicos como intolerância à glicose e resistência à insulina (LIANG; YANG; ZHANG; MARICELLI *et al.*, 2016). Todos esses fatores elevam o risco para desenvolver síndrome metabólica, obesidade bem como doenças metabólicas e crônico-degenerativas (FERRO CAVALCANTE; MARCELINO DA SILVA; LIRA; DO AMARAL ALMEIDA *et al.*, 2014); Oliveira *et al.*, 2011).

A exposição à dieta hiperlipídica materna durante a gestação e lactação ainda aumenta a esteatose e fibrose hepáticas na prole adulta (THOMPSON; CISMOWSKI; TRASK; LALLIER *et al.*, 2016). A associação da exposição perinatal e pós-desmame à dieta hiperlipídica também provocou hipercolesterolemia e extensa esteatose hepática, mas nos animais expostos apenas perinatalmente, a esteatose ocorreu de forma mais grave associada à fibrose (DOS SANTOS PEREZ; SANTANA DOS SANTOS; DOS SANTOS CORDEIRO; MATOS PARAGUASSU *et al.*, 2015; THOMPSON; CISMOWSKI; TRASK; LALLIER *et al.*, 2016). Também foi observado aumento da proliferação de hepatócitos já na fase neonatal (THOMPSON; CISMOWSKI; TRASK; LALLIER *et al.*, 2016). Em camundongos, o consumo

materno de dieta hiperlipídica gera na prole adulta intolerância à glicose, resistência à insulina, aumento da adiposidade e inflamação no tecido adiposo, bem como prejudica a função das células beta-pancreáticas (YOKOMIZO; INOGUCHI; SONODA; SAKAKI *et al.*, 2014). No estudo de Gregorio e colaboradores (2013), o consumo materno de dieta hiperlipídica durante a gestação e/ou lactação ou ainda continuação da exposição após desmame é associado a alterações na morfologia pancreática na prole adulta de camundongos (GREGORIO; SOUZA-MELLO; MANDARIM-DE-LACERDA; AGUILA, 2013).

Outros estudos chegaram a investigar qual período crítico de desenvolvimento é mais vulnerável aos impactos provocados pela exposição perinatal a dieta hiperlipídica. Desai e colaboradores (2014) estudaram os efeitos da obesidade materna e o consumo perinatal de dieta hiperlipídica observando aumento do peso corporal e da adiposidade, distúrbios metabólicos e hiperglicemia; mas, essas alterações variam em função do período de exposição (DESAI; JELLYMAN; HAN; BEALL *et al.*, 2014). Gregorio e demais autores (2013) demonstraram que a exposição gestacional à dieta hiperlipídica aumentou os níveis de insulina prejudicando o metabolismo dos carboidratos (GREGORIO; SOUZA-MELLO; MANDARIM-DE-LACERDA; AGUILA, 2013). No entanto, a hipertrofia das ilhotas pancreáticas foi observada quando o período de exposição ocorreu na gestação apenas ou associada a outro período (GREGORIO; SOUZA-MELLO; MANDARIM-DE-LACERDA; AGUILA, 2013). A partir desses resultados os autores defendem que a exposição gestacional é mais prejudicial (GREGORIO; SOUZA-MELLO; MANDARIM-DE-LACERDA; AGUILA, 2013). No entanto, vale destacar também que, mesmo antes da concepção e gestação, o consumo materno de dieta hiperlipídica também foi capaz de aumentar a susceptibilidade ao fenótipo de síndrome metabólica e obesidade na prole adulta (Srinivasan *et al.*, 2006; Picone *et al.*, 2011).

Alguns achados de Sullivan e colaboradores (2015) apontam que as diversas alterações na prole de mães alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação, dentre elas as alterações no balanço energético e metabolismo, são resultado de alterações maternas e consequentemente do meio intrauterino (SULLIVAN; RIPER; LOCKARD; VALLEAU, 2015). O metabolismo materno sofre o impacto da dieta hiperlipídica com aumento de fatores inflamatórios, hormônios

(leptina e insulina) e nutrientes (glicose e triglicerídeos) os quais se estendem ao feto (SULLIVAN; ROPER; LOCKARD; VALLEAU, 2015). Murabayashi e demais autores (2013) investigaram, no 17º dia de gestação, a expressão de marcadores inflamatórios e adipocinas no tecido adiposo branco subcutâneo (MURABAYASHI; SUGIYAMA; ZHANG; KAMIMOTO *et al.*, 2013). Observou-se aumento dos níveis plasmáticos de insulina e glicose, hipertrofia dos adipócitos, aumento dos níveis de mRNA do fator de necrose tumoral alfa, ou seja, há a presença de um processo inflamatório já na fase fetal (MURABAYASHI; SUGIYAMA; ZHANG; KAMIMOTO *et al.*, 2013). Estas disfunções metabólicas (materna e fetal) ocorrem em consequência de processo inflamatório sistêmico que abrange também o tecido adiposo fetal (MURABAYASHI; SUGIYAMA; ZHANG; KAMIMOTO *et al.*, 2013). Outras alterações maternas também podem ser observadas como resposta ao consumo de dieta rica em gorduras (HERNANDEZ; GRAYSON; YADAV; SEELEY *et al.*, 2012). Por exemplo, estudos em animais apontam que a lactação atrasa, há alteração morfológica dos alvéolos mamários (caracterizados como poucos e pequenos) e subsequente alteração da composição do leite com redução da expressão gênica de proteínas do leite materno (HERNANDEZ; GRAYSON; YADAV; SEELEY *et al.*, 2012).

Não obstante, Dunn e Bale (2009) investigaram os efeitos da obesidade e exposição materna à dieta hiperlipídica durante a gestação e observou redução da sensibilidade à insulina (DUNN; BALE, 2009). Apontando o nível de gravidade dessa exposição nutricional durante o desenvolvimento, esse estudo mostrou que esse efeito persiste por pelo menos duas gerações (DUNN; BALE, 2009). Dessa forma, esse fenótipo não é atribuído apenas a alterações intrauterinas e maternas, mas envolve, provavelmente, um mecanismo epigenético (DUNN; BALE, 2009).

Apesar de não ter gerado obesidade materna nem na prole, foram achados alguns efeitos metabólicos em camundongos (UMEKAWA; SUGIYAMA; DU; MURABAYASHI *et al.*, 2015). Observou-se que a exposição materna a dieta moderada em gordura desenvolveu intolerância à glicose, maiores níveis de triglicerídeos, aumento do tamanho das células adiposas mesentéricas e maior expressão gênica de marcadores pró-inflamatórios no tecido adiposo mesentérico (UMEKAWA; SUGIYAMA; DU; MURABAYASHI *et al.*, 2015). Isso ocorreu mesmo o modelo experimental consistindo em destinar os neonatos (de mães expostas à

dieta hiperlipídica ou controle) para mães alimentadas com dieta controle (UMEKAWA; SUGIYAMA; DU; MURABAYASHI *et al.*, 2015). Dessa forma, este estudo corrobora com o estudo de Dunn e Bale (2009), apontando que os efeitos do consumo materno de dieta hiperlipídica sobre a prole ocorrem independentes das complicações maternas durante a lactação (DUNN; BALE, 2009; UMEKAWA; SUGIYAMA; DU; MURABAYASHI *et al.*, 2015).

Diversos estudos em primatas não-humanos indicam que a exposição perinatal à dieta hiperlipídica promove adaptações fenotípicas no balanço energético e metabolismo da prole em curto e longo prazo (SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011). Os diversos estudos neste campo temático explicam os possíveis mecanismos subjacentes, ou seja, quais as alterações morfofuncionais responsáveis pela alteração do balanço energético e do metabolismo da prole exposta a dieta com alto teor de gorduras durante o desenvolvimento. Os mecanismos através dos quais esses efeitos ocorrem podem estar subjacentes a alterações em sistemas centrais cruciais para o balanço energético como o sistema serotoninérgico (SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011).

2.4 SISTEMA DE NEUROTRANSMISSÃO SEROTONINÉRGICA: NEURODESENVOLVIMENTO E REGULAÇÃO HIPOTALÂMICA DO BALANÇO ENERGÉTICO E METABOLISMO

2.4.1 Serotonina e Neurodesenvolvimento

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

Em camundongos, as células serotoninérgicas embrionárias são identificáveis a partir do 12º dia gestacional (HENDRICKS; FYODOROV; WEGMAN; LELUTIU *et*

al., 2003). Lauder e colaboradores demonstraram, através de estudos em ratos, que dois grupos de núcleos na medula primitiva originam o sistema serotoninérgico. O grupo caudal (B1-5) emite projeções axonais descendentes para a medula espinhal e correspondem aos núcleos *pallidus*, *magnus*, *pontis* e *obscurus* da rafe no tronco encefálico. O grupo rostral (B6-8) origina as projeções ascendentes para o encéfalo e correspondem aos núcleos dorsal e mediano da rafe no tronco encefálico (LAUDER, 1990; LAUDER; KREBS, 1978; LAUDER; PETRUSZ; WALLACE; DINOME *et al.*, 1982). Até o nascimento, os axônios serotoninérgicos alcançam as regiões-alvo, mas a sinaptogênese, assim como o pico dos níveis de 5-HT, ocorre durante a lactação (Whitaker-Azmitia, 2010).

Nas fases embrionária e fetal, a 5-HT acumula diversas funções. Essa monoamina regula a neurogênese, indiretamente, estimulando a diferenciação e inibindo a divisão celular (Whitaker-Azmitia, 2010). Além disso, essa molécula sinalizadora tem efeito autorregulatório, controlando o crescimento do próprio sistema serotoninérgico, e neuroprotetor, controlando a apoptose (AHLEMEYER; BEIER; SEMKOVA; SCHAPER *et al.*, 2000; GOLDBERG, 1998; VITALIS; CASES; PASSEMARD; CALLEBERT *et al.*, 2007). Esses efeitos são mediados pelo fator trófico S100B liberado pelas células astrogliais, as quais apresentam o receptor 5-HT_{1A} (AHLEMEYER; BEIER; SEMKOVA; SCHAPER *et al.*, 2000). Já no período de lactação em ratos (três primeiras semanas de vida), ocorrem os processos de maturação dos sistemas de neurotransmissão influenciados pela serotonina. Na primeira semana pós-natal ocorre o alongamento axonal (Whitaker-Azmitia, 2010). Nas 2ª e 3ª semanas seguintes ocorrem a sinaptogênese e a elaboração dendrítica (Whitaker-Azmitia, 2010). Em humanos, essas etapas correspondem ao último trimestre de gestação e dois primeiros anos de vida (Whitaker-Azmitia, 2010). A 5-HT modula esses processos de maturação também pela ativação dos receptores 5-HT_{1A} presentes nas células astrogliais que por sua vez liberam fatores de crescimento como o S100B (AZMITIA; DOLAN; WHITAKER-AZMITIA, 1990; WHITAKER-AZMITIA; AZMITIA, 1994; WHITAKER-AZMITIA; MURPHY; AZMITIA, 1990).

A diversidade de funções desempenhadas pela 5-HT demanda de seus níveis ideais para o desenvolvimento encefálico normal. Dessa forma, sugere-se que fatores ambientais que promovam a alteração da atividade serotoninérgica nessa

fase da vida podem gerar adaptações fenotípicas e modificações em funções reguladas pela 5-HT.

2.4.2 Serotonina e Balanço Energético via Arc no Hipotálamo

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

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

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

estimulando os anorexígenos (POMC), com efeito saciogênico (VALASSI *et al.*, 2008; LEITE; BRANDÃO-NETO, 2009).

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

Dentre os fatores centrais que regulam o comportamento alimentar, destaca-se o papel do sistema serotoninérgico sobre os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} e suas interações com o sistema melanocortinérgico. Os neurônios serotoninérgicos emitem projeções para diversas regiões encefálicas envolvidas no controle do balanço energético, a saber, os núcleos arqueado, paraventricular, ventromedial e dorsomedial do hipotálamo, a área lateral hipotalâmica, o núcleo do trato solitário e o núcleo parabraquial (MARSTON; GARFIELD; HEISLER, 2011; XU; JONES; KOHNO; WILLIAMS *et al.*, 2008). No entanto, o Arc parece ser o sítio chave de ação da 5-HT sobre o apetite (MARSTON; GARFIELD; HEISLER, 2011). Estudos utilizando a eliminação sistemática de receptores serotoninérgicos indicaram que os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} são os mais criticamente envolvidos na modulação da homeostase energética pela 5-HT (HEISLER; COWLEY; TECOTT; FAN *et al.*, 2002; HEISLER; JOBST; SUTTON; ZHOU *et al.*, 2006). Heisler e colaboradores, através de vários estudos anatômicos, eletrofisiológicos e comportamentais, demonstraram como ocorre o efeito hipofágico da serotonina através dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}.

O receptor 5-HT_{1B} é expresso nos neurônios NPY/AgRP do ARC. Através deste receptor, a serotonina hiperpolariza e reduz a atividade das células orexígenas, inibindo a liberação de AgRP (HEISLER; JOBST; SUTTON; ZHOU *et al.*, 2006). Ao mesmo tempo, através dos mesmos receptores presentes nas projeções GABAérgicas inibitórias dos neurônios NPY/AgRP para as células POMC, a 5-HT hiperpolariza essas projeções e facilita a liberação do hormônio alfa-melanócito estimulante (α -MSH) (HEISLER; JOBST; SUTTON; ZHOU *et al.*, 2006). Por sua vez, o receptor 5-HT_{2C} é co-expresso nas células que produzem a POMC, precursora do α -MSH (HEISLER; COWLEY; TECOTT; FAN *et al.*, 2002; LAM; PRZYDZIAL; RIDLEY; YEO *et al.*, 2008). Através deste receptor, a serotonina estimula as células anorexígenas e a síntese da POMC (HEISLER; COWLEY; TECOTT; FAN *et al.*, 2002; HEISLER; JOBST; SUTTON; ZHOU *et al.*, 2006). Assim, via ativação dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}, a 5-HT reduz liberação de neuropeptídeos orexígenos e aumenta a expressão de neuropeptídeos anorexígenos, levando à saciedade.

Camundongos com deficiência global do receptor 5-HT_{2C} (*"5-HT_{2C} null mice"*) desenvolvem um fenótipo de hiperfagia, obesidade (com aumento da massa gorda, redução da massa magra e aumento da leptina sérica) e resposta atenuada à ação de agentes 5-HT anorexígenos sobre e ingestão alimentar. Contudo, estes efeitos são normalizados em camundongos 5-HT_{2C}/POMC, demonstrando que a expressão dos receptores 2C apenas nas células POMC é suficiente para mediar o efeito saciogênico da serotonina (XU; JONES; KOHNO; WILLIAMS *et al.*, 2008). O receptor 5-HT_{2C} tem uma relação direta com o tamanho da refeição. Xu e colaboradores (2008) também demonstraram que camundongos com deficiência global do receptor 5-HT_{2C} apresentam o tamanho da refeição maior em relação aos animais controle, enquanto a frequência alimentar é semelhante entre os grupos (XU; JONES; KOHNO; WILLIAMS *et al.*, 2008). Este efeito também foi normalizado em camundongos 5-HT_{2C}/POMC, ou seja, a hiperfagia foi revertida com a antecipação do ponto de saciedade.

O sistema melanocortinérgico central é o sítio chave de ação da 5-HT na estimulação da hipofagia (HEISLER; JOBST; SUTTON; ZHOU *et al.*, 2006). Em camundongos, foi observado que a obesidade pode resultar da deleção do gene POMC ou de receptores melanocortinérgicos (MC) (CONE, 2005). Da mesma forma,

em humanos, evidências genéticas demonstraram que a disfunção do sistema das melanocortinas induz hiperfagia e obesidade precoce (MARSTON; GARFIELD; HEISLER, 2011). Este sistema é constituído pelos neurônios de primeira ordem POMC e NPY/AgRP do núcleo arqueado, pelos neurônios de segunda ordem que expressam receptores MC localizados nas regiões-alvo e por uma pequena quantidade de neurônios POMC do NTS. Entretanto, a maior expressão de POMC no SNC ocorre no Arc (CONE, 2005).

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

Já está bem estabelecida na literatura a necessidade da serotonina encefálica para a manutenção do balanço energético e sua relação inversa com o consumo alimentar (MARSTON; GARFIELD; HEISLER, 2011). Vários estudos já associaram a alteração da função serotoninérgica com distúrbios alimentares (BREWERTON; JIMERSON, 1996; MONTELEONE; BRAMBILLA; BORTOLOTTI; MAJ, 2000). Por exemplo, pacientes com bulimia nervosa apresentam diminuição da sensibilidade/responsividade do sistema serotoninérgico e redução da concentração plasmática de triptofano (JIMERSON; WOLFE; METZGER; FINKELSTEIN *et al.*, 1997; PIJL; COHEN; VERKES; KOPPESCHAAR *et al.*, 1995). A partir disso, a manipulação farmacológica do sistema serotoninérgico tem sido apontada para perda de peso na obesidade e tratamento de distúrbios alimentares (HILL; BLUNDELL, 1990). Muitos ensaios clínicos demonstraram a eficácia do tratamento da obesidade, bulimia e anorexia nervosa com fármacos serotoninérgicos

(fluoxetina, escitalopram, sibutramina, d-fenfluramina), sublinhando a importância da regulação serotoninérgica no controle da ingestão alimentar (FAHY; RUSSELL, 1993; GRUDELL; SWEETSER; CAMILLERI; ECKERT *et al.*, 2008; LEOMBRUNI; AMIANTO; DELSEDIME; GRAMAGLIA *et al.*, 2006; LEOMBRUNI; PIERO; LAVAGNINO; BRUSTOLIN *et al.*, 2008; PIJL; KOPPESCHAAR; WILLEKENS; OP DE KAMP *et al.*, 1991). Assim, levando em consideração o papel sofisticado da serotonina na regulação do comportamento alimentar e na sinalização do neurodesenvolvimento, deve-se considerar segundo a teoria da plasticidade fenotípica, que a alteração dos níveis desta monoamina durante o período neonatal pode modificar a expressão do comportamento alimentar na vida adulta.

2.5 ALTERAÇÕES NO SISTEMA SEROTONINÉRGICO CENTRAL: RELAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO PERINATAL A DIETAS HIPERLIPÍDICAS E OS DISTÚRBIOS METABÓLICOS E NO BALANÇO ENERGÉTICO

Na década de 90, com o estudo das causas biológicas da obesidade e dos distúrbios alimentares, identificou-se que alterações no sistema serotoninérgico podem ser a causa dessas desordens alimentares. Dessa forma, muitos medicamentos serotoninérgicos foram indicados para tratamento dessas desordens. Hoje já se discute que a exposição à obesidade materna e ao consumo de dieta com alto teor de gordura pode ser a causa de alterações no sistema serotoninérgico e, subsequentemente, essas alterações podem desregular o balanço energético e o metabolismo gerando obesidade e doenças crônicas associadas (SULLIVAN; NOUSEN; CHAMLOU, 2014).

Estudos utilizando como modelo animal primatas não-humanos vêm demonstrando que a exposição perinatal a dietas hiperlipídicas em várias fases do desenvolvimento promovem alterações persistentes no sistema serotoninérgico. Sullivan e colaboradores (2010) observaram que o consumo materno de dieta hiperlipídica provoca aumento da expressão gênica da enzima triptofano hidroxilase 2 (TPH-2) bem como “*upregulation*” do receptor 5-HT_{1A} na região rostral do núcleo dorsal da rafe em fetos de primatas não-humanos (SULLIVAN; GRAYSON; TAKAHASHI; ROBERTSON *et al.*, 2010). Essas alterações ocorreram independentemente das mães serem obesas ou apresentarem alterações metabólicas (SULLIVAN; GRAYSON; TAKAHASHI; ROBERTSON *et al.*, 2010). Apesar disso, as projeções serotoninérgicas para o hipotálamo não foram

prejudicadas pela exposição (SULLIVAN; GRAYSON; TAKAHASHI; ROBERTSON *et al.*, 2010). Em camundongos, a exposição materna a dieta hiperlipídica antes, durante e após a gestação (na fase de lactação) também promoveu aumento do receptor 5-HT_{1A} na região ventral do hipocampo na vida adulta (PELEG-RAIBSTEIN; LUCA; WOLFRUM, 2012). Associado a isso, esses animais apresentaram comportamentos emocionais anormais relacionados à ansiedade (PELEG-RAIBSTEIN; LUCA; WOLFRUM, 2012).

Outro estudo realizado em primatas não-humanos, mostrou que a exposição perinatal à dieta hiperlipídica e à obesidade materna não gera apenas riscos metabólicos, mas também prejudicam o desenvolvimento sistema serotoninérgico central em longo prazo (THOMPSON; VALLEAU; BARLING; FRANCO *et al.*, 2017). Algumas das alterações observadas incluem a redução da expressão gênica da enzima TPH-2 no núcleo dorsal da rafe e prejuízo no desenvolvimento da síntese central de serotonina em animais jovens (THOMPSON; VALLEAU; BARLING; FRANCO *et al.*, 2017). Além disso, a exposição a dieta hiperlipídica após desmame reduziu a imunoreatividade serotoninérgica no córtex pré-frontal (THOMPSON; VALLEAU; BARLING; FRANCO *et al.*, 2017). Apesar da normalização da dieta após desmame, não foi possível melhorar muitas das alterações comportamentais observadas, como o aumento de ansiedade (THOMPSON; VALLEAU; BARLING; FRANCO *et al.*, 2017).

Koopman e colaboradores (2013) apontam que existe uma relação entre o sistema serotoninérgico encefálico e a obesidade e refletem se mudanças neste sistema de neurotransmissão são causa ou consequência da obesidade (KOOPMAN; BOOIJ; FLIERS; SERLIE *et al.*, 2013). Para isso, esses pesquisadores investigaram se hábitos alimentares obesogênicos reduziram a afinidade do transportador de serotonina (SERT) no hipotálamo em 25 homens (normopeso) expostos a uma dieta rica em gordura e açúcares por 6 semanas (KOOPMAN; BOOIJ; FLIERS; SERLIE *et al.*, 2013). Como resultado, obteve-se aumento do peso corporal e redução da afinidade do SERT (KOOPMAN; BOOIJ; FLIERS; SERLIE *et al.*, 2013).

Em conjunto, diversos estudos em roedores e primatas não-humanos indicaram que exposição perinatal à dieta hiperlipídica promoveu adaptações fenotípicas no balanço energético e metabolismo da prole em longo prazo

(SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011). Os resultados incluem hiperfagia e maior consumo de açúcar e gordura, fatores que contribuem para o desenvolvimento de disfunções metabólicas e obesidade (SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011). Os mecanismos através dos quais esses efeitos ocorrem podem estar subjacentes a alterações em sistemas centrais cruciais para o balanço energético como o sistema serotoninérgico e melanocortinérgico (SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011).

Periféricamente, a alteração da atividade serotoninérgica também foi associada à menor atividade termogênica no tecido adiposo marrom (TAM) (LIANG; YANG; ZHANG; MARICELLI *et al.*, 2016). Este estudo demonstrou que o consumo materno de dieta hiperlipídica durante a lactação reduz a termogênese no TAM e aumenta a quantidade de serotonina periférica em camundongos ao desmame (LIANG; YANG; ZHANG; MARICELLI *et al.*, 2016). Sabe-se que a inibição da síntese periférica de serotonina melhora a termogênese reduzindo a obesidade e disfunção metabólica (CRANE; PALANIVEL; MOTTILLO; BUJAK *et al.*, 2015). Dessa forma, o aumento dos níveis periféricos de 5-HT pode ser subjacente à redução da termogênese, reduzindo a sensibilidade do TAM ao estímulo simpático e levando a desordens metabólicas persistentes (LIANG; YANG; ZHANG; MARICELLI *et al.*, 2016).

A exposição perinatal à dieta hiperlipídica programa o balanço energético, o metabolismo e o comportamento da prole na vida adulta (SULLIVAN; RIPER; LOCKARD; VALLEAU, 2015; SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011). Neste contexto, a dieta materna e, conseqüentemente, o metabolismo materno durante o desenvolvimento inicial tem longo impacto sobre vias centrais de neurotransmissão em modelos animais, como por exemplo, o sistema serotoninérgico (SULLIVAN; NOUSEN; CHAMLOU; GROVE, 2012; SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011). A causa dessas alterações em sistemas neurais pode estar associada ao aumento de fatores inflamatórios (citocinas), nutrientes (glicose, triglicerídeos) e hormônios (leptina, insulina) na circulação bem como à disfunção placentária subsequente ao consumo materno de dieta com alto teor de gordura (RIVERA; CHRISTIANSEN; SULLIVAN, 2015; SULLIVAN; NOUSEN; CHAMLOU; GROVE, 2012; SULLIVAN; RIPER; LOCKARD; VALLEAU, 2015; SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011). Esse contexto/ambiente materno gera, por exemplo, inflamação encefálica e alterações no sistema serotoninérgico, o que implica em mudanças no desenvolvimento encefálico

(SULLIVAN; ROPER; LOCKARD; VALLEAU, 2015). Evidências de estudos com primatas não-humanos e roedores mostram que a exposição ao consumo materno de dieta hiperlipídica aumenta o risco de obesidade e desordens metabólicas na vida adulta (SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011). Hiperfagia e aumento da preferência por alimentos gordurosos e açucarados também contribuem para aumentar o risco de obesidade (SULLIVAN; SMITH; GROVE, 2011).

2.6 REPERCUSSÕES PRECOSES E TARDIAS DA INIBIÇÃO NEONATAL DA RECAPTAÇÃO DE SEROTONINA SOBRE O BALANÇO ENERGÉTICO E PERFIL METABÓLICO DA PROLE

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

Dados não publicados de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a ISNRS altera o comportamento alimentar (sequência comportamental de saciedade) com antecipação da saciedade e redução da ingestão alimentar relativa, bem como do tempo de alimentação em ratos aos 180 dias de vida. Esses animais também apresentaram aumento da quantidade de serotonina no hipotálamo e do número de neurônios ativos no Arc após estímulo alimentar. Ou seja, a INRS parece modificar o fenótipo alimentar caracterizado por hipofagia. Além disso, a INRS promoveu maior expressão do receptor 5-HT_{2C} no hipotálamo associada a menor acúmulo de tecido adiposo abdominal após exposição prolongada à dieta hiperlipídica/hipercalórica (GALINDO; BARROS MDA; PINHEIRO; SANTANA *et al.*, 2015). Nós acreditamos que isso ocorre devido ao aumento da atividade da via anorexígena no Arc. Assim, nós propusemos investigar a responsividade das vias anorexígenas e orexígenas no Arc do hipotálamo frente a estímulo agudo com os agonistas serotoninérgicos dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B}.

Em relação ao gasto energético, diversos estudos de nosso grupo de pesquisa apontam que a INSR promove um fenótipo caracterizado como “*lean phenotype*”. Ratos submetidos ao tratamento neonatal com fluoxetina apresentam, na vida adulta, menor peso e gordura corporal, maior capacidade termogênica associada ao aumento da atividade da proteína UCP-1 no TAM e maior consumo de oxigênio em tecidos chave para o metabolismo como o músculo esquelético e o TAM (DA SILVA; BRAZ; PEDROZA; NASCIMENTO *et al.*, 2015; DA SILVA; BRAZ; SILVA-FILHO; PEDROZA *et al.*, 2015; DA SILVA; MONTEIRO GALINDO; NASCIMENTO; MOURA FREITAS *et al.*, 2014). A região encefálica responsável pela regulação homeostática do balanço energético, o hipotálamo, também apresentou menor estresse oxidativo (DA SILVA; MONTEIRO GALINDO; NASCIMENTO; MOURA FREITAS *et al.*, 2014).

Ademais, nenhum estudo até agora investigou os efeitos da inibição neonatal da recaptação da serotonina sobre os efeitos do maior aporte nutricional perinatal sobre o balanço energético e metabolismo em prole. Mas, alguns artigos apontam a função da maior disponibilidade de serotonina, através de fármacos que inibem sua recaptação, sobre as consequências metabólicas do consumo desse tipo de dieta. Watanabe e colaboradores demonstraram que a administração periférica de serotonina em camundongos expostos a dieta hiperlipídica atenua a obesidade e desordens metabólicas via aumento do gasto energético no músculo esquelético (WATANABE; NAKANO; SAITO; AKASAKA *et al.*, 2016). Outro estudo mostra que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos prejudica a neurotransmissão serotoninérgica (KURHE; MAHESH, 2015). No entanto, o tratamento com escitalopram recupera a neurotransmissão serotoninérgica melhorando alterações emocionais (ansiedade/depressão) associadas a obesidade (KURHE; MAHESH, 2015). O tratamento crônico com escitalopram também reduziu significativamente os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteínas de baixa densidade, assim como aumentou os níveis de lipoproteínas de alta densidade e regrediu de alterações ateroscleróticas em ratos alimentados com dieta com alto teor de gordura (UNIS; ABDELBARY; HAMZA, 2014). Dessa forma, também nos propusemos a investigar se a INRS seria capaz de atenuar ou mesmo reverter as repercussões da exposição perinatal a dieta hiperlipídica/hipercalórica sobre indicadores do balanço energético.

3 JUSTIFICATIVA

Influências ambientais no início da vida podem promover consequências em longo prazo, especialmente se acontecem durante os períodos críticos de desenvolvimento (fetal, neonatal ou infância) (STEARNS; DE JONG; NEWMAN, 1991; WEST-EBERHARD, 1986a; 2005a). Baseadas na teoria da plasticidade fenotípica, muitas publicações nacionais e internacionais, inclusive do nosso grupo de pesquisa, visam o esclarecimento das possíveis alterações promovidas por agravos ambientais durante o período perinatal (DEIRO; MANHAES-DE-CASTRO; CABRAL-FILHO; BARRETO-MEDEIROS *et al.*, 2006; DEIRO; MANHAES-DE-CASTRO; CABRAL-FILHO; SOUZA *et al.*, 2004; MENDES-DA-SILVA; DE SOUZA; BARRETO-MEDEIROS; DE FREITAS-SILVA *et al.*, 2002; SILVA; GONCALVES; MANHAES-DE-CASTRO; NOGUEIRA, 2010).

Devido à importância da serotonina para o desenvolvimento do sistema nervoso central e para a modulação do comportamento alimentar e da utilização de energia, nosso grupo de pesquisa tem se concentrado em estudar os efeitos da alteração perinatal dos níveis encefálicos desta monoamina sobre o controle do comportamento alimentar e as repercussões metabólicas tardias em animais experimentais. Através da inibição neonatal da recaptação de serotonina (INRS), demonstramos que o aumento de serotonina na lactação promove menor peso corporal, hipofagia, redução da expressão de NPY em ratos adultos (DA SILVA; MONTEIRO GALINDO; NASCIMENTO; MOURA FREITAS *et al.*, 2014; GALINDO; BARROS MDA; PINHEIRO; SANTANA *et al.*, 2015). Além disso, a INRS reduziu o acúmulo de gordura abdominal em ratos adultos frente ao consumo de dieta hiperlipídica/hipercalórica (GALINDO; BARROS MDA; PINHEIRO; SANTANA *et al.*, 2015). Outros estudos ainda apontaram que a INRS promove um estado hipermetabólico e aumento da função mitocondrial em ratos, aumentando sua capacidade respiratória (DA SILVA; BRAZ; PEDROZA; NASCIMENTO *et al.*, 2015; DA SILVA; BRAZ; SILVA-FILHO; PEDROZA *et al.*, 2015; KUMMET; HASKELL; HERMANN; NI *et al.*, 2012). Esses resultados sugerem que a maior disponibilidade sináptica de serotonina está intimamente relacionada à modulação do comportamento alimentar e seus desdobramentos metabólicos.

Por outro lado, o ambiente nutricional materno também é determinante para o desenvolvimento da prole durante o período inicial da vida. Dessa forma, a

adequada alimentação durante a gestação e lactação é imprescindível (DESAI; HALES, 1997). No entanto, a alimentação da sociedade atual é caracterizada por consumo elevado de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* (SHARMA; ZHUANG; GOMEZ-PINILLA, 2012). Neste contexto, o consumo materno perinatal de dieta rica em gorduras tem sido associada à alteração do balanço energético (sobrepeso, maior consumo alimentar e alterações metabólicas) e maior susceptibilidade dos descendentes à obesidade (BAYOL; SIMBI; STICKLAND, 2005; MELO; BENATTI; IGNACIO-SOUZA; OKINO *et al.*, 2014) (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Há ainda uma interação deste tipo de dieta sobre a dinâmica do sistema serotoninérgico (SULLIVAN; GRAYSON; TAKAHASHI; ROBERTSON *et al.*, 2010; ZEMDEGS; QUESSEVEUR; JARRIAULT; PENICAUD *et al.*, 2016).

A alimentação da sociedade atual é marcada por um consumo de dieta rica em gorduras (SHARMA; ZHUANG; GOMEZ-PINILLA, 2012). Além disso, distúrbios no comportamento alimentar e alterações metabólicas estão presentes na sociedade atual e aumentam a susceptibilidade a doenças metabólicas e crônicas como a obesidade. Dados recentes da organização mundial de Saúde (OMS) mostram que mais de 1,4 bilhões de adultos apresentam sobrepeso, destes 500 milhões são obesos (OMS, 2013). Essa doença impacta de forma negativa a qualidade de vida do indivíduo podendo evoluir associada a outras doenças crônico-degenerativas e alterações psicossocioeconômicas (OMS, 2013). Dessa forma, este projeto visa investigar se a inibição neonatal da recaptação de serotonina pode atenuar os efeitos de uma dieta hiperlipídica/hipercalórica, administrada perinatalmente, em ratos jovens e aumentar a sensibilidade das vias anorexígenas no Arc do hipotálamo em ratos adultos.

4 HIPÓTESE

A inibição neonatal da recaptação de serotonina reverte os efeitos da exposição perinatal à dieta hiperlipídica/hipercalórica sobre o balanço energético e perfil metabólico em ratos jovens e aumenta a atividade neuronal em resposta a estímulo agudo com agonista do receptor 5-HT_{2C} e/ou reduz a atividade neuronal frente ao agonista do receptor 5-HT_{1B} no núcleo arqueado do hipotálamo na idade adulta.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da inibição neonatal da recaptação de serotonina sobre o balanço energético e perfil metabólico em prole jovem provinda de nutrizes alimentadas com hiperlipídica/hipercalórica durante a gestação e lactação.

Estudar os efeitos da inibição neonatal da recaptação de serotonina sobre o fenótipo alimentar e a atividade neuronal no núcleo arqueado do hipotálamo em resposta a estímulo agudo com agonistas dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B} em ratos adultos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em prole jovem submetida à dieta hiperlipídica/hipercalórica perinatalmente e à inibição neonatal da recaptação da serotonina:

- Evolução ponderal;
- Indicadores de desenvolvimento somático;
- Comportamento alimentar;
- Componentes do gasto energético;
- Indicadores do metabolismo de lipídeos e carboidratos;
- Atividade neuronal no hipotálamo em resposta a estímulo alimentar.

Avaliar em ratos adultos submetidos à inibição neonatal da recaptação da serotonina:

- Peso corporal;
- Comportamento alimentar;
- Atividade neuronal no núcleo arqueado do hipotálamo em resposta a estímulo agudo com agonistas dos receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B}.

6 MÉTODO

6.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* provenientes da colônia do departamento de nutrição, biotério José Paulino Ventura Ramos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Desde o período de adaptação até a eutanásia, os animais foram mantidos em biotério de experimentação do departamento de nutrição da UFPE com temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), sistema de exaustão, ciclo invertido de 12/12h (escuro: 08h-20h; claro: 20h-08h) e livre acesso à água e a alimentação (Presence®). O manejo dos animais, os experimentos e os métodos de eutanásia seguiram as recomendações da “DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS - DBCA” e as “DIRETRIZES PARA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA” (CONCEA, 2013). Os experimentos realizados para esta tese foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFPE (Experimento 1: Ofício nº 119/16 e Processo nº 0045/2016; Experimento 1: Ofício nº 44/15 e Processo nº 23076.010005/2015-57).

6.2 EXPERIMENTO 1

Ratas *Wistar* ($n=12$) foram selecionadas aleatoriamente para constituir dois grupos experimentais segundo a manipulação dietética: Dieta Controle (CTRL, $n=8$) e Dieta Hiperlipídica/Hipercalórica (DHH, $n=4$). O grupo CTRL continuou recebendo dieta padrão de biotério (Presence®). Já o grupo DHH começou a receber uma dieta Hiperlipídica/Hipercalórica três dias antes do acasalamento, como forma de adaptação (CADENA-BURBANO et al., 2017) (Tabelas 1 e 2). Após constatação da prenhez através da evolução ponderal, as ratas foram dispostas em gaiolas individuais. As dietas foram administradas até o 21º dia de lactação. O desmame ocorreu ao 22º dia pós-natal dos filhotes (22º DPN). Do dia do desmame até o final dos experimentos, a prole recebeu dieta padrão de biotério (Presence®).

No 1º DPN, as ninhadas pertencentes aos grupos CTRL e DHH foram ajustadas para conter 8 filhotes machos/ninhada (fêmeas foram utilizadas para completar as ninhadas) que foram mantidos com a nutriz até o desmame (22º DPN). De cada ninhada ($n=8$), metade dos filhotes foi tratado com solução salina estéril (NaCl 0.9%, 10 µl/g, $n=4$ /ninhada) e outra metade com solução de fluoxetina (10mg/Kg; 10 µl/g, $n=4$ /ninhada).

Tabela 1 - Composição centesimal da dieta experimental hiperlipídica e hipercalórica.

Ingredientes	Dieta Hiperlipídica/ Hipercalórica (DHH) (g/100g)
Caseína (>85% proteína)	25,2
Amido de milho (87% carboidrato)	24,50
Amido dextrinizado (92% carboidrato)	8,0
Sacarose	6,17
Óleo de soja	7,00
Banha animal (100% lipídeo)	19,00
Celulose	5,00
Mix mineral (AIN-93G)	3,50
Mix vitamínico	1,00
L-Metionina	0,30
Bitartarato de colina	0,25
TBHQ	0,0014
TOTAL (g)	100
Valor Energético Kcal/g	4,62

Fonte: Adaptado de (CADENA-BURBANO; CAVALCANTI; LAGO; BENJAMIM *et al.*, 2017; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Os cálculos da composição centesimal foram baseados nas informações nutricionais enviadas pela empresa fornecedora dos produtos.

Tabela 2 - Composição percentual de macronutrientes da dieta hiperlipídica e hipercalórica segundo o Valor Energético Total (VET).

VET por Macronutrientes	Dieta Hiperlipídica Hipercalórica (DHH)
Proteína	18,7
Carboidrato	30,3
Lipídeo	51

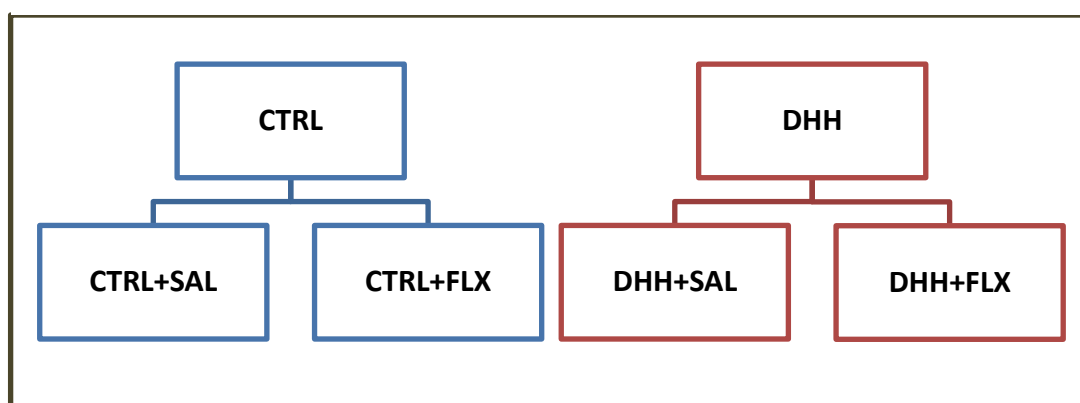
Fonte: Adaptado de (CADENA-BURBANO; CAVALCANTI; LAGO; BENJAMIM *et al.*, 2017; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Os cálculos da composição centesimal foram baseados nas informações nutricionais enviadas pela empresa fornecedora dos produtos.

A fluoxetina (Roval®) foi diluída em salina estéril para uma concentração de 1mg/ml. Os tratamentos foram realizados por via subcutânea (s.c.), diariamente, entre 09:00h e 10:00h, uma hora após o início do ciclo escuro (MATEOS; SANCHEZ; PAREDES; BARRIGA *et al.*, 2009), do 1º ao 21º dia de lactação. Seguem os grupos formados a partir desta manipulação farmacológica (Figura 1):

- 1- Grupo CTRL+SAL: filhotes provenientes do grupo CTRL e tratados com salina estéril durante a lactação (SAL, n=4/ninhada);

- 2- Grupo CTRL+FLX: filhotes provenientes do grupo CTRL e tratados com fluoxetina durante a lactação (FLX, n=4/ninhada);
- 3- Grupo DHH+SAL: filhotes provenientes do grupo DHH e tratados com solução salina durante a lactação (SAL, n=4/ninhada);
- 4- Grupo DHH+FLX: filhotes provenientes do grupo DHH e tratados com fluoxetina durante a lactação (FLX, n=4/ninhada).

Figura 1 - Organograma dos grupos experimentais 1.

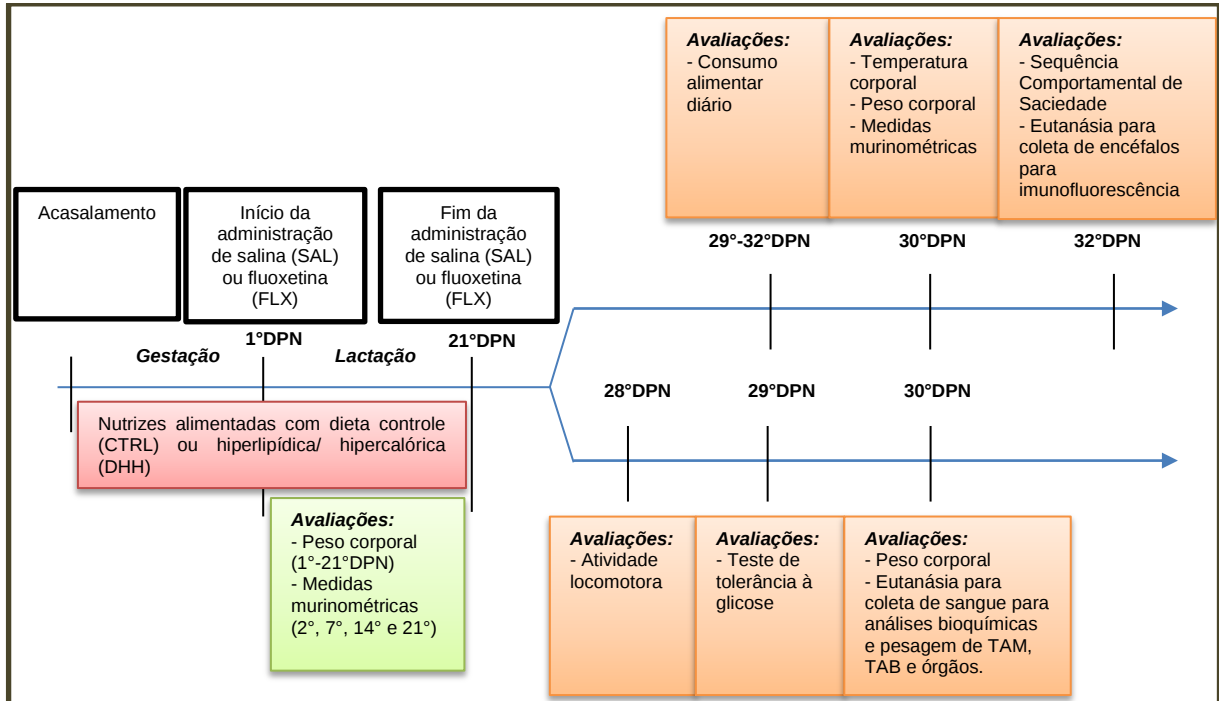


Fonte: BARROS (2019).

Durante a intervenção farmacológica, os neonatos foram pesados todos os dias. Já as medidas murinométricas foram obtidas no 2º, 7º, 14º e 21º DPN. Após o desmame, os animais foram avaliados na fase jovem. O peso corporal também foi avaliado aos 30 dias de vida em todos os animais. Uma parte dos animais de cada grupo experimental foi avaliada quanto ao Consumo Alimentar Diário (CAD) do 29º ao 32º DPN. Aos 30 dias de vida, a temperatura corporal e as medidas murinométricas foram mensuradas nestes mesmos animais. Ao final do CAD, no 32º DPN, foi realizada a análise da Sequência Comportamental de Saciedade. Em seguida, os animais foram anestesiados e perfundidos para coleta dos encéfalos os quais foram utilizados para imunofluorescência contra proteína c-fos. A outra parte dos animais de cada grupo experimental foi submetida à análise da atividade locomotora, através do campo aberto, aos 28 dias de vida. Já o teste de tolerância à glicose foi realizado no 29º DPN. Os animais que passaram por estes testes foram eutanasiados por decapitação para coleta de sangue utilizado para análises bioquímicas. Neste mesmo procedimento, foi realizada a dissecação e pesagem de coxins do tecido adiposo branco, do tecido adiposo marrom e de órgãos. (Figura 2).

Para cada experimento foram utilizados apenas dois animais de cada ninhada, para diminuir a interferência do padrão genético nos resultados a serem obtidos.

Figura 2 - Desenho experimental 1.



Fonte: BARROS (2019).

6.2.1 Peso corporal

Os animais foram pesados durante toda a lactação do 1º ao 21º DPN, diariamente, e aos 30 dias de vida. Para isto, utilizou-se balança de precisão (Marte®).

6.2.2 Medidas murinométricas

As medidas murinométricas foram realizadas no 2º, 7º, 14º, 21º e 30º DPN. A obtenção foi realizada utilizando-se paquímetro digital com acurácia de 0,01mm e uma fita inelástica antropométrica de acordo com Da Silva e colaboradores em 2005 (DA SILVA et al., 2005).

6.2.3 Consumo Alimentar Diário (CAD)

O consumo alimentar diário (CAD) foi avaliado do 29º ao 32º DPN. O CAD foi calculado pela média aritmética do consumo alimentar em cada dia, o qual foi mensurado através da diferença entre a quantidade de dieta oferecida e a quantidade rejeitada a cada 24 horas durante três dias consecutivos.

6.2.4 Temperatura

A temperatura corporal foi verificada, aos 30 dias de vida, em °C. Utilizou-se termômetro de infra-vermelho. Durante a avaliação, a luz infra-vermelha do equipamento foi apontada para a região do dorso anterior do animal onde fica localizado, abaixo das camadas dérmicas, o tecido adiposo marrom.

6.2.5 Sequência Comportamental de Saciedade

A avaliação do comportamento alimentar foi feita através da análise da Sequência Comportamental de Saciedade (SCS), método descrito por Halford e colaboradores (1998) (HALFORD et al., 1998). Para realização da SCS, animais aos 32 dias de vida foram submetidos a jejum de três horas. O jejum foi iniciado às 08 horas, início da fase escura do ciclo de luz (SANCHEZ et al., 2008). A filmagem para o estudo da SCS foi iniciada às 11 horas.

O estudo da SCS teve início com a oferta de 30 gramas de dieta padrão de biotério. A partir desse momento, o animal foi filmado durante 60 minutos por câmera com sistema de infravermelho. O vídeo foi armazenado em computador para posterior análise dos comportamentos de alimentação, limpeza e descanso. Após 60 minutos de exposição ao alimento, foram realizadas as medidas de consumo. O consumo alimentar foi obtido pela diferença entre a quantidade de ração oferecida e a quantidade de ração restante no final da SCS. A partir dessa medida, foi calculado o Consumo Alimentar Relativo [razão entre o consumo alimentar (g) e o peso corporal (g)] e a Taxa Alimentar [razão entre o consumo alimentar relativo (g) e o tempo de alimentação (segundos)].

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

6.2.6 Imunofluorescência contra proteína c-fos

Vários estudos têm detectado padrões únicos de expressão de c-fos em resposta a estímulos específicos, inclusive, estímulos alimentares (LOPES-DE-SOUZA et al., 2008; CHEN et al., 2011). Aos 32 dias de vida, a reatividade neuronal no Arc foi avaliada através de imunofluorescência contra proteína c-fos. Após a SCS (duração de uma hora), o alimento continuou disponível por mais trinta minutos, somando noventa minutos de exposição alimentar, tempo necessário para expressão da referida proteína (SAGAR et al., 1988).

Em seguida, os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com 200 ml de solução fisiológica (NaCl, 0,9%) e 400 ml de solução fixadora (4% de paraformaldeído em 4% de PBS, pH 7.4, a 4°C) (NOGUEIRA et al., 1997). Após perfusão, os encéfalos foram retirados do crânio, pós-fixados na mesma solução fixadora por quatro horas e armazenados em solução de sacarose (30%).

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

As reações de imunofluorescência ocorreram em dois dias. No primeiro dia (à tarde), foi realizada a reação primária que compreendeu 5 etapas: 1) lavagem dos cortes com PBS-T (solução à 0.1% de Triton X-100 em PBS 10 mM) por 15 minutos; 2) os cortes foram incubados em solução à 1% de H₂O₂ em Metanol) durante 5 minutos; 3) lavagem dos cortes, por 5 minutos, em PBS 10 mM gelado; 4) os cortes foram incubados em solução de blocagem à 1% feita com BSA (albumina bovina - Sigma®) diluída em PBS-T (0.1%) por 1 hora; e, 5) os cortes foram incubados com o anticorpo primário (coelho anti-c-fos – Santa Cruz Biotechnology®), na proporção de 1:1000, em solução de blocagem *“overnight”*.

No dia seguinte (de manhã), foi realizada a reação secundária constituída por mais 6 etapas: 6) 4 lavagens com PBS-T (0.1%) por 5 minutos cada; 7) incubação do anticorpo secundário (burro anti-coelho, Alexa flúor 488 – Life Technologies®), na

proporção de 1:500, em PBS-T (0.1%); 8) 5 lavagens de 5 minutos (cada) com PBS-T (0.1%); 9) incubação do DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich/Merk®) durante 5 minutos; 10) 3 lavagens com PBS 10 mM por 5 minutos cada; e, 11) montagem das lâminas com Prolong-Gold®. As etapas 1, 3, 6, 8 e 10 ocorreram em cubas de 8 ml com capacidade para 8 lâminas. Já as etapas 2, 4, 5, 7 e 9 foram realizadas com as lâminas posicionadas na horizontal em cuba de acrílico escura contendo água para manutenção da umidade. Para estas etapas, foi utilizado um volume total de 700 µl por lâmina que era aplicado diretamente sobre a própria lâmina/cortes. Após montagem, as lâminas secaram em temperatura ambiente por 24-48 e armazenadas a 4°C (geladeira) para posterior captura das imagens.

A visualização das lâminas e a captura das imagens foram feitas em microscópio de fluorescência (Zeiss®) acoplado a câmera, em aumento de 5x. Posteriormente, as imagens adquiridas foram processadas no programa ImageJ® para quantificação dos neurônios reativos contra c-fos no Arc. Foram considerados os seguintes bregmas segundo as diretrizes do atlas estereotático de Paxinos e Watson (2005): -1.92 mm, -2.52 mm e -3.12 mm. O número de neurônios reativos por animal foi determinado pela média aritmética das quantidades de neurônios reativos em cada bregma.

6.2.7 Atividade locomotora (Campo aberto)

A atividade locomotora foi avaliada através do método do campo aberto aos 28 dias de vida. As filmagens ocorreram em sala escura anexa ao biotério entre as 12-13 horas, no ciclo escuro, momento que o animal se encontra em estado de vigília. Foi utilizado um sistema de monitoramento em campo aberto circular (Ø1m) já instalado, delimitado por paredes de 30 cm de altura, com superfícies internas de cor preta e em sua base uma superfície de EVA (etil vinil acetato) também preta, de forma que seja obtido um maior contraste entre o animal e o campo. Uma câmera digital (VTR® 6638 – CCTV System) com sensor de infravermelho e LED de iluminação conectada a um computador é fixa ao teto e posicionada de forma vertical no centro do campo a fim de filmar o animal enquanto o mesmo se movimentar. A câmera encontrava-se a uma distância de 2.65m do solo. Para as filmagens foi utilizado o software Pico2000® (ARAGAO RDA; RODRIGUES; DE BARROS; SILVA *et al.*, 2011). A livre movimentação do animal foi registrada (5

minutos) e o filme foi convertido em quadros (454 quadros para cada filmagem de 5 minutos, com intervalo de tempo de aproximadamente 0,661s entre os quadros) utilizando o software CapturaSeqAVI[®]. Com o uso do software MATLAB[®] versão 7.0, foram realizadas as análises das imagens captadas, e posteriormente, a extração de algumas grandezas físicas para obtenção de informações acerca do comportamento do animal. Os parâmetros avaliados foram: Distância Percorrida (m); Velocidade Média de deslocamento (m/s); Potência Média (mW); Energia Cinética (Joules, J); Número de paradas (n); Tempo parado (seg); Relação de tempo total parado/Número de Paradas (seg); e, Tempo nas áreas 1, 2 e 3 (s). O campo é subdividido em 3 áreas circulares, sendo a área 1 a central, a área 2 a intermediária e a área 3 a periférica, cada área com o mesmo valor de raio (raio total do campo, R, de 50 cm, dividido em 3 partes, r).

6.2.8 Teste de Tolerância à Glicose

No teste de tolerância à glicose (GTT), após 12 horas de jejum, animais com 30 dias de vida foram submetidos à primeira coleta de sangue (tempo 0) através de corte na extremidade da cauda, para retirada de uma alíquota de 10µl. Em seguida, foi administrada por via intraperitoneal uma solução de glicose a 50% (Equiplax Indústria Farmacêutica Ltda., Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) na dose de 1mg/g de peso do animal e outras amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. A análise da concentração de glicose foi realizada através de aparelho comercial (Accutrend Check – Roche[®]). A glicemia em cada tempo foi utilizada para o cálculo da “*area under the curve*”. (LE FLOCH, ESCUYER *et al.*, 1990; FIDALGO, FALCAO-TEBAS *et al.*, 2012).

6.2.9 Análises bioquímicas

Aos 30 dias de vida, logo após eutanásia por decapitação, o sangue foi coletado e utilizado para análise de triglicerídeos e colesterol (totais) plasmáticos através do teste colorimétrico Roche Diagnosis – Brazil[®].

6.2.10 Peso de tecido adiposo branco, marrom e órgãos.

Aos 30 dias de vida, logo após eutanásia por decapitação e retirada do sangue, foram dissecados e quantificados através de balança de precisão (Marte[®]): o tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom, encéfalo, rim (esquerdo), baço, fígado, coração e glândula supra-renal (esquerda). Os seguintes coxins adiposos foram

dissecados e coletados para pesagem: inguinal, perirenal, retroperitoneal, mesentérico e epididimal. Foi padronizado o lado esquerdo do animal para retirada das amostras, exceto para a gordura mesentérica da qual será retirada todo o coxim. Além destes coxins adiposos, o restante da gordura abdominal também foi retirado e pesado para quantificação do tecido adiposo branco total.

6.2.11 Estatística

Para comparação entre os diferentes grupos, será empregada a Análise de Variância, ANOVA *two way*, quando se tratar de dados paramétricos. Quando a ANOVA revelar a existência de diferença significativa, será utilizado o pós-teste de Bonferroni, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. Para os dados não paramétricos, será utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. A significância estatística será considerada, admitindo-se um nível crítico de 5% em todos os casos. A análise dos dados será realizada por meio do programa estatístico GraphPad Prism 5®.

6.3 EXPERIMENTO 2

Ratas virgens (n=15), com 120 dias de vida e peso ideal para a idade (220 gramas) foram transportadas para o biotério de experimentação e alocadas na proporção de duas fêmeas por gaiola. Após período de adaptação de 15 dias, as ratas foram colocadas para acasalamento na proporção de duas fêmeas para um macho. A prenhez foi confirmada pelo aumento progressivo do peso corporal das ratas, as quais foram alocadas individualmente até o nascimento dos filhotes.

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

Do 1° ao 21° DPN, foi realizada a inibição neonatal da recaptação de serotonina. Para isso foi utilizado o fármaco fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, obtido na forma de cloridrato de fluoxetina (Roval®) e

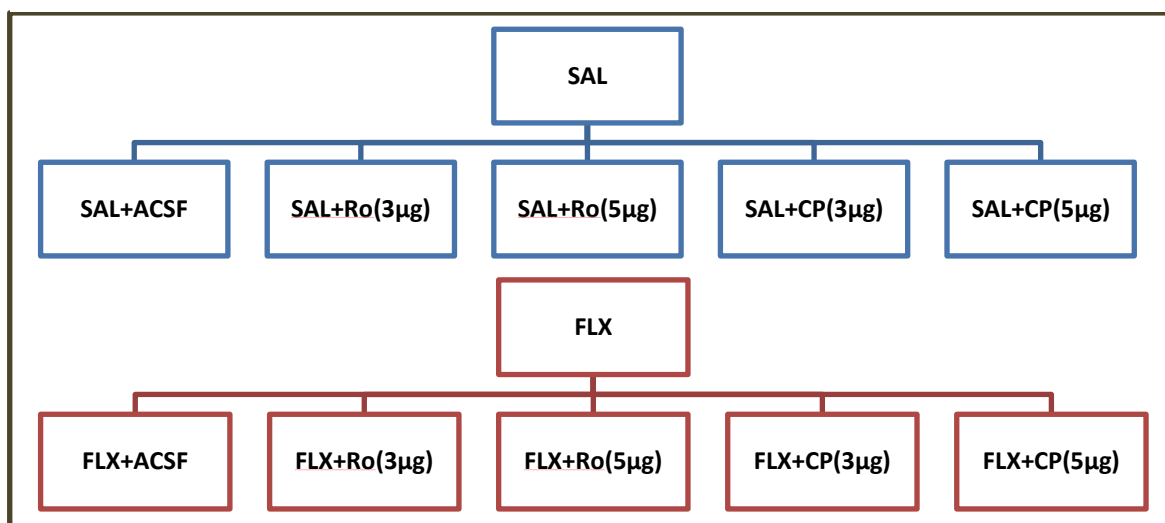
dissolvido em solução fisiológica (Salina Estéril: NaCl 0.9%) para uma concentração de 1 mg/ml (SILVA et al., 2010). Os neonatos foram tratados com dose de 10 µl/g, por via subcutânea, diariamente, uma hora após o início do ciclo escuro (às 09 horas) (SILVA et al., 2010). Nesse horário ocorre o pico de liberação de 5-HT no hipotálamo, potencializando a ação do fármaco (MATEOS et al., 2009). Durante toda a intervenção, o peso corporal dos neonatos foi aferido diariamente.

De cada ninhada (n=8 neonatos), quatro filhotes receberam solução salina e quatro filhotes foram tratados com fluoxetina, gerando dois grupos experimentais: Salina (SAL) e Fluoxetina (FLX). No 22º DPN foi realizado o desmame. Aos 80 dias de vida, os animais foram submetidos à cirurgia de estereotaxia para implantação de cânula no ventrículo lateral direito. Aos 90 dias de vida, os animais dos grupos SAL e FLX foram pesados e subdivididos, aleatoriamente, em 10 grupos experimentais de acordo com o tipo de injeção intracerebroventricular (ICV) (Figura 3):

- 1- Grupo SAL+ACSF: animais do grupo SAL receberam solução fisiológica de “*Artificial Cerebrospinal Fluid*” (ACSF) no volume de 5µl via ICV (FLETCHER et al., 2009; CLISSOLD et al., 2013);
- 2- Grupo SAL+Ro(3µg): animais do grupo SAL receberam 3µg de agonista do receptor 5-HT_{2C} – Ro 60-0175 ((S)-2-(6-chloro-5- fluoroindol-1-yl)-1-methylethylamine fumarate) (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel®) – no volume de 5µl via ICV (FLETCHER et al., 2009);
- 3- Grupo SAL+Ro(5µg): animais do grupo SAL receberam 5µg de agonista do receptor 5-HT_{2C} – Ro 60-0175 ((S)-2-(6-chloro-5- fluoroindol-1-yl)-1-methylethylamine fumarate) (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel®) – no volume de 5µl via ICV (FLETCHER et al., 2009);
- 4- Grupo SAL+CP(3µg): animais do grupo SAL receberam 3µg de agonista do receptor 5-HT_{1B} – CP 93129 (Tocris Biosciences®) – no volume de 5µl via ICV (CLISSOLD et al., 2013);
- 5- Grupo SAL+CP(5µg): animais do grupo SAL receberam 5µg de agonista do receptor 5-HT_{1B} – CP 93129 (Tocris Biosciences®) – no volume de 5µl via ICV (CLISSOLD et al., 2013);
- 6- Grupo FLX+ACSF: animais do grupo FLX receberam solução fisiológica de “*Artificial Cerebrospinal Fluid*” (ACSF) no volume de 5µl via ICV (FLETCHER et al., 2009; CLISSOLD et al., 2013);

- 7- Grupo FLX+Ro(3µg): animais do grupo FLX receberam 3µg de agonista do receptor 5-HT_{2C} – Ro 60-0175 ((S)-2-(6-chloro-5- fluoroindol-1-yl)-1-methylethylamine fumarate) (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel®) – no volume de 5µl via ICV (FLETCHER et al., 2009);
- 8- Grupo FLX+Ro(5µg): animais do grupo FLX receberam 5µg de agonista do receptor 5-HT_{2C} – Ro 60-0175 ((S)-2-(6-chloro-5- fluoroindol-1-yl)-1-methylethylamine fumarate) (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel®) – no volume de 5µl via ICV (FLETCHER et al., 2009);
- 9- Grupo FLX+CP(3µg): animais do grupo FLX receberam 3µg de agonista do receptor 5-HT_{1B} – CP 93129 (Tocris Biosciences®) – no volume de 5µl via ICV (CLISSOLD et al., 2013);
- 10-Grupo FLX+CP(5µg): animais do grupo FLX receberam 5µg de agonista do receptor 5-HT_{1B} – CP 93129 (Tocris Biosciences®) – no volume de 5µl via ICV (CLISSOLD et al., 2013).

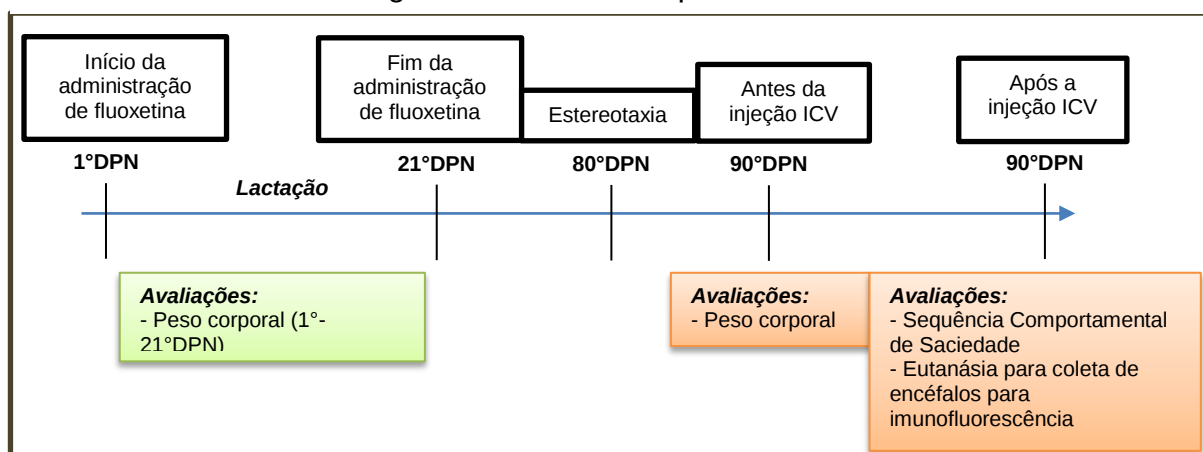
Figura 3 - Organograma dos grupos experimentais 2.



Fonte: BARROS (2019).

Após 30 minutos da injeção ICV, foi avaliado o comportamento alimentar através da análise da Sequência Comportamental de Saciedade. Em seguida, os animais foram anestesiados e eutanasiados através de perfusão transcardíaca. Os encéfalos coletados após estes procedimentos foram utilizados para realização de imunofluorescência contra proteína c-fos (Figura 4).

Figura 4 - Desenho experimental 2.



Fonte: BARROS (2019).

6.3.1 Peso corporal

O peso corporal foi mensurado do 1º ao 21º DPN (diariamente) e aos 90 dias de vida antes da injeção ICV com agonistas 5-HT. Para esta avaliação, foi utilizada balança de precisão (Marte®).

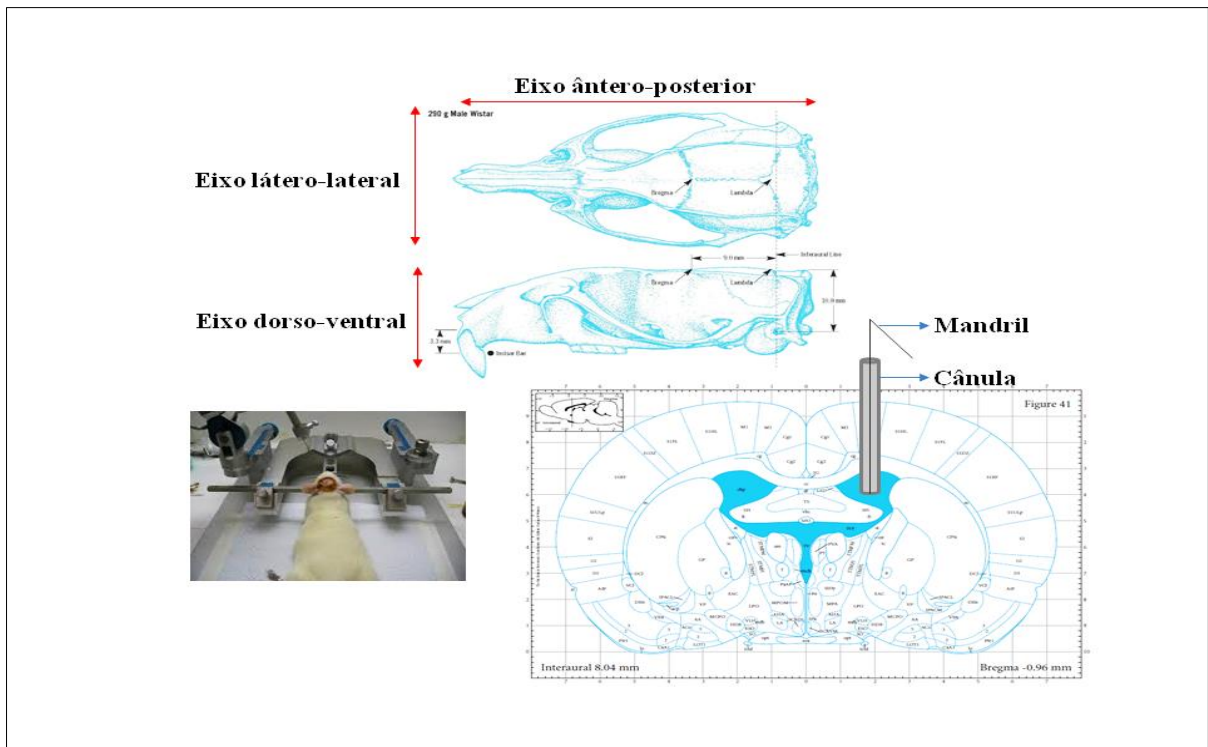
6.3.2 Estereotaxia

No dia anterior à estereotaxia, foi adicionado analgésico na água dos animais (paracetamol em gotas, 1 gota/ml). Essa analgesia foi mantida até o 5º dia de pós-operatório. O procedimento cirúrgico foi realizado após anestesia via intramuscular com Ketamina (100mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina (12mg/Kg). Em seguida à perda do reflexo ciliar, os ratos foram colocados sobre placa de aquecimento (Insight®) a 37°C, fixados ao equipamento estereotático (Insight®) e submetidos à cirurgia para canulação de acordo com método previamente descrito (PAXINOS et al., 1980; CARVALHEIRA et al., 2001).

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

Para a realização das injeções ICV, foi utilizada seringa de Hamilton (100 µl) conectada a um tubo de prolipropileno fixado a uma agulha gengival (G30 – extra curta) com resina acrílica (Vipiflash®). A ponta da agulha foi retirada e reduzida para que seu tamanho fosse exatamente igual ao da cânula a ser implantada (evitando perda de volume em espaço morto). No momento da injeção ICV, as patas anteriores do animal acordado foram gentilmente cruzadas e imobilizadas utilizando-se uma flanela. Dessa forma, a região dorsal da cabeça onde estava a cânula implantada na estereotaxia foi exposta para execução da injeção ICV. Este procedimento durou até um minuto. As injeções de ACSF e dos agonistas serotoninérgicos foram realizadas da mesma forma.

Figura 5 - Cirurgia de Estereotaxia.



Fonte: BARROS (2019). As coordenadas -1 mm no eixo ântero-posterior, -2 mm no eixo látero-lateral e -5 mm no eixo crânio-caudal são seguidas de modo a ser encontrado o ventrículo lateral direito para inserção de cânula.

6.3.3 Sequência Comportamental de Saciedade com agonistas 5-HT

Para realização da SCS no experimento 2, animais com 90 dias de vida também foram submetidos a jejum de três horas. O jejum foi iniciado às 14 horas (seis horas após o início da fase escura do ciclo de luz) horário que corresponde ao

início do segundo pico circadiano de alimentação dos ratos (SANCHEZ et al., 2008). Trinta minutos antes da SCS (16h30min.), os animais foram pesados e submetidos às injeções ICV de ACSF, agonista 5-HT_{1B} ou agonista 5-HT_{2C} de acordo com os grupos previamente descritos. A filmagem para o estudo da SCS foi iniciada às 17 horas. A avaliação do comportamento alimentar foi realizada como descrito no subcapítulo 6.2.5 (HALFORD et al., 1998).

6.3.4 Imunofluorescência contra proteína c-fos

No experimento 2, a reatividade neuronal no Arc foi avaliada aos 90 dias de vida através de imunofluorescência contra proteína c-fos. Após a SCS (duração de uma hora), o alimento continuou disponível por mais trinta minutos, somando noventa minutos de exposição alimentar. A perfusão transcardíaca assim como o armazenamento e a crio-secação dos encéfalos foi realizada conforme descrito no subcapítulo 6.2.6.

Já em relação à reação de imunofluorescência contra proteína c-fos, as reações primária e secundária para a marcação da proteína c-fos ocorreu como descrito no subcapítulo 6.2.4. A visualização das lâminas e a captura das imagens também foram realizadas conforme descrito no subcapítulo 6.2.6.

6.3.5 Estatística

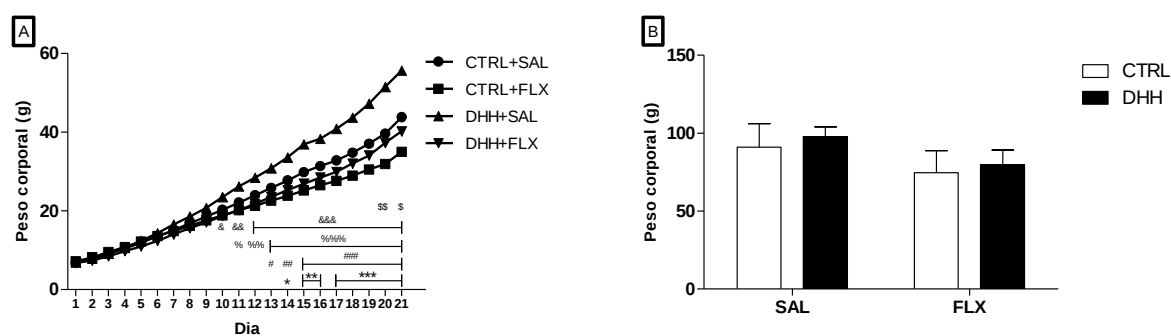
Os dados foram apresentados sob a forma de média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para a análise do peso corporal entre os grupos SAL e FLUO, foi realizado o teste *t student* ($p < 0,05$). Para a análise do consumo alimentar relativo, tempos de alimentação, limpeza e descanso, taxa alimentar e quantidade de neurônios imunorreativos entre os grupos SAL+ACSF, SAL+Ro(3 μ g), SAL+Ro(5 μ g), SAL+CP(3 μ g), SAL+CP(5 μ g), FLUO+ACSF, FLUO+Ro(3 μ g), FLUO+Ro(5 μ g), FLUO+CP(3 μ g) e FLUO+CP(5 μ g), foi realizada análise de variância (ANOVA *one way*) e *Tukey's Post Test* ($p < 0,05$). O programa GraphPad Prism 5® foi utilizado para análise estatística e obtenção dos gráficos representativos.

7 RESULTADOS

7.1 EXPERIMENTO 1

Durante o período neonatal, o peso corporal dos filhotes foi mensurado diariamente (Figura 6.A). O grupo CTRL+FLX apresentou menor peso corporal em relação ao CTRL+SAL a partir do 14° DPN ($p<0.05$ no 14° DPN; $p<0.01$ no 15° e 16° DPN; $p<0.001$ do 17°-21° DPN). Já os animais do grupo DHH+SAL tiveram maior peso corporal, já a partir do 13° DPN ($p<0.05$ no 13° DPN; $p<0.01$ no 14° DPN; $p<0.001$ do 15°-21° DPN), quando comparado ao grupo CTRL+SAL. Assim como os animais dos grupos CTRL, o grupo DHH+FLX apresentou menor peso corporal em relação ao grupo DHH+SAL a partir do dia 11° DPN ($p<0.05$ no 11° DPN; $p<0.01$ no 12° DPN; $p<0.001$ do 13°-21° DPN). Não foi observada diferença entre os grupos DHH+FLX e CTRL+SAL. Os animais do grupo DHH+FLX apresentaram maior peso corporal quando comparados aos do grupo CTRL+FLX apenas no final do período neonatal (20° e 21° DPN; $p<0.01$ e $p<0.05$). Desde o 10° DPN, o grupo DHH+SAL já apresentou maior peso corporal comparando-se com o grupo CTRL+FLX ($p<0.05$ no 10° DPN; $p<0.01$ no 11° DPN; $p<0.001$ do 12°-21° DPN).

Figura 6 - (A) Peso corporal neonatal (1°-21° DPN) e (B) no 30° DPN.



Ratas *Wistar* receberam dieta controle (CTRL, $n=12$) ou dieta hiperlipídica/hipercalórica (DHH, $n=8$) do 1° dia de gestação até o 21° dia de lactação. Do 1° ao 21° DPN, em cada ninhada ($n=8$), metade dos filhotes foi tratada com salina estéril (NaCl 0.9%, 10 μ l/g, $n=4$ /ninhada) e outra metade com fluoxetina (10mg/Kg, 10 μ l/g, $n=4$ /ninhada), constituindo os seguintes grupos experimentais: CTRL+SAL, CTRL+FLX, DHH+SAL e DHH+FLX. Dados expressos em MD $\pm$ DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni. (A): CTRL+SAL e CTRL+FLX ($n=12$ ninhadas); DHH+SAL e DHH+FLX ($n=8$ ninhadas). * representa as diferenças entre os grupos CTRL+SAL e CTRL+FLX; # representa as diferenças entre os grupos CTRL+SAL e DHH+SAL; % representa as diferenças entre os grupos DHH+SAL e DHH+FLX; \$ representa as diferenças entre os grupos DHH+FLX e CTRL+FLX; & representa as diferenças entre os grupos DHH+SAL e CTRL FLX. (B): CTRL+SAL e CTRL+FLX ($n=12$ animais/grupo); DHH+SAL e DHH+FLX ($n=10$ animais/grupo).

Após término do tratamento neonatal com fluoxetina, os animais também foram avaliados quanto ao peso corporal no 30° DPN (Figura 6.B). No entanto, não foi observado efeito da dieta perinatal ou da inibição neonatal da receptação de serotonina sobre o peso corporal na prole jovem.

As medidas murinométricas mensuradas no período neonatal estão apresentadas na Tabela 3 sob a forma de média $\pm$ desvio padrão (Tabela 3). Não foram observados efeitos da exposição perinatal a dieta DHH nem da INRS sobre a circunferência abdominal durante o período neonatal ($p > 0,5$). No entanto, aos 30 dias de vida o grupo DHH+SAL ($11,13 \pm 1,71$) apresentou maior circunferência abdominal em relação ao grupo CTRL+SAL ($9,46 \pm 0,57$) ($p < 0,01$). O grupo DHH+FLX ($9,93 \pm 1,72$) também apresentou essa medida maior em relação ao grupo CTRL+FLX ($8,71 \pm 0,48$) ($p < 0,05$).

Em relação à circunferência torácica, o grupo DHH+FLX obteve menor medida quando comparado ao grupo CTRL+SAL, aos 14 e 21 dias de vida ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). O grupo DHH+FLX ($6,39 \pm 0,30$) também apresentou menor circunferência torácica em relação ao DHH+SAL ($6,83 \pm 0,25$), apenas no PND14 ($p < 0,05$). Mas, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais na prole jovem. Aos 21 dias de vida, observou-se que o comprimento naso-anal no grupo CTRL+FLX ($104,25 \pm 8,18$) foi menor em relação ao grupo CTRL+SAL ($114,10 \pm 8,18$) ($p < 0,001$).

Também foi demonstrado que o grupo DHH+FLX apresentou menor comprimento naso-anal em relação ao CTRL+SAL tanto no 14° quanto no 21° dia de vida ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente). Além disso, os animais DHH+SAL ($115,34 \pm 6,74$) tiveram essa mesma medida maior que os animais CTRL+FLX ($104,25 \pm 8,18$) no PND 21 ($p < 0,001$). Por fim, o comprimento naso-anal no grupo DHH+FLX foi menor em relação ao DHH+SAL, no 14° e 21° dia neonatal ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). No PND 30, não foram demonstradas diferenças entre os grupos. No que diz respeito aos eixos ântero-posterior e látero-lateral da cabeça, não foram observados efeitos da dieta DHH ou da INRS, no período neonatal ou na vida jovem, entre os grupos experimentais estudados.

Em relação ao comprimento da cauda, o grupo CTRL+FLX ($61,40 \pm 6,31$) desenvolveu um menor comprimento quando comparado ao CTRL+SAL ($68,53 \pm 8,41$) no PND21 ($p < 0,01$). O grupo DHH+FLX também teve menor comprimento em relação ao CTRL+SAL, no PND 14 e 21 ($p < 0,05$). O grupo DHH+SAL ($70,01 \pm 6,38$), por outro lado, teve maior comprimento em relação aos animais CTRL+FLX ($61,40 \pm 6,31$) no PND21 ($p < 0,001$). Ademais, os animais DHH+FLX ($62,23 \pm 5,84$) desenvolveram menor tamanho de cauda em relação aos DHH+SAL ($70,01 \pm 6,38$) ($p < 0,01$). Aos 30 dias, não foram observadas diferenças de comprimento de cauda nesses grupos.

Ainda com base nos parâmetros das medidas murinométricas, também foram avaliados o IMC e índice de Lee. O grupo DHH+SAL apresentou maior IMC em relação aos animais CTRL+SAL, no PND14 e 21 ($p < 0,05$). Da mesma forma, o grupo DHH+SAL também teve um maior IMC quando comparado ao CTRL+FLX tanto no PND14 quanto no PND21 ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Já o grupo DHH+FLX ($0,32 \pm 0,03$) obteve menor IMC em comparação com DHH+SAL ($0,37 \pm 0,01$) ($p < 0,05$) apenas no 21º dia de vida. No entanto, tais diferenças não se mantiveram até a vida jovem (30 dias).

Quanto ao índice de Lee, esse parâmetro foi menor ($p < 0,05$) no grupo CTRL+FLX ($1,48 \pm 0,03$) em relação ao CTRL+SAL ($1,54 \pm 0,04$) no PND21. Já no grupo DHH+SAL, esse índice foi maior do que o CTRL+SAL aos 14 e 21 dias de vida ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Esse mesmo grupo (DHH+SAL) também apresentou maior índice de Lee em relação ao CTRL+FLX aos 14 e 21 dias ($p < 0,001$, para ambas as idades). E, por fim, no grupo DHH+FLX esse parâmetro foi menor do que no grupo DHH+SAL tanto no PND14 quanto no PND21 ($p < 0,001$, para ambas as idades). Essas características murinométricas não foram observadas também aos 30 dias de vida.

Para o estudo do comportamento alimentar em relação às intervenções perinatais, foram avaliados o consumo alimentar diário (CAD) do 29º-32º DPN e a Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) no 32º DPN. Não houve efeito da exposição perinatal à dieta hiperlipídica/hipercalórica ou do tratamento neonatal com fluoxetina sobre o CAD do 29º ao 32º dia de vida (Figura 7). Também não houve

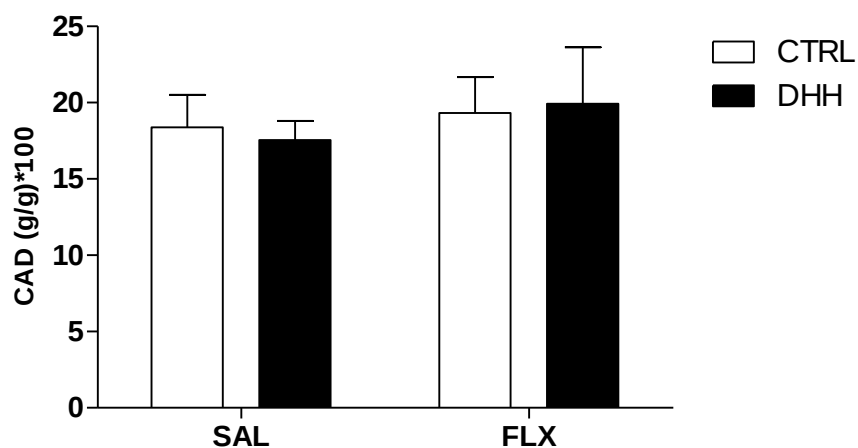
efeito da dieta perinatal ou da inibição neonatal da recaptação de serotonina sobre o consumo alimentar na SCS aos 32 dias de vida (Figura 8).

Tabela 3 - Medidas murinométricas no 2°, 7°, 14°, 21° e 30° DPN.

Medida	Idade	CTRL+SAL (n=9)	CTRL+FLX (n=9)	DHH+SAL (n=10)	DHH+FLX (n=10)
Circunferência Abdominal (cm)	2	4,61 ± 0,26	4,65 ± 0,22	4,64 ± 0,39	4,55 ± 0,44
	7	5,53 ± 0,26	5,33 ± 0,06	5,80 ± 0,34	5,65 ± 0,48
	14	7,08 ± 0,92	6,72 ± 0,85	7,19 ± 0,36	6,70 ± 0,35
	21	8,30 ± 0,84	7,76 ± 0,87	8,35 ± 0,70	7,75 ± 0,54
	30	9,46 ± 0,57	8,71 ± 0,48	11,13 ± 1,71**	9,93 ± 1,72*
Circunferência Torácica (cm)	2	4,46 ± 0,23	4,51 ± 0,17	4,28 ± 0,40	4,28 ± 0,24
	7	5,37 ± 0,16	5,31 ± 0,10	5,37 ± 0,30	5,33 ± 0,45
	14	7,04 ± 0,54	6,77 ± 0,57	6,83 ± 0,25	6,39 ± 0,30**
	21	7,78 ± 0,65	7,32 ± 0,63	7,41 ± 0,34	7,05 ± 0,22***
	30	8,72 ± 0,59	7,75 ± 0,38	9,09 ± 1,12	8,33 ± 0,88
Comprimento Naso-anal (mm)	2	59,15 ± 4,30	60,23 ± 3,33	55,52 ± 4,57	55,02 ± 4,69
	7	72,76 ± 4,84	71,62 ± 4,05	69,71 ± 5,15	67,47 ± 4,06
	14	92,20 ± 4,33	86,69 ± 3,35	90,51 ± 5,08	82,91 ± 3,89***
	21	114,10 ± 8,18	104,25 ± 8,18***	115,34 ± 6,74**	105,37 ± 5,63**
	30	136,01 ± 7,22	124,38 ± 6,98	136,39 ± 13,10	124,78 ± 14,89
Eixo Ântero-Posterior da Cabeça (mm)	2	19,48 ± 1,78	19,59 ± 1,97	17,52 ± 0,39	17,52 ± 2,14
	7	24,76 ± 1,86	24,73 ± 1,40	22,84 ± 2,00	22,63 ± 2,33
	14	29,12 ± 2,29	29,34 ± 1,55	29,00 ± 2,54	28,18 ± 2,46
	21	33,42 ± 1,90	32,46 ± 2,18	33,40 ± 1,42	31,93 ± 1,53
	30	37,26 ± 1,91	35,48 ± 1,48	36,92 ± 1,74	35,15 ± 1,47
Eixo Látero-lateral da cabeça (mm)	2	11,87 ± 0,90	11,88 ± 0,73	11,20 ± 0,66	11,31 ± 1,07
	7	14,64 ± 0,55	14,52 ± 0,48	14,25 ± 0,76	13,70 ± 0,96
	14	17,63 ± 0,78	16,58 ± 0,46	17,15 ± 1,36	16,34 ± 1,07
	21	18,06 ± 1,20	17,60 ± 1,20	19,17 ± 1,85	18,35 ± 2,11
	30	19,90 ± 1,46	18,76 ± 1,36	20,62 ± 1,69	20,14 ± 1,97
Comprimento Cauda (mm)	2	23,91 ± 3,01	23,85 ± 2,89	19,95 ± 1,60	19,80 ± 2,85
	7	34,74 ± 3,64	34,39 ± 2,56	30,78 ± 3,17	29,82 ± 3,54
	14	51,29 ± 7,05	48,56 ± 4,65	48,32 ± 3,58	45,28 ± 3,79*
	21	68,53 ± 8,41	61,40 ± 6,31**	70,01 ± 6,38***	62,23 ± 5,84**
	30	95,12 ± 6,74	80,87 ± 7,05	98,75 ± 11,64	88,54 ± 13,55
IMC g/(CNA)²	2	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,01
	7	0,29 ± 0,04	0,3 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,28 ± 0,02
	14	0,32 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,37 ± 0,03*	0,34 ± 0,03
	21	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,37 ± 0,01**	0,32 ± 0,03*
	30	0,43 ± 0,04	0,41 ± 0,05	0,45 ± 0,06	0,42 ± 0,02
Índice de Lee	2	1,09 ± 0,03	1,10 ± 0,03	1,10 ± 0,05	1,08 ± 0,02
	7	1,27 ± 0,05	1,27 ± 0,03	1,31 ± 0,03	1,25 ± 0,03
	14	1,43 ± 0,02	1,39 ± 0,03	1,52 ± 0,04***	1,42 ± 0,04***
	21	1,54 ± 0,04	1,48 ± 0,03*	1,66 ± 0,02***	1,52 ± 0,05***
	30	1,82 ± 0,06	1,74 ± 0,07	1,89 ± 0,05	1,81 ± 0,03

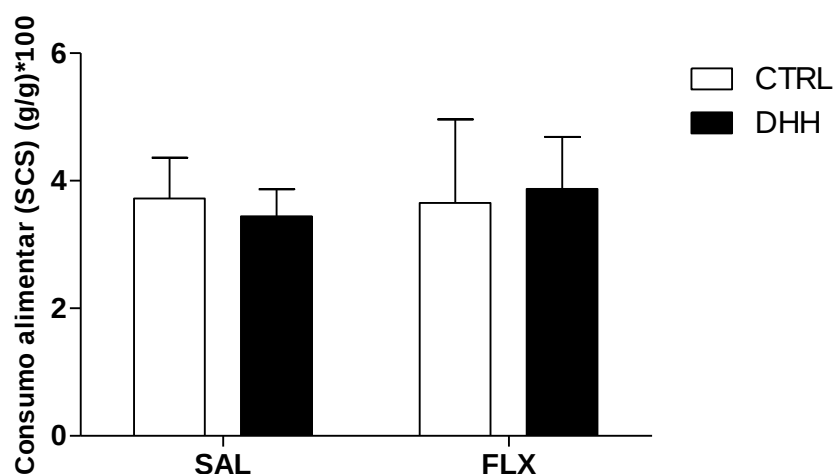
Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA medidas repetidas para as variáveis mensuradas do período neonatal (PND2-21) e Two Way ANOVA para o 30° dia de vida, pós-teste de Bonferroni.

Figura 7 - Consumo alimentar diário (CAD) do 29° ao 32° DPN.



Ratas *Wistar* receberam dieta controle (CTRL, n=12) ou dieta hiperlipídica/hipercalórica (DHH, n=10) do 1° dia de gestação até o 21° dia de lactação. Do 1° ao 21° DPN, em cada ninhada (n=8), metade dos filhotes foi tratada com salina estéril (NaCl 0.9%, 10 µl/g, n=4/ninhada) e outra metade com fluoxetina (10mg/Kg, 10 µl/g, n=4/ninhada), constituindo os seguintes grupos experimentais: CTRL+SAL e CTRL+FLX (n=12 animais/grupo); DHH+SAL e DHH+FLX (n=10 animais/grupo). Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

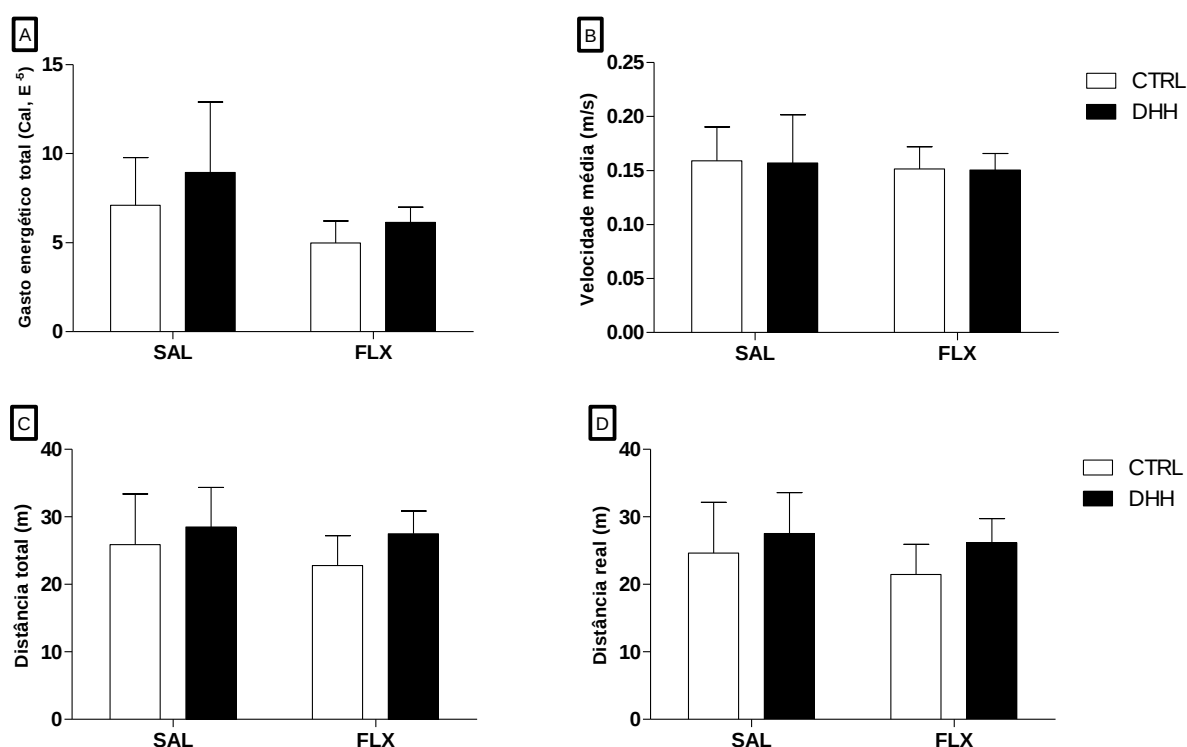
Figura 8 - Consumo alimentar na Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) no 32° DPN.



Ratas *Wistar* receberam dieta controle (CTRL, n=12) ou dieta hiperlipídica/hipercalórica (DHH, n=10) do 1° dia de gestação até o 21° dia de lactação. Do 1° ao 21° DPN, em cada ninhada (n=8), metade dos filhotes foi tratada com salina estéril (NaCl 0.9%, 10 µl/g, n=4/ninhada) e outra metade com fluoxetina (10mg/Kg, 10 µl/g, n=4/ninhada), constituindo os seguintes grupos experimentais: CTRL+SAL e CTRL+FLX (n=12 animais/grupo); DHH+SAL e DHH+FLX (n=10 animais/grupo). Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

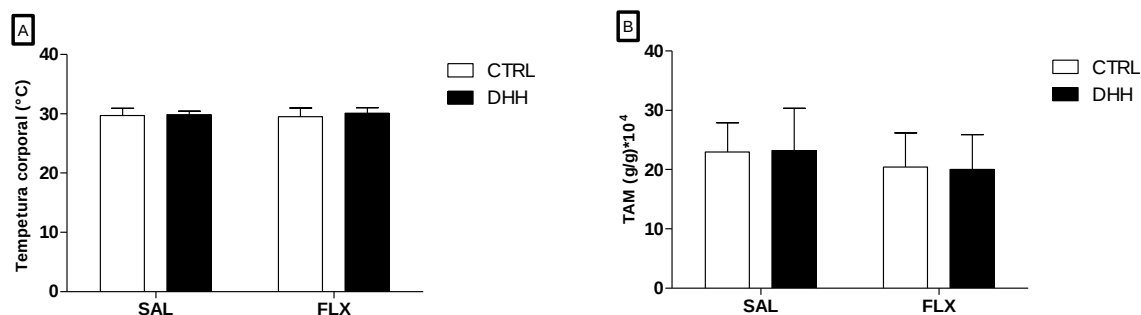
Para avaliação do efeito da dieta experimental perinatal e do tratamento com fluoxetina sobre gasto energético na prole jovem, algumas variáveis relacionadas foram analisadas no 28° e 30° DPN (Figuras 9 e 10). Não foi observada diferença entre os grupos experimentais em relação às variáveis analisadas no campo aberto aos 28 dias de vida (Figura 9.A, B, C e D). Da mesma forma, não houve efeito da exposição perinatal à dieta hiperlipídica/hipercalórica ou do tratamento neonatal com fluoxetina sobre a temperatura corporal ou peso relativo do TAM no 30° DPN (Figura 10.A e B).

Figura 9 - (A) Gasto energético total, (B) velocidade média, (C) distância total e (D) real no campo aberto no 28° DPN.



Ratas *Wistar* receberam dieta controle (CTRL, n=8) ou dieta hiperlipídica/hipercalórica (DHH, n=8) do 1° dia de gestação até o 21° dia de lactação. Do 1° ao 21° DPN, em cada ninhada (n=8), metade dos filhotes foi tratada com salina estéril (NaCl 0.9%, 10 µl/g, n=4/ninhada) e outra metade com fluoxetina (10mg/Kg, 10 µl/g, n=4/ninhada), constituindo os seguintes grupos experimentais: CTRL+SAL (n=8 animais), CTRL+FLX (n=8 animais), DHH+SAL (n=8 animais) e DHH+FLX (n=8 animais). Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

Figura 10 - (A) Temperatura corporal e (B) peso relativo do tecido adiposo marrom (TAM) no 30° DPN.

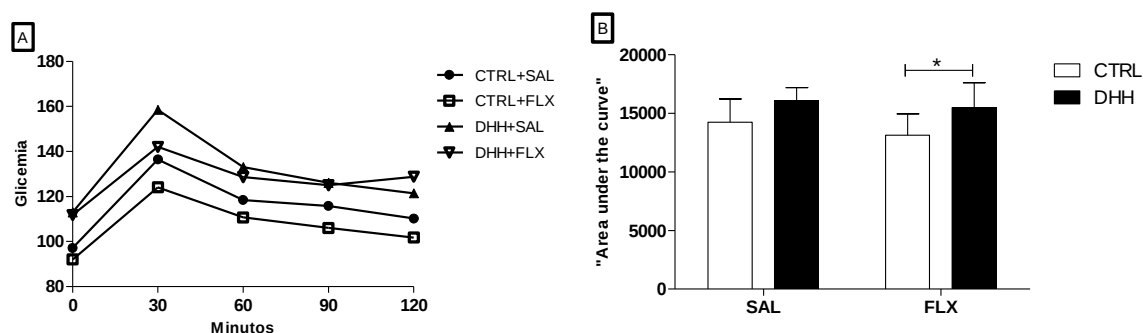


Ratas *Wistar* receberam dieta controle (CTRL, n=11) ou dieta hiperlipídica/hipercalórica (DHH, n=8) do 1° dia de gestação até o 21° dia de lactação. Do 1° ao 21° DPN, em cada ninhada (n=8), metade dos filhotes foi tratada com salina estéril (NaCl 0.9%, 10 µl/g, n=4/ninhada) e outra metade com fluoxetina (10mg/Kg, 10 µl/g, n=4/ninhada), constituindo os seguintes grupos experimentais: CTRL+SAL, CTRL+FLX, DHH+SAL e DHH+FLX. Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni. (A): CTRL+SAL e CTRL+FLX (n=11 animais/grupo) e DHH+SAL e DHH+FLX (n=8 animais/grupo). (B): CTRL+SAL e CTRL+FLX (n=8 animais/grupo) e DHH+SAL e DHH+FLX (n=5 animal/grupo).

No 29° DPN, para avaliação do efeito da exposição perinatal à dieta hiperlipídica/hipercalórica associada ao tratamento neonatal com fluoxetina sobre o metabolismo dos carboidratos, foi realizado o teste de tolerância à glicose (TTG) (Figura 11). Não houve diferença entre os grupos experimentais em relação à glicemia em jejum ou aos 30, 60, 90 e 120 minutos após dose intraperitoneal de glicose (Figura 11.A). Já no que diz respeito à “area under the curve”, os animais do grupo DHH+FLX apresentaram uma maior área quando comparados com os animais CTRL+FLX ($p<0,05$) (Figura 11.B).

Após eutanásia por decapitação no 30° DPN, os coxins do tecido adiposo branco e alguns órgãos foram dissecados para pesagem e estão apresentados na forma de Média±Desvio Padrão na Tabela 4. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais avaliados tanto em relação aos coxins adiposos mensurados quanto ao tecido adiposo total. Da mesma forma, os pesos dos órgãos avaliados após dissecação não foram diferentes em função da intervenção perinatal, dieta DHH ou ISRS (Tabela 4).

Figura 11 - (A) Curva glicêmica e (B) "area under the curve" no 29° DPN.



Ratas *Wistar* receberam dieta controle (CTRL, n=9) ou dieta hiperlipídica/hipercalórica (DHH, n=7) do 1° dia de gestação até o 21° dia de lactação. Do 1° ao 21° DPN, em cada ninhada (n=8), metade dos filhotes foi tratada com salina estéril (NaCl 0.9%, 10 µl/g, n=4/ninhada) e outra metade com fluoxetina (10mg/Kg, 10 µl/g, n=4/ninhada), constituindo os seguintes grupos experimentais: CTRL+SAL (n=9), CTRL+FLX (n=9), DHH+SAL (n=7) e DHH+FLX (n=7). Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

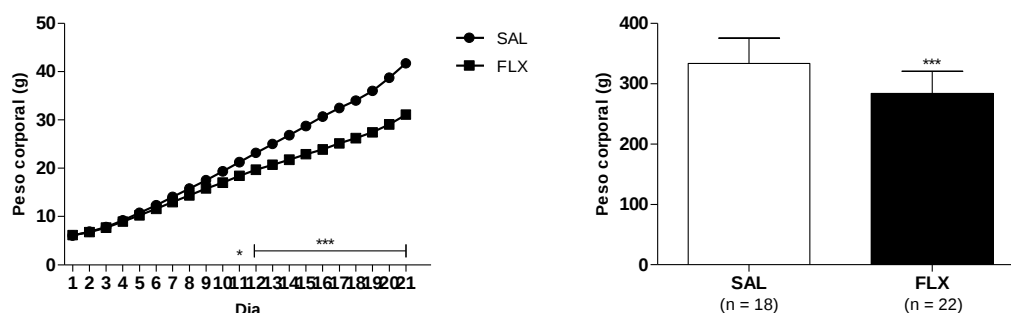
Tabela 4 - Peso relativo de coxins do tecido adiposo branco e órgãos no 30° DPN.

	CTRL		DHH	
	SAL (n=8)	FLX (n=8)	SAL (n=5)	FLX (n=5)
TAB inguinal (g/g*10⁴)	35,41 ± 14,68	25,02 ± 14,83	34,89 ± 14,84	27,11 ± 11,44
TAB perirenal (g/g*10⁴)	6,15 ± 2,07	4,27 ± 2,34	4,44 ± 2,48	3,24 ± 1,13
TAB retroperitoneal (g/g*10⁴)	12,91 ± 2,89	8,78 ± 3,16	15,37 ± 4,65	10 ± 2,52
TAB mesentérico (g/g*10⁴)	53,82 ± 32,54	58,89 ± 31,97	44,17 ± 5,57	31,29 ± 20,76
TAB epididimal (g/g*10⁴)	17,46 ± 3,32	13,54 ± 4,19	19,48 ± 3,75	15,89 ± 4,81
TAB total (g/g*10³)	14,06 ± 4,55	12,17 ± 4,53	14,23 ± 0,47	11,34 ± 2,81
Encéfalo (g/g*10³)	18,72 ± 2,55	21,95 ± 3,39	18,74 ± 1,78	21,55 ± 1,96
Rim (g/g*10⁴)	64,90 ± 6,64	67,05 ± 8,57	67,88 ± 9,36	65,54 ± 11,27
Baço (g/g*10⁴)	35,55 ± 6,72	38,75 ± 4,69	40,64 ± 15,74	36,67 ± 8,34
Fígado (g/g*10³)	58,12 ± 5,79	56,55 ± 7,26	58,70 ± 8,33	57,41 ± 9,37
Coração (g/g*10⁴)	58,99 ± 9,65	62,20 ± 9,26	72,68 ± 14,46	68,05 ± 11,89
Supra-renal (g/g*10⁵)	14,11 ± 3,72	21,87 ± 8,43	18,42 ± 3,15	19,55 ± 4,58

7.2 EXPERIMENTO 2

No período neonatal, o grupo FLX apresentou menor peso corporal em comparação com o grupo SAL no 11º DPN ($p < 0.05$). A partir do 12º dia de vida, a diferença entre estes grupos experimentais aumentou ($p < 0.001$) e os animais FLX mantiveram um menor peso corporal em relação aos animais SAL até o desmame (Figura 12.A). Na vida adulta, o padrão observado durante a lactação também foi mantido. O grupo FLX (283.7 ± 7.906 ; $n=22$) apresentou menor peso corporal quando comparado com o grupo SAL (333.4 ± 9.939 ; $n=18$) aos 90 dias de vida ($p=0.0003$) (Figura 12.B).

Figura 12 - (A) Peso corporal neonatal (1º-21º DPN) e (B) no 90º DPN.

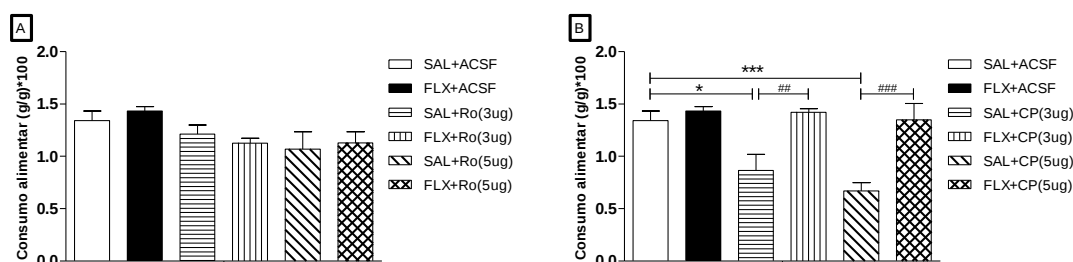


Do 1º ao 21º DPN, em cada ninhada ($n=8$), metade dos filhotes foi tratada com salina estéril (NaCl 0.9%, 10 μ l/g, $n=4$ /ninhada) e outra metade com fluoxetina (10mg/Kg, 10 μ l/g, $n=4$ /ninhada), constituindo os seguintes grupos experimentais: Salina (SAL, $n=15$ ninhadas) e Fluoxetina (FLX, $n=15$ ninhadas). (A) Dados expressos em MD $\pm$ DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Bonferroni. * representa as diferenças entre os grupos SAL e FLX. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. (B) Dados expressos em MD $\pm$ DP: Teste t. * representa a diferença entre os grupos SAL ($n=18$ animais) e FLX ($n=22$ animais); *** $p=0.0003$.

No 90º DPN, após injeção ICV de ACSF, agonista do receptor 5-HT_{2C} (Ro-600175) ou 5-HT_{1B} (CP 93 129), o consumo alimentar na Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) foi quantificado. Não foi observada diferença entre os animais dos grupos SAL e FLX que receberam injeção ICV de ACSF ou agonista Ro-600175 nas doses de 3 ou 5 μ g (Figura 13.A). Por outro lado, houve redução do consumo alimentar em resposta à injeção ICV do agonista CP 93 129 entre os animais SAL (Figura 13.B). O grupo SAL+CP(3 μ g) apresentou menor consumo alimentar em comparação com o grupo SAL+ACSF ($p < 0.01$). Esta redução do consumo alimentar foi ainda maior entre os grupos SAL+CP(5 μ g) e SAL+ACSF

($p < 0.0001$). Não foi observado o mesmo efeito da injeção ICV do agonista CP 93 129, nas doses de 3 ou 5 μg , entre os animais FLX. Consequentemente, os grupos SAL+CP(3 μg) e SAL+CP(5 μg) apresentaram menor consumo alimentar em relação aos grupos FLX+CP(3 μg) e FLX+CP(5 μg) ($p < 0.001$ e $p < 0.0001$), respectivamente.

Figura 13 - Consumo alimentar (g/g)*100 durante a sequência comportamental de saciedade (SCS).



Ratas *Wistar* ($n=15$) foram utilizadas. Do 1° ao 21° DPN, em cada ninhada ($n=8$), metade dos filhotes foi tratada com salina estéril (NaCl 0.9%, 10 $\mu\text{l/g}$, $n=4$ /ninhada) e outra metade com fluoxetina (10mg/Kg, 10 $\mu\text{l/g}$, $n=4$ /ninhada), constituindo os seguintes grupos experimentais: Salina (SAL, $n=15$ ninhadas) e Fluoxetina (FLX, $n=15$ ninhadas). Na vida adulta, estes grupos foram submetidos à injeção intracerebroventricular (ICV) de ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) e (A) Ro-600175 (agonista do receptor 5-HT_{2C}) ou (B) CP 93 129 (agonista do receptor 5-HT_{1B}), nas doses de 3 ou 5 μg , 30 minutos antes da SCS. Dados expressos em MD $\pm$ DP: One Way ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$. * representa o efeito da injeção ICV entre os animais SAL x FLX. # representa o efeito da injeção ICV entre os animais SAL x FLX.

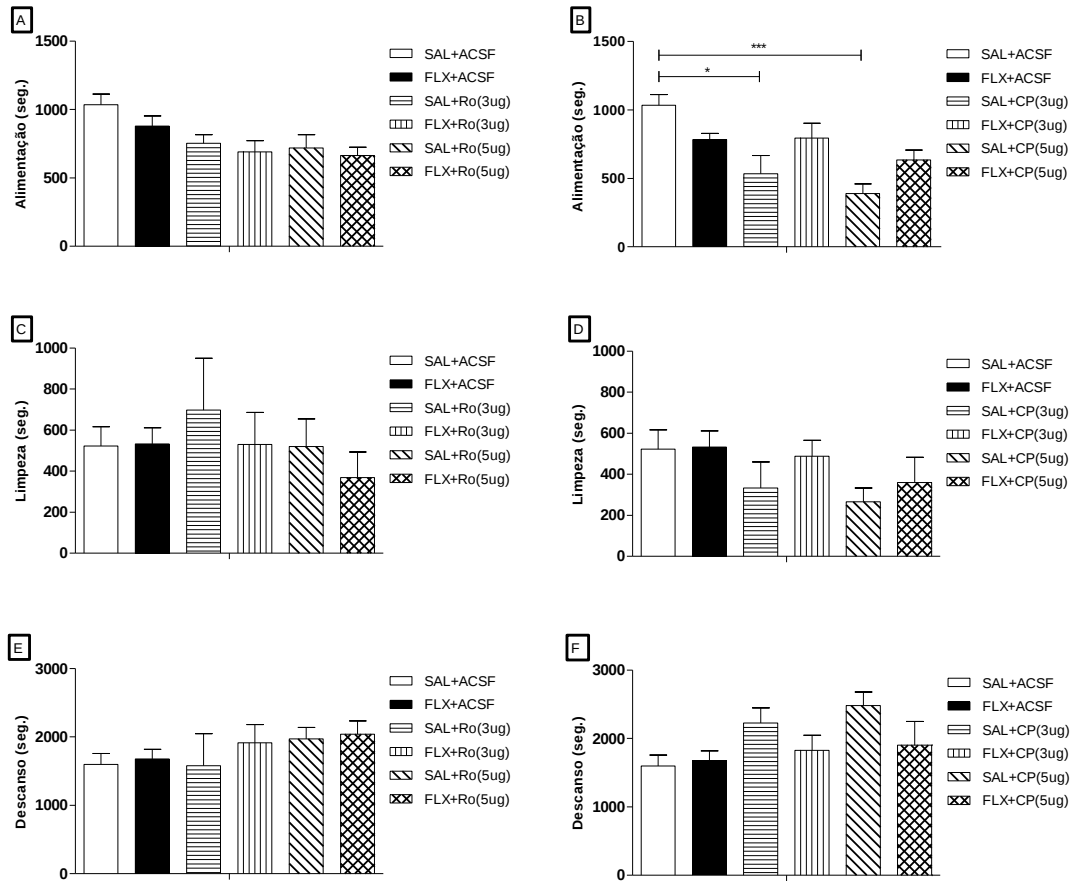
Os comportamentos de alimentação, limpeza e descanso também foram analisados na SCS aos 90 dias de vida. Em relação ao tempo de alimentação, não houve diferença entre os animais dos grupos SAL e FLX que receberam injeção ICV de ACSF ou agonista Ro-600175 nas doses de 3 ou 5 μg (Figura 14.A). Por outro lado, as análises demonstraram redução do tempo de alimentação em resposta à injeção ICV do agonista CP 93 129 entre os animais SAL (Figura 14.B). O grupo SAL+CP(3 μg) apresentou menor tempo de alimentação em comparação com o grupo SAL+ACSF. Também houve redução do tempo de alimentação entre os grupos SAL+CP(5 μg) e SAL+ACSF ($p=0.0002$). Este mesmo efeito não foi observado entre os animais FLX após injeção ICV do agonista CP 93 129 nas doses de 3 ou 5 μg . Quanto aos tempos de limpeza e descanso (Figuras 14.C, D, E e F) também não foi identificada diferença entre os animais dos grupos SAL e FLX em

resposta à injeção ICV de ACSF, agonista Ro-600175 ou CP 93 129 nas doses de 3 ou 5 µg.

Aos 90 dias de vida, o ponto de saciedade também foi analisado na SCS (Figuras 15 e 16). O ponto de saciedade na SCS corresponde ao ponto de intersecção entre as linhas que representam os tempos de alimentação e descanso. Foi observada antecipação do ponto de saciedade em resposta à injeção ICV de agonista Ro-600175 nas doses de 3 ou 5 µg entre os grupos SAL [SAL+ACSF, SAL+ Ro(3µg) e SAL+ Ro(5µg)] e FLX [FLX+ACSF, FLX+ Ro(3µg) e FLX+ Ro(5µg)] (Figura 9). Do mesmo modo, antecipação do ponto de saciedade em resposta à injeção ICV de agonista CP 93 129 nas doses de 3 ou 5 µg entre os grupos SAL [SAL+ACSF, SAL+CP(3µg) e SAL+CP(5µg)] e FLX [FLX+ACSF, FLX+CP(3µg) e FLX+CP(5µg)] (Figura 10). Dessa forma, foi possível constatar o efeito da injeção ICV com os agonistas Ro-600175 e CP 93 129 sobre o ponto de saciedade. No entanto, não se pode afirmar um efeito da inibição neonatal da recaptação de serotonina sobre o ponto de saciedade na SCS em resposta à injeção ICV com os agonistas serotoninérgicos.

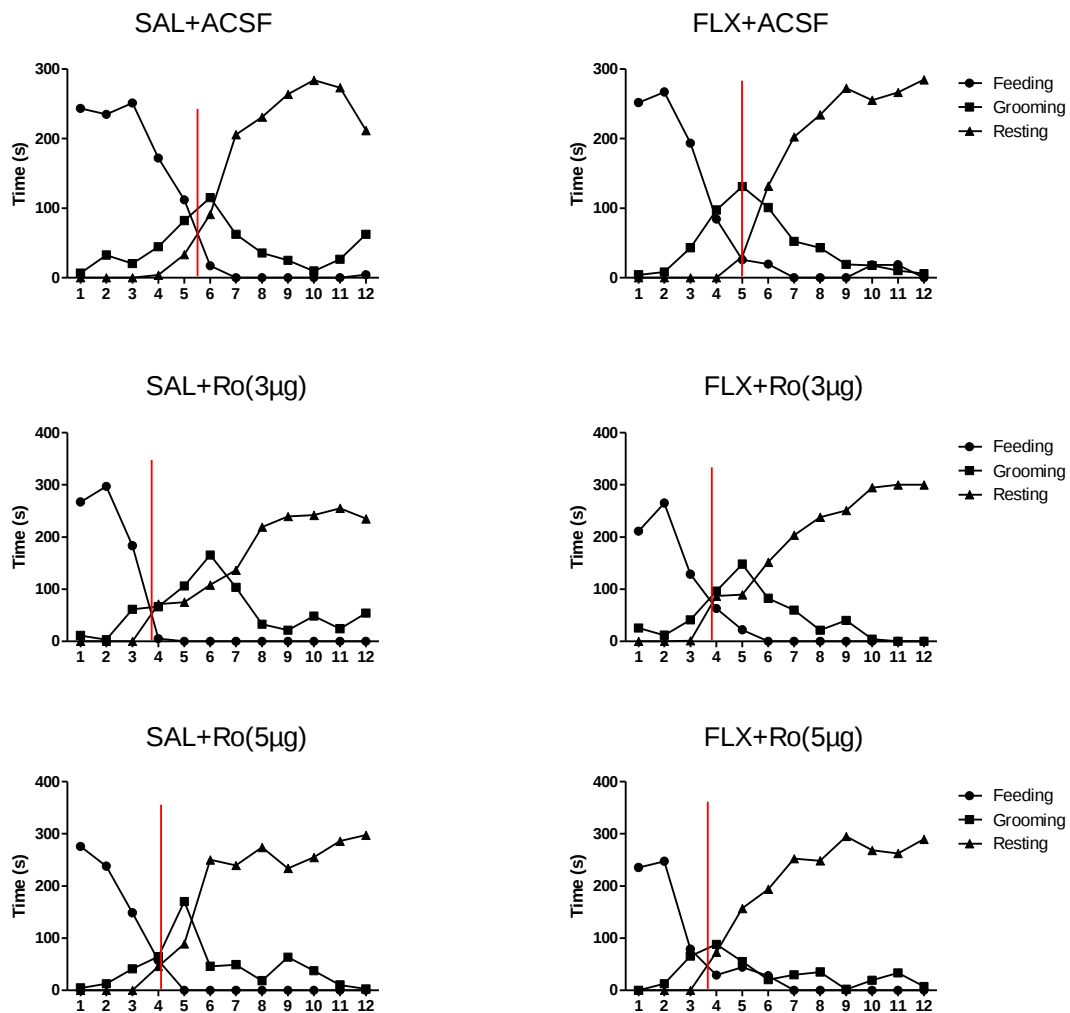
Ademais, também foi realizado o procedimento de imunofluorescência contra proteína c-fos no tecido encefálico para quantificação do número de neurônios ativos para cada estímulo (agonistas serotoninérgicos) no núcleo arqueado do hipotálamo. No entanto, não foram identificadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais avaliados ($p>0,05$).

Figura 14 - (A e B) Tempos de alimentação, (C e D) limpeza e (E e F) descanso (segundos) durante a sequência comportamental de saciedade (SCS).



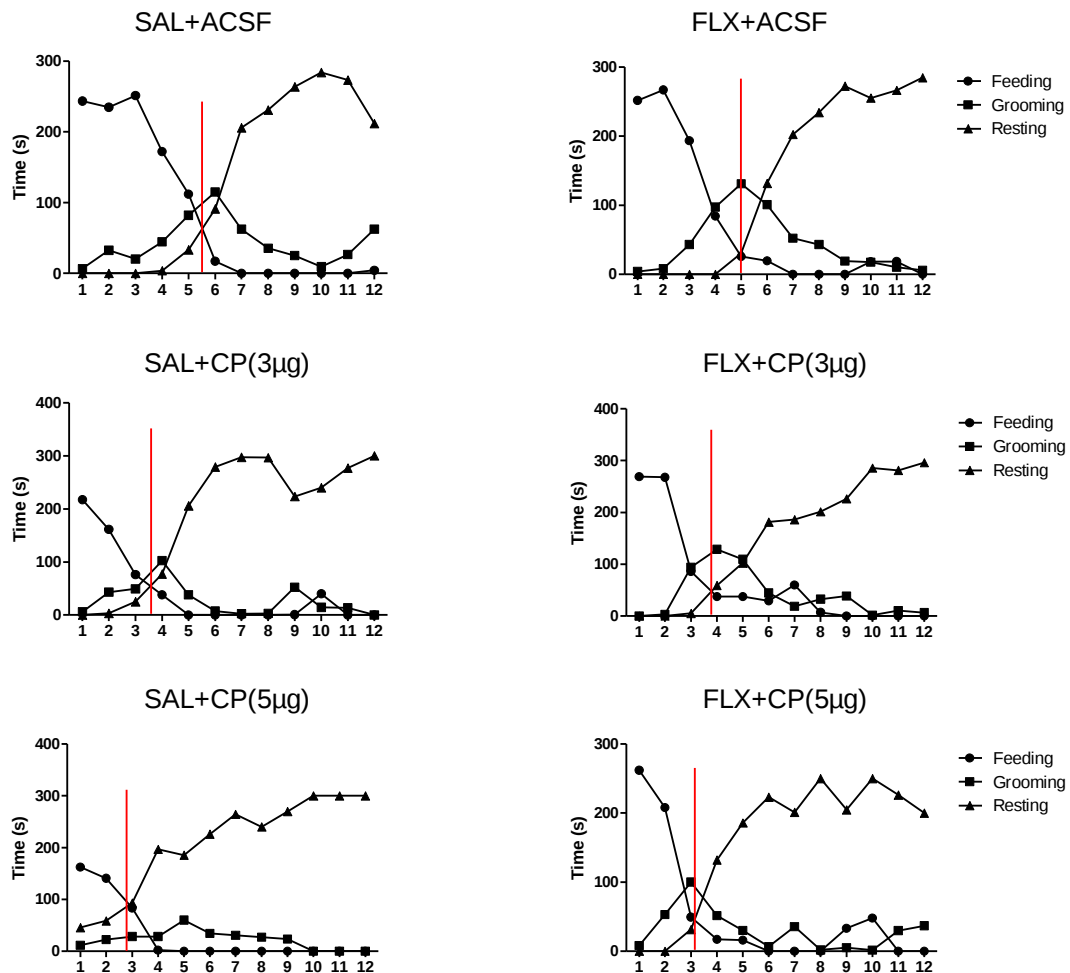
(A e B) Tempos de alimentação, (C e D) limpeza e (E e F) descanso (segundos) durante a sequência comportamental de saciedade (SCS). Ratas *Wistar* ($n=15$) foram utilizadas. Do 1° ao 21° DPN, em cada ninhada ($n=8$), metade dos filhotes foi tratada com salina estéril (NaCl 0.9%, 10 μ l/g, $n=4$ /ninhada) e outra metade com fluoxetina (10mg/Kg, 10 μ l/g, $n=4$ /ninhada), constituindo os seguintes grupos experimentais: Salina (SAL, $n=15$ ninhadas) e Fluoxetina (FLX, $n=15$ ninhadas). Na vida adulta, estes grupos foram submetidos à injeção intracerebroventricular (ICV) de ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) e (A, C e E) Ro-600175 (agonista do receptor 5-HT_{2C}) ou (B, D e F) CP 93 129 (agonista do receptor 5-HT_{1B}), nas doses de 3 ou 5 μ g, 30 minutos antes da SCS. Dados expressos em MD $\pm$ DP: One Way ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$. * representa o efeito da injeção ICV entre os animais SAL.

Figura 15 - Ponto de saciedade durante a sequência comportamental de saciedade (SCS).



Ponto de saciedade durante a sequência comportamental de saciedade (SCS). Ratas *Wistar* (n=15) foram utilizadas. Do 1° ao 21° DPN, em cada ninhada (n=8), metade dos filhotes foi tratada com salina estéril (NaCl 0.9%, 10 μl/g, n=4/ninhada) e outra metade com fluoxetina (10mg/Kg, 10 μl/g, n=4/ninhada), constituindo os seguintes grupos experimentais: Salina (SAL, n=15 ninhadas) e Fluoxetina (FLX, n=15 ninhadas). Na vida adulta, estes grupos foram submetidos à injeção intracerebroventricular (ICV) de ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) e Ro-600175 (agonista do receptor 5-HT_{2C}) nas doses de 3 ou 5 μg, 30 minutos antes da SCS. Dados expressos em média.

Figura 16 - Ponto de saciedade durante a sequência comportamental de saciedade (SCS).



Ponto de saciedade durante a sequência comportamental de saciedade (SCS). Ratas *Wistar* (n=15) foram utilizadas. Do 1° ao 21° DPN, em cada ninhada (n=8), metade dos filhotes foi tratada com salina estéril (NaCl 0.9%, 10 µl/g, n=4/ninhada) e outra metade com fluoxetina (10mg/Kg, 10 µl/g, n=4/ninhada), constituindo os seguintes grupos experimentais: Salina (SAL, n=15 ninhadas) e Fluoxetina (FLX, n=15 ninhadas). Na vida adulta, estes grupos foram submetidos à injeção intracerebroventricular (ICV) de ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) e CP 93 129 (agonista do receptor 5-HT_{1B}), nas doses de 3 ou 5 µg, 30 minutos antes da SCS. Dados expressos em média.

8 DISCUSSÃO

8.1 EXPERIMENTO 1

No que diz respeito à evolução ponderal, a exposição perinatal à dieta hiperlipídica/hipercalórica (DHH) promoveu aumento do peso corporal, do IMC e do índice de Lee durante a fase neonatal. Por outro lado, a inibição neonatal da receptação de serotonina (INRS) causou redução do peso corporal, do IMC e do índice de Lee tanto nos neonatos expostos a uma dieta padrão de biotério quanto na prole provinda de mães alimentadas com dieta DHH durante a gestação e lactação. Ou seja, em termos de peso corporal, IMC e índice de Lee, a INRS parece ter sido capaz de reverter o efeito da exposição perinatal à dieta DHH durante o período de intervenção. Dessa forma, é possível que o aumento neonatal da disponibilidade sináptica de serotonina possa compensar alguma “deficiência” no desenvolvimento do sistema serotoninérgico causada pela dieta DHH. Já na idade jovem, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais avaliados em relação a esses três parâmetros.

Corroborando com nossos achados, vários estudos tanto em humanos quanto em animais apontam que a exposição materna a dietas hiperlipídicas e hipercalóricas causam sobrepeso ou obesidade na prole/descendentes em curto e longo prazo (HERNANDEZ, GRAYSON *et al.*, 2012; BENATTI, MELO *et al.*, 2014; LIANG, YANG *et al.*, 2016). Através de uma revisão sistemática, Barros e colaboradores (2018) também apontam que os estudos que investigaram os efeitos da INRS sobre o balanço energético observaram uma redução do peso corporal durante o período de intervenção (neonatal) bem como na vida jovem e adulta (BARROS *et al.*, 2018). Essa alteração do peso corporal pode estar associada a várias características fenotípicas relacionadas ao desenvolvimento somático, composição corporal, comportamento alimentar, gasto e metabolismo energético. Nesse sentido, estudos experimentais vêm demonstrando que os mecanismos adaptativos gerados pela exposição a dietas DHH e pela INRS que levam ao aumento do peso corporal envolvem modificações fenotípicas no sistema serotoninérgico.

No que diz respeito ao desenvolvimento somático, essa variável apresentou resultados semelhantes ao peso corporal. A exposição perinatal à dieta

hiperlipídica/hipercalórica (DHH) gerou o aumento neonatal de medidas murinométricas. Já a inibição neonatal da receptação de serotonina (INRS) promoveu redução do crescimento somático neonatal tanto nos animais expostos a uma dieta padrão de biotério quanto nos animais provindos de mães alimentadas com dieta DHH durante a gestação e lactação. Ferro e colaboradores (2013) corroboram com nossos achados demonstrando que a exposição perinatal a uma dieta ocidentalizada promove maior crescimento somático neonatal (comprimento corporal) em ratos *Wistar* (FERRO CAVALCANTE; LIMA DA SILVA; DA MARCELINO DA SILVA; MUNIZ *et al.*, 2013). Por sua vez, vários estudos que utilizaram diferentes fármacos inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRS) também observaram redução do desenvolvimento somático neonatal em resposta à INRS (DEIRÓ *et al.*, 2004; 2006).

Os mecanismos fisiológicos subjacentes às adaptações fenotípicas citadas acima envolvem o papel do sistema serotoninérgico sobre o desenvolvimento do sistema esquelético. Níveis aumentados de 5-HT através de manipulações de dietéticas durante períodos críticos de desenvolvimento reduzem os níveis do hormônio do crescimento (GH) e a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) no fígado e músculo de neonatos (CASTROGIOVANNI *et al.*, 2014). Isso pode ocorrer pelo fato da 5-HT modular o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) no hipotálamo e a secreção hipofisária do GH, um efeito que depende do tipo de receptor serotoninérgico estimulado (VALVERDE *et al.*, 2000; PINILLA *et al.*, 2001). Além disso, o aumento da atividade serotoninérgica nos neurônios POMC e NPY durante a lactação através da INRS pode aumentar o gasto energético bem como induzir hipofagia e gerar insuficiência energética que impede o crescimento neonatal normal (HEISLER *et al.*, 2006; MARSTON *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, não observamos que a exposição neonatal à fluoxetina gera redução de medidas murinométricas também na vida jovem. Já na literatura científica, não foram encontrados estudos que tivessem avaliado o efeito da INRS sobre o crescimento somático após o término do período de intervenção (curto e longo prazo). Dessa forma, o menor crescimento somático observado nos neonatos parece ser recuperado após o término da intervenção e não se mantém até a idade jovem.

Sobre a composição corporal, não foram demonstrados efeitos da exposição perinatal a dieta DHH ou da INRS sobre a adiposidade corporal na idade jovem (pesos dos coxins adiposos ou adiposidade total). Por outro lado, foi observado que a exposição perinatal a dieta DHH promove aumento da circunferência abdominal, aos 30 dias de vida. Além disso, em relação a essa variável, os animais jovens expostos perinatalmente a dieta DHH associada à INRS foram semelhantes aos controles, demonstrando um possível efeito atenuador da fluoxetina. Via receptores 5-HT_{2C}, a serotonina tem uma ação lipolítica através da estimulação da via melanocortinérgica que por sua vez ativa o gasto energético no tecido adiposo branco por inervações simpáticas (WATANABE *et al.*, 2011; OH *et al.*, 2015; ROZENBLIT-SUSAN *et al.*, 2016). Muitos estudos experimentais vêm demonstrando a ação anorexígena dos ISRS em animais adultos induzidos à obesidade por dietas DHH. Porém, poucos estudos vêm tentando compreender a possível ação moduladora da serotonina durante os períodos críticos do desenvolvimento.

Foi observado que animais jovens expostos à INRS apresentam menor quantidade de tecido adiposo branco relativo, denominado “*lean phenotype*”. Esse fenótipo foi associado à maior expressão da proteína UPC-1 no tecido adiposo marrom e termogênese assim como maior consumo de oxigênio em tecidos periféricos (músculo esquelético) e centrais (hipotálamo e hipocampo) (DA SILVA *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2015; BRAZ *et al.*, 2016). Galindo e colaboradores (2015) observaram menor acúmulo de gordura abdominal associada a maior expressão do receptor 5-HT_{2C} e a expressão reduzida de NPY no hipotálamo após exposição crônica à dieta hipercalórica em ratos adultos tratados com fluoxetina durante a lactação (GALINDO *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, o comportamento alimentar avaliado através do consumo alimentar e da sequência comportamental de saciedade (SCS) na prole jovem não foi alterado pela exposição perinatal à dieta DHH ou pela INRS. Na literatura científica, os estudos que vêm investigando os efeitos da exposição perinatal a dietas com alto teor de gorduras sobre o comportamento alimentar utilizam um vasto espectro de dietas experimentais. Algumas dessas dietas são denominadas: hiperlipídica (ou “*high-fat diet*”); hiperlipídica e hipercalórica; dieta ocidentalizada (“*western diet*” ou “*westernized diet*”); ou ainda, dieta de cafeteria. Tais dietas apresentam diferentes percentuais de macronutrientes. Não foi identificado nenhum

estudo que tenha utilizado a dieta experimental do presente estudo e avaliado como desfecho o comportamento alimentar da prole. No geral, os estudos demonstram que a exposição perinatal a dietas hiperlipídicas e hipercalóricas alteram o comportamento alimentar. Ferro et al. (2014) e Speight et al. (2017) observaram que a exposição materna (ratas *Wistar*) a uma dieta ocidentalizada e a uma dieta de cafeteria (respectivamente) durante a gestação e lactação promove hiperfagia e maior consumo de energia devido ao consumo excessivo de açúcares e gorduras pela prole em longo prazo (FERRO CAVALCANTE; MARCELINO DA SILVA; LIRA; DO AMARAL ALMEIDA *et al.*, 2014; SPEIGHT; DAVEY; MCKENNA; VOIGT, 2017).

Em relação à microestrutura do comportamento alimentar, Wright e colaboradores (2011) apontam que a exposição lactacional a uma dieta de cafeteria gera períodos de alimentação mais curtos, frequência alimentar geral aumentada, latência para o descanso adiada e atraso do ponto de saciedade, em longo prazo. Além disso, os animais se alimentaram por mais tempo no início do teste e foram mais ativos ao final, embora a ingestão total de alimentos durante o teste não tenha sido afetada pela dieta lactacional (WRIGHT; FONE; LANGLEY-EVANS; VOIGT, 2011). Por fim, Perez e DiPatrizio (2018) observaram que camundongos C57BL/6Tac provindos de mães alimentadas com uma dieta ocidentalizada não apresentaram alterações acentuadas nos padrões de alimentação (PEREZ; DIPATRIZIO, 2018).

Além disso, a INRS também pode ser apontada como modulador de adaptações na expressão do comportamento alimentar. Silva et al. (2014) não observaram alteração do consumo alimentar ou da SCS em resposta à exposição neonatal à fluoxetina em ratos *Wistar* jovens (SILVA *et al.*, 2014). No entanto, utilizando o mesmo modelo experimental, Galindo et al. (2015) demonstraram algumas adaptações moleculares no sistema serotoninérgico em animais adultos submetidos a INRS. De acordo com esse estudo, a INRS promove maior expressão do receptor 5-HT_{2C} o qual é responsável pela ativação da via das melanocortinas no hipotálamo e indução da saciedade (HEISLER *et al.*, 2006; GALINDO *et al.*, 2015). Dessa forma, por mais que não haja alterações na expressão do fenótipo alimentar, a INRS induz alterações moleculares no sistema serotoninérgico.

Em relação ao gasto energético, neste trabalho não foram observadas diferenças entre os grupos avaliados quanto aos efeitos da dieta DHH ou da INRS.

No entanto, Speight (2017) demonstrou que a exposição materna (ratas wistar) a uma dieta de cafeteria gera aumento da atividade locomotora nos filhotes submetidos ao campo aberto após o desmame (no início da adolescência) (SPEIGHT; DAVEY; MCKENNA; VOIGT, 2017). Já em relação à INRS, muitos dos estudos apontam que o aumento neonatal dos níveis de 5-HT causa alterações no desenvolvimento neuromotor e nos comportamentos emocionais os quais podem influenciar o desempenho motor e o gasto de energia. Nesses estudos, os animais apresentaram redução da atividade locomotora e da atividade exploratória (ANSORGE *et al.*, 2004; ANSORGE *et al.*, 2008; KARPOVA *et al.*, 2009; LEE, 2009; LEE, 2012; KO *et al.*, 2014).

Em relação ao metabolismo da glicose, neste estudo foi observado apenas um aumento da “area under the curve” como efeito da dieta DHH sobre os animais jovens expostos à INRS. Ferro *et al.* (2014) demonstrou que a exposição materna (ratas wistar) a uma dieta ocidentalizada durante a gestação e lactação promove, na prole na vida adulta, hiperfagia, hiperinsulinismo, hipertrigliceridemia, maior peso visceral de gordura, maior nível de colesterol (lipoproteína de densidade muito baixa), menor nível de colesterol (lipoproteína de alta densidade) e teste de tolerância à glicose alterado, aumentando o risco de distúrbios metabólicos (FERRO CAVALCANTE; MARCELINO DA SILVA; LIRA; DO AMARAL ALMEIDA *et al.*, 2014). Já de acordo com Heng *et al.* (1990) seus resultados sugerem que a obesidade materna resulta em estoques aumentados no tecido hepático fetal de glicogênio e triglicerídeos. A hipoglicemia entre filhotes de mães excessivamente obesas pode ser devida à mobilização atenuada de glicogênio hepático (HENG; KLIEGMAN, 1990).

8.2 EXPERIMENTO 2

Este estudo demonstrou que a inibição neonatal da recaptação da serotonina no período neonatal sinalizou para efeitos tardios sobre o peso corporal e o comportamento alimentar em resposta ao estímulo central com agonistas dos receptores 5-HT_{1B}. Adicionalmente, os animais submetidos à INRS apresentaram menor sensibilidade quanto ao consumo alimentar após estímulo ICV com agonista do receptor 5-HT_{1B}. Sendo assim, esses achados sugerem que os animais submetidos à INRS são menos sensíveis ao estímulo com o agonista do receptor 5-HT_{1B} para o consumo alimentar na vida adulta.

O peso corporal é a resultante do balanço entre o consumo alimentar e o gasto energético (MORTON *et al.*, 2006). Por conseguinte, um menor peso corporal pode ser consequente de uma redução da ingestão alimentar e/ou aumento do gasto energético (MORTON *et al.*, 2006). Na literatura, vários estudos apontam que a ISNRS reduz o peso corporal em curto e longo prazo. Por exemplo, a exposição neonatal a fármacos antidepressivos, dentre eles a fluoxetina, promove menor ganho de peso corporal durante a lactação associado a menor crescimento somático (MANHÃES-DE-CASTRO *et al.*, 2001; MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2002; DEIRÓ *et al.*, 2004; 2006; 2008; TOSCANO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2010). Além disso, foi observado menor peso corporal em ratos jovens e adultos, demonstrando que a redução do peso corporal provocada pela INRS permanece ao longo da vida (MANHÃES-DE-CASTRO *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2014; 2015^a; 2015^b; GALINDO *et al.*, 2015).

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

De fato, atualmente é bem aceito que a regulação do peso corporal está estreitamente relacionada ao controle neural do gasto energético (MÜNZBERG *et al.*, 2015). O Arc é altamente responsivo a mudanças no estado energético e

nutricional (jejum, por exemplo) (MÜNZBERG *et al.*, 2015). Este núcleo hipotalâmico medeia mudanças no tecido adiposo marrom (BAT), via Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (MÜNZBERG *et al.*, 2015). Os neurônios POMC expressos no Arc são anorexígenos e aumentam a termogênese do BAT (MÜNZBERG *et al.*, 2015). Tais fenômenos (anorexia e termogênese) decorrem da secreção do Hormônio Estimulado pelo Melanócito (MSH), um subproduto da via das melancortinas, capaz de ativar os receptores MC4 no hipotálamo e, subsequentemente, aumentar o gasto energético e a expressão de UCP1 no BAT, via SNA. (HAYNES *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2000; STE *et al.*, 200).

Uma vez que a serotonina se liga aos receptores 5-HT_{2C}, presentes nos neurônios que expressam POMC no núcleo arqueado do hipotálamo, ela é capaz de ativar a via das melanocortinas promovendo redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético. Já a ativação do receptor 5-HT_{1B} inibe essa via e estimula a ingestão alimentar (HEISLER, 2006). Desta forma, o aumento do gasto energético em longo prazo como uma reposta adaptativa ao aumento da disponibilidade de serotonina durante o período crítico de desenvolvimento, poderia explicar a persistência na redução do peso corporal em nosso modelo experimental, embora os mecanismos associados a tal expressão fenotípica não tenham sido objetivo do estudo em questão.

A Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) é o nome dado à transição ordenada das atividades de alimentação, limpeza e descanso mensurados durante o período pós-ingestivo (HALFORD *et al.*, 1998). Como a SCS reflete processos fisiológicos naturais relacionados à saciedade, ela pode ser influenciada por fármacos que interfiram em mecanismos relacionados à ingestão alimentar (Halford *et al.*, 1998). Drogas que aumentem atividade sináptica da 5-HT, como a fluoxetina ou agonista do receptor 5-HT_{1B} e/ou 5-HT_{2C} podem antecipar o ponto de saciedade (HALFORD *et al.*, 1998). Neste estudo, não houve alteração da ingestão alimentar relativa após estímulo com o agonista do receptor 5-HT_{1B}, quando nos animais controles esse estímulo foi capaz de reduzir o consumo alimentar.

Dados prévios não publicados de nosso grupo de pesquisa indicaram que a exposição neonatal à fluoxetina promove antecipação da saciedade e maior atividade neuronal no Arc após estímulo alimentar em ratos aos 180 dias, caracterizando um fenótipo hipofágico (GALINDO, 2013, tese). Galindo e

colaboradores (2015) também observaram menor consumo alimentar em ratos aos 180 dias (GALINDO *et al*, 2015). Entretanto, outro estudo que também utilizou inibição neonatal da recaptação da serotonina com fluoxetina, não encontrou modificação do comportamento alimentar (ingestão ou saciedade) em ratos jovens (DA SILVA *et al*, 2014). Já camundongos tratados com sertralina na fase neonatal apresentaram maior ingestão calórica na vida adulta (KUMMET *et al*, 2012). Estes diferentes resultados podem ser decorrentes a diferentes metodologias utilizadas para a realização dos estudos acima citados. Além disso, não foram encontrados na literatura estudos sobre a resposta do comportamento alimentar frente ao estímulo agudo central com agonistas serotoninérgicos em animais previamente tratados com fluoxetina na lactação.

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

Por trás das modificações comportamentais, vários estudos apontam alterações morfofuncionais permanentes em locais que modulam o comportamento alimentar como o sistema serotoninérgico e o hipotálamo. A INRS promoveu hipotrofia do sistema serotoninérgico, aumento da expressão dos receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos no hipotálamo e “*dowmregulation*” desses autorreceptores, bem como do SERT, no núcleo dorsal da rafe (HANSEN e MIKKELSEN, 1998; SILVA *et al*, 2010; LIMÓN-MORALES *et al*, 2014). Também foi observado menor expressão de 5-HT_{2C} e NPY no hipotálamo, sem alteração do receptor 5-HT_{1B} (GALINDO *et al*, 2015). Essas alterações podem compor os mecanismos subjacentes às modificações no comportamento alimentar. Neste estudo, a INRS “impediu” o efeito da injeção ICV do agonista 5-HT_{1B} sobre o consumo alimentar. Esse achado indica que a via anorexígena no Arc (melanocortinas) pode ser menos inativa pela via orexígena nos animais tratados com fluoxetina na lactação.

Nossos resultados não corroboraram com a hipótese inicial de que a INRS promove hipofagia em longo prazo. No entanto, a INRS promoveu menor peso corporal. Dessa forma, os achados deste estudo podem justificar o menor peso corporal em ratos adultos submetidos à INRS através do aumento da atividade da via anorexígena no Arc e do inferido aumento do gasto energético. A possível maior atividade da via anorexígena no Arc em ratos submetidos à INRS, após estímulo com agonista do receptor 5-HT_{1B} na vida adulta, reforça os achados de estudo anterior (GALINDO *et al*, 2015) e a hipótese de que a maior disponibilidade sináptica neonatal de serotonina possivelmente sinaliza para a maior atividade da via da melanocortinas em ratos adultos. Deste modo, estes organismos podem apresentar maior capacidade de adaptação a demandas energético-calóricas ambientais.

9 CONCLUSÃO

Como forma de demonstrar a originalidade do presente estudo, não foram encontrados na literatura científica trabalhos que tenham avaliado a possível capacidade da INRS em reverter os efeitos de dietas DHH sobre o balanço e metabolismo energético tanto no que diz respeito aos mecanismos fisiológicos subjacentes quanto em relação às características fenotípicas expressas. Sendo assim, de acordo com a literatura atual é possível apenas descrever e entender os efeitos da INRS e da exposição perinatal a dietas DHH de forma isolada. A partir de então, este trabalho pôde apontar que a INRS pode reverter/atenuar os efeitos da exposição perinatal a dieta DHH sobre alguns parâmetros. Mas, as adaptações morfofuncionais provocadas pela INRS associada concomitantemente à exposição perinatal a dieta DHH sobre o sistema serotoninérgico ainda precisam ser elucidadas a fim de explicar seus efeitos sobre o balanço e metabolismo energético.

REFERÊNCIAS

AHLEMEYER, B.; BEIER, H.; SEMKOVA, I.; SCHAPER, C. *et al.* S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. **Brain Res**, 858, n. 1, p. 121-128, Mar 06 2000.

ALFARADHI, M. Z.; OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. **Front Genet**, 2, p. 27, 2011.

AMUNA, P.; ZOTOR, F. B. Epidemiological and nutrition transition in developing countries: impact on human health and development. **Proc Nutr Soc**, 67, n. 1, p. 82-90, Feb 2008.

ANSORGE, M. S.; MORELLI, E.; GINGRICH, J. A. Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. **J Neurosci**, 28, n. 1, p. 199-207, Jan 02 2008.

ANSORGE, M. S.; ZHOU, M.; LIRA, A.; HEN, R. *et al.* Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. **Science**, 306, n. 5697, p. 879-881, Oct 29 2004.

ARAGAO RDA, S.; RODRIGUES, M. A.; DE BARROS, K. M.; SILVA, S. R. *et al.* Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents--a reproducibility study. **J Neurosci Methods**, 195, n. 2, p. 216-221, Feb 15 2011.

ASTRUP, A.; DYERBERG, J.; SELLECK, M.; STENDER, S. Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. **Obes Rev**, 9 Suppl 1, p. 48-52, Mar 2008.

AZMITIA, E. C.; DOLAN, K.; WHITAKER-AZMITIA, P. M. S-100B but not NGF, EGF, insulin or calmodulin is a CNS serotonergic growth factor. **Brain Res**, 516, n. 2, p. 354-356, May 21 1990.

BARKER, D. J.; BULL, A. R.; OSMOND, C.; SIMMONDS, S. J. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. **BMJ**, 301, n. 6746, p. 259-262, Aug 04 1990.

BAYOL, S. A.; SIMBI, B. H.; STICKLAND, N. C. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. **J Physiol**, 567, n. Pt 3, p. 951-961, Sep 15 2005.

BELAHSEN, R. Nutrition transition and food sustainability. **Proc Nutr Soc**, 73, n. 3, p. 385-388, Aug 2014.

BENATTI, R. O.; MELO, A. M.; BORGES, F. O.; IGNACIO-SOUZA, L. M. *et al.* Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and microRNA-122 (miR-122) and microRNA-370 (miR-370) expression in offspring. **Br J Nutr**, 111, n. 12, p. 2112-2122, Jun 28 2014.

BLUNDELL, J. Pharmacological approaches to appetite suppression. **Trends Pharmacol Sci**, 12, n. 4, p. 147-157, Apr 1991.

BONNIN, A.; GOEDEN, N.; CHEN, K.; WILSON, M. L. *et al.* A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. **Nature**, 472, n. 7343, p. 347-350, Apr 21 2011.

BONNIN, A.; LEVITT, P. Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. **Neuroscience**, 197, p. 1-7, Dec 01 2011.

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

CADENA-BURBANO, E. V.; CAVALCANTI, C. C. L.; LAGO, A. B.; BENJAMIM, R. A. C. *et al.* A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. **Nutr Neurosci**, p. 1-12, Jul 28 2017.

CONDE, W. L.; MONTEIRO, C. A. Nutrition transition and double burden of undernutrition and excess of weight in Brazil. **Am J Clin Nutr**, 100, n. 6, p. 1617S-1622S, Dec 2014.

CONE, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. **Nat Neurosci**, 8, n. 5, p. 571-578, May 2005.

CRANE, J. D.; PALANIVEL, R.; MOTTILLO, E. P.; BUJAK, A. L. *et al.* Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. **Nat Med**, 21, n. 2, p. 166-172, Feb 2015.

DA SILVA, A. I.; BRAZ, G. R.; PEDROZA, A. A.; NASCIMENTO, L. *et al.* Fluoxetine induces lean phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1 expression. **J Bioenerg Biomembr**, 47, n. 4, p. 309-318, Aug 2015.

DA SILVA, A. I.; BRAZ, G. R.; SILVA-FILHO, R.; PEDROZA, A. A. *et al.* Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues. **Appl Physiol Nutr Metab**, 40, n. 6, p. 565-574, Jun 2015.

DA SILVA, A. I.; MONTEIRO GALINDO, L. C.; NASCIMENTO, L.; MOURA FREITAS, C. *et al.* Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life. **Can J Physiol Pharmacol**, 92, n. 4, p. 330-337, Apr 2014.

DAUBERT, E. A.; CONDRON, B. G. Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. **Trends Neurosci**, 33, n. 9, p. 424-434, Sep 2010.

DEIRO, T. C.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; CABRAL-FILHO, J. E.; BARRETO-MEDEIROS, J. M. *et al.* Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. **Physiol Behav**, 87, n. 2, p. 338-344, Feb 28 2006.

DEIRO, T. C.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; CABRAL-FILHO, J. E.; SOUZA, S. L. *et al.* Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. **Braz J Med Biol Res**, 37, n. 10, p. 1503-1509, Oct 2004.

DESAI, M.; HALES, C. N. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. **Biol Rev Camb Philos Soc**, 72, n. 2, p. 329-348, May 1997.

DESAI, M.; JELLYMAN, J. K.; HAN, G.; BEALL, M. *et al.* Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. **Am J Obstet Gynecol**, 211, n. 3, p. 237 e231-237 e213, Sep 2014.

DONOVAN, M. H.; TECOTT, L. H. Serotonin and the regulation of mammalian energy balance. **Front Neurosci**, 7, p. 36, 2013.

DOS SANTOS PEREZ, G.; SANTANA DOS SANTOS, L.; DOS SANTOS CORDEIRO, G.; MATOS PARAGUASSU, G. *et al.* Maternal and Post-Weaning Exposure to a High Fat Diet Promotes Visceral Obesity and Hepatic Steatosis in Adult Rats. **Nutr Hosp**, 32, n. 4, p. 1653-1658, Oct 01 2015.

DREWNOWSKI, A.; POPKIN, B. M. The nutrition transition: new trends in the global diet. **Nutr Rev**, 55, n. 2, p. 31-43, Feb 1997.

DUNN, G. A.; BALE, T. L. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. **Endocrinology**, 150, n. 11, p. 4999-5009, Nov 2009.

FAHY, T. A.; RUSSELL, G. F. Outcome and prognostic variables in bulimia nervosa. **Int J Eat Disord**, 14, n. 2, p. 135-145, Sep 1993.

FERRO CAVALCANTE, T. C.; LIMA DA SILVA, J. M.; DA MARCELINO DA SILVA, A. A.; MUNIZ, G. S. *et al.* Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. **Lipids**, 48, n. 11, p. 1157-1168, Nov 2013.

FERRO CAVALCANTE, T. C.; MARCELINO DA SILVA, A. A.; LIRA, M. C.; DO AMARAL ALMEIDA, L. C. *et al.* Early exposure of dams to a westernized diet has long-term consequences on food intake and physiometabolic homeostasis of the rat offspring. **Int J Food Sci Nutr**, 65, n. 8, p. 989-993, Dec 2014.

GALINDO, L. C.; BARROS MDA, L.; PINHEIRO, I. L.; SANTANA, R. V. *et al.* Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. **Int J Dev Neurosci**, 46, p. 76-81, Nov 2015.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; BATESON, P.; BEEDLE, A. S. *et al.* Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. **Lancet**, 373, n. 9675, p. 1654-1657, May 09 2009.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; LOW, F. M. The role of developmental plasticity and epigenetics in human health. **Birth Defects Res C Embryo Today**, 93, n. 1, p. 12-18, Mar 2011.

GOLDBERG, J. I. Serotonin regulation of neurite outgrowth in identified neurons from mature and embryonic *Helisoma trivolvis*. **Perspect Dev Neurobiol**, 5, n. 4, p. 373-387, 1998.

GREGORIO, B. M.; SOUZA-MELLO, V.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Maternal high-fat diet is associated with altered pancreatic remodelling in mice offspring. **Eur J Nutr**, 52, n. 2, p. 759-769, Mar 2013.

GRUDELL, A. B.; SWEETSER, S.; CAMILLERI, M.; ECKERT, D. J. *et al.* A controlled pharmacogenetic trial of sibutramine on weight loss and body composition in obese or overweight adults. **Gastroenterology**, 135, n. 4, p. 1142-1154, Oct 2008.

HALES, C. N. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance in adulthood: the "thrifty phenotype" hypothesis revisited. **Acta Paediatr Suppl**, 422, p. 73-77, Jul 1997.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, 35, n. 7, p. 595-601, Jul 1992.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. **Br Med Bull**, 60, p. 5-20, 2001.

HALFORD, J. C.; HARROLD, J. A.; LAWTON, C. L.; BLUNDELL, J. E. Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. **Curr Drug Targets**, 6, n. 2, p. 201-213, Mar 2005.

HAWKES, C. The role of foreign direct investment in the nutrition transition. **Public Health Nutr**, 8, n. 4, p. 357-365, Jun 2005.

HEISLER, L. K.; COWLEY, M. A.; TECOTT, L. H.; FAN, W. *et al.* Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. **Science**, 297, n. 5581, p. 609-611, Jul 26 2002.

HEISLER, L. K.; JOBST, E. E.; SUTTON, G. M.; ZHOU, L. *et al.* Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. **Neuron**, 51, n. 2, p. 239-249, Jul 20 2006.

HENDRICKS, T. J.; FYODOROV, D. V.; WEGMAN, L. J.; LELUTIU, N. B. *et al.* Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. **Neuron**, 37, n. 2, p. 233-247, Jan 23 2003.

HENG, J.; KLIEGMAN, R. M. Effects of maternal obesity on fasting metabolism in newborn rats. **Int J Obes**, 14, n. 6, p. 505-513, Jun 1990.

HERNANDEZ, L. L.; GRAYSON, B. E.; YADAV, E.; SEELEY, R. J. *et al.* High fat diet alters lactation outcomes: possible involvement of inflammatory and serotonergic pathways. **PLoS One**, 7, n. 3, p. e32598, 2012.

HILL, A. J.; BLUNDELL, J. E. Sensitivity of the appetite control system in obese subjects to nutritional and serotonergic challenges. **Int J Obes**, 14, n. 3, p. 219-233, Mar 1990.

HUANG, X. F.; HAN, M.; STORLIEN, L. H. Differential expression of 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptor mRNAs in mice prone, or resistant, to chronic high-fat diet-induced obesity. **Brain Res Mol Brain Res**, 127, n. 1-2, p. 39-47, Aug 23 2004.

JIMERSON, D. C.; WOLFE, B. E.; METZGER, E. D.; FINKELSTEIN, D. M. *et al.* Decreased serotonin function in bulimia nervosa. **Arch Gen Psychiatry**, 54, n. 6, p. 529-534, Jun 1997.

KOJIMA, S.; CATAVERO, C.; RINAMAN, L. Maternal high-fat diet increases independent feeding in pre-weanling rat pups. **Physiol Behav**, 157, p. 237-245, Apr 01 2016.

KOOPMAN, K. E.; BOOIJ, J.; FLIERS, E.; SERLIE, M. J. *et al.* Diet-induced changes in the Lean Brain: Hypercaloric high-fat-high-sugar snacking decreases serotonin transporters in the human hypothalamic region. **Mol Metab**, 2, n. 4, p. 417-422, 2013.

KUMMET, G. J.; HASKELL, S. E.; HERMANN, G. M.; NI, C. *et al.* Neonatal SSRI Exposure Programs a Hypermetabolic State in Adult Mice. **J Nutr Metab**, 2012, p. 431574, 2012.

KURHE, Y.; MAHESH, R. Ondansetron attenuates co-morbid depression and anxiety associated with obesity by inhibiting the biochemical alterations and improving serotonergic neurotransmission. **Pharmacol Biochem Behav**, 136, p. 107-116, Sep 2015.

LAM, D. D.; PRZYDZIAL, M. J.; RIDLEY, S. H.; YEO, G. S. *et al.* Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. **Endocrinology**, 149, n. 3, p. 1323-1328, Mar 2008.

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

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

LAUDER, J. M.; PETRUSZ, P.; WALLACE, J. A.; DINOME, A. *et al.* Combined serotonin immunocytochemistry and 3H-thymidine autoradiography: in vivo and in vitro methods. **J Histochem Cytochem**, 30, n. 8, p. 788-793, Aug 1982.

LAUDER, J. M.; SZE, P. Y.; KREBS, H. Maternal influences on tryptophan hydroxylase activity in embryonic rat brain. **Dev Neurosci**, 4, n. 4, p. 291-295, 1981.

LEIBOWITZ, S. F.; ALEXANDER, J. T. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. **Biol Psychiatry**, 44, n. 9, p. 851-864, Nov 01 1998.

LEOMBRUNI, P.; AMIANTO, F.; DELSEDIME, N.; GRAMAGLIA, C. *et al.* Citalopram versus fluoxetine for the treatment of patients with bulimia nervosa: a single-blind randomized controlled trial. **Adv Ther**, 23, n. 3, p. 481-494, May-Jun 2006.

LEOMBRUNI, P.; PIERO, A.; LAVAGNINO, L.; BRUSTOLIN, A. *et al.* A randomized, double-blind trial comparing sertraline and fluoxetine 6-month treatment in obese patients with Binge Eating Disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 32, n. 6, p. 1599-1605, Aug 01 2008.

LIANG, X.; YANG, Q.; ZHANG, L.; MARICELLI, J. W. *et al.* Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice. **Sci Rep**, 6, p. 34345, Sep 30 2016.

MARSTON, O. J.; GARFIELD, A. S.; HEISLER, L. K. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. **Eur J Pharmacol**, 660, n. 1, p. 70-79, Jun 11 2011.

MATEOS, S. S.; SANCHEZ, C. L.; PAREDES, S. D.; BARRIGA, C. *et al.* Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 104, n. 1, p. 52-59, Jan 2009.

MELO, A. M.; BENATTI, R. O.; IGNACIO-SOUZA, L. M.; OKINO, C. *et al.* Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. **Metabolism**, 63, n. 5, p. 682-692, May 2014.

MENDES-DA-SILVA, C.; DE SOUZA, S. L.; BARRETO-MEDEIROS, J. M.; DE FREITAS-SILVA, S. R. *et al.* Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. **Arq Neuropsiquiatr**, 60, n. 4, p. 928-931, Dec 2002.

MENDES-DA-SILVA, C.; GIRIKO, C. A.; MENNITTI, L. V.; HOSOUME, L. F. *et al.* Maternal high-fat diet during pregnancy or lactation changes the somatic and neurological development of the offspring. **Arq Neuropsiquiatr**, 72, n. 2, p. 136-144, Feb 2014.

MONTEIRO, C. A.; CONDE, W. L.; POPKIN, B. M. The burden of disease from undernutrition and overnutrition in countries undergoing rapid nutrition transition: a view from Brazil. **Am J Public Health**, 94, n. 3, p. 433-434, Mar 2004.

MONTEIRO, C. A.; MONDINI, L.; DE SOUZA, A. L.; POPKIN, B. M. The nutrition transition in Brazil. **Eur J Clin Nutr**, 49, n. 2, p. 105-113, Feb 1995.

MONTELEONE, P.; BRAMBILLA, F.; BORTOLOTTI, F.; MAJ, M. Serotonergic dysfunction across the eating disorders: relationship to eating behaviour, purging behaviour, nutritional status and general psychopathology. **Psychol Med**, 30, n. 5, p. 1099-1110, Sep 2000.

MORTON, G. J.; CUMMINGS, D. E.; BASKIN, D. G.; BARSH, G. S. *et al.* Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, 443, n. 7109, p. 289-295, Sep 21 2006.

MURABAYASHI, N.; SUGIYAMA, T.; ZHANG, L.; KAMIMOTO, Y. *et al.* Maternal high-fat diets cause insulin resistance through inflammatory changes in fetal adipose tissue. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, 169, n. 1, p. 39-44, Jul 2013.

OZANNE, S. E.; HALES, C. N. Early programming of glucose-insulin metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, 13, n. 9, p. 368-373, Nov 2002.

PELEG-RAIBSTEIN, D.; LUCA, E.; WOLFRUM, C. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. **Behav Brain Res**, 233, n. 2, p. 398-404, Aug 01 2012.

PEREZ, P. A.; DIPATRIZIO, N. V. Impact of maternal western diet-induced obesity on offspring mortality and peripheral endocannabinoid system in mice. **PLoS One**, 13, n. 10, p. e0205021, 2018.

PICONE, O.; LAIGRE, P.; FORTUN-LAMOTHE, L.; ARCHILLA, C. *et al.* Hyperlipidic hypercholesterolemic diet in prepubertal rabbits affects gene expression in the embryo, restricts fetal growth and increases offspring susceptibility to obesity. **Theriogenology**, 75, n. 2, p. 287-299, Jan 15 2011.

PIJL, H.; COHEN, A. F.; VERKES, R. J.; KOPPESCHAAR, H. P. *et al.* Plasma amino acid ratios related to brain serotonin synthesis in response to food intake in bulimia nervosa. **Biol Psychiatry**, 38, n. 10, p. 659-668, Nov 15 1995.

PIJL, H.; KOPPESCHAAR, H. P.; WILLEKENS, F. L.; OP DE KAMP, I. *et al.* Effect of serotonin re-uptake inhibition by fluoxetine on body weight and spontaneous food choice in obesity. **Int J Obes**, 15, n. 3, p. 237-242, Mar 1991.

POPKIN, B. M. The nutrition transition and its health implications in lower-income countries. **Public Health Nutr**, 1, n. 1, p. 5-21, Mar 1998.

POPKIN, B. M. Nutrition in transition: the changing global nutrition challenge. **Asia Pac J Clin Nutr**, 10 Suppl, p. S13-18, 2001a.

POPKIN, B. M. The nutrition transition and obesity in the developing world. **J Nutr**, 131, n. 3, p. 871S-873S, Mar 2001b.

POPKIN, B. M. Global changes in diet and activity patterns as drivers of the nutrition transition. **Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program**, 63, p. 1-10; discussion 10-14, 259-268, 2009.

POPKIN, B. M. Nutrition Transition and the Global Diabetes Epidemic. **Curr Diab Rep**, 15, n. 9, p. 64, Sep 2015.

POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S.; NG, S. W. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. **Nutr Rev**, 70, n. 1, p. 3-21, Jan 2012.

POPKIN, B. M.; LU, B.; ZHAI, F. Understanding the nutrition transition: measuring rapid dietary changes in transitional countries. **Public Health Nutr**, 5, n. 6A, p. 947-953, Dec 2002.

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N Engl J Med**, 295, n. 7, p. 349-353, Aug 12 1976.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov 1993.

REMACLE, C.; BIESWAL, F.; BOL, V.; REUSENS, B. Developmental programming of adult obesity and cardiovascular disease in rodents by maternal nutrition imbalance. **Am J Clin Nutr**, 94, n. 6 Suppl, p. 1846S-1852S, Dec 2011.

RICE, D.; BARONE, S., Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect**, 108 Suppl 3, p. 511-533, Jun 2000.

RIVERA, H. M.; CHRISTIANSEN, K. J.; SULLIVAN, E. L. The role of maternal obesity in the risk of neuropsychiatric disorders. **Front Neurosci**, 9, p. 194, 2015.

RIVERA, H. M.; KIEVIT, P.; KIRIGITI, M. A.; BAUMAN, L. A. *et al.* Maternal high-fat diet and obesity impact palatable food intake and dopamine signaling in nonhuman primate offspring. **Obesity (Silver Spring)**, 23, n. 11, p. 2157-2164, Nov 2015.

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

SEET, E. L.; YEE, J. K.; JELLYMAN, J. K.; HAN, G. *et al.* Maternal high-fat-diet programs rat offspring liver fatty acid metabolism. **Lipids**, 50, n. 6, p. 565-573, Jun 2015.

SHARMA, S.; ZHUANG, Y.; GOMEZ-PINILLA, F. High-fat diet transition reduces brain DHA levels associated with altered brain plasticity and behaviour. **Sci Rep**, 2, p. 431, 2012.

SHETTY, P. Nutrition transition and its health outcomes. **Indian J Pediatr**, 80 Suppl 1, p. S21-27, Mar 2013.

SILVA, C. M.; GONCALVES, L.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; NOGUEIRA, M. I. Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. **Neurosci Lett**, 483, n. 3, p. 179-183, Oct 15 2010.

SPEIGHT, A.; DAVEY, W. G.; MCKENNA, E.; VOIGT, J. W. Exposure to a maternal cafeteria diet changes open-field behaviour in the developing offspring. **Int J Dev Neurosci**, 57, p. 34-40, Apr 2017.

SRINIVASAN, M.; KATEWA, S. D.; PALANIYAPPAN, A.; PANDYA, J. D. *et al.* Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 291, n. 4, p. E792-799, Oct 2006.

STEARNS, S.; DE JONG, G.; NEWMAN, B. The effects of phenotypic plasticity on genetic correlations. **Trends Ecol Evol**, 6, n. 4, p. 122-126, Apr 1991.

SULLIVAN, E. L.; GRAYSON, B.; TAKAHASHI, D.; ROBERTSON, N. *et al.* Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. **J Neurosci**, 30, n. 10, p. 3826-3830, Mar 10 2010.

SULLIVAN, E. L.; NOUSEN, E. K.; CHAMLOU, K. A. Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. **Physiol Behav**, 123, p. 236-242, Jan 17 2014.

SULLIVAN, E. L.; NOUSEN, E. K.; CHAMLOU, K. A.; GROVE, K. L. The Impact of Maternal High-Fat Diet Consumption on Neural Development and Behavior of Offspring. **Int J Obes Suppl**, 2, p. S7-S13, 2012.

SULLIVAN, E. L.; RIPER, K. M.; LOCKARD, R.; VALLEAU, J. C. Maternal high-fat diet programming of the neuroendocrine system and behavior. **Horm Behav**, 76, p. 153-161, Nov 2015.

SULLIVAN, E. L.; RIVERA, H. M.; TRUE, C. A.; FRANCO, J. G. *et al.* Maternal and postnatal high-fat diet consumption programs energy balance and hypothalamic melanocortin signaling in nonhuman primate offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 313, n. 2, p. R169-R179, Aug 01 2017.

SULLIVAN, E. L.; SMITH, M. S.; GROVE, K. L. Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. **Neuroendocrinology**, 93, n. 1, p. 1-8, 2011.

THOMPSON, J. R.; VALLEAU, J. C.; BARLING, A. N.; FRANCO, J. G. *et al.* Exposure to a High-Fat Diet during Early Development Programs Behavior and Impairs the Central Serotonergic System in Juvenile Non-Human Primates. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 8, p. 164, 2017.

THOMPSON, M. D.; CISMOWSKI, M. J.; TRASK, A. J.; LALLIER, S. W. *et al.* Enhanced Steatosis and Fibrosis in Liver of Adult Offspring Exposed to Maternal High-Fat Diet. **Gene Expr**, 17, n. 1, p. 47-59, 2016.

UMEKAWA, T.; SUGIYAMA, T.; DU, Q.; MURABAYASHI, N. *et al.* A maternal mouse diet with moderately high-fat levels does not lead to maternal obesity but causes mesenteric adipose tissue dysfunction in male offspring. **J Nutr Biochem**, 26, n. 3, p. 259-266, Mar 2015.

UNIS, A.; ABDELBAR, A.; HAMZA, M. Comparison of the effects of escitalopram and atorvastatin on diet-induced atherosclerosis in rats. **Can J Physiol Pharmacol**, 92, n. 3, p. 226-233, Mar 2014.

VITALIS, T.; CASES, O.; PASSEMARD, S.; CALLEBERT, J. *et al.* Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. **Eur J Neurosci**, 26, n. 2, p. 331-344, Jul 2007.

WALTER, I.; KLAUS, S. Maternal high-fat diet consumption impairs exercise performance in offspring. **J Nutr Sci**, 3, p. e61, 2014.

WATANABE, H.; NAKANO, T.; SAITO, R.; AKASAKA, D. *et al.* Serotonin Improves High Fat Diet Induced Obesity in Mice. **PLoS One**, 11, n. 1, p. e0147143, 2016.

WELLS, J. C. Maternal capital and the metabolic ghetto: An evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities. **Am J Hum Biol**, 22, n. 1, p. 1-17, Jan-Feb 2010.

WELLS, J. C. The thrifty phenotype: An adaptation in growth or metabolism? **Am J Hum Biol**, 23, n. 1, p. 65-75, Jan-Feb 2011.

WEST-EBERHARD, M. J. Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review). **Proc Natl Acad Sci U S A**, 83, n. 5, p. 1388-1392, Mar 1986a.

WEST-EBERHARD, M. J. Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 83, n. 5, p. 1388-1392, Mar 1986b.

WEST-EBERHARD, M. J. Developmental plasticity and the origin of species differences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102 Suppl 1, p. 6543-6549, May 03 2005a.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, 304, n. 6, p. 610-618, Nov 15 2005b.

WHITAKER-AZMITIA, P. M.; AZMITIA, E. C. Astroglial 5-HT_{1a} receptors and S-100 beta in development and plasticity. **Perspect Dev Neurobiol**, 2, n. 3, p. 233-238, 1994.

WHITAKER-AZMITIA, P. M.; MURPHY, R.; AZMITIA, E. C. Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. **Brain Res**, 528, n. 1, p. 155-158, Sep 24 1990.

WRIGHT, T. M.; FONE, K. C.; LANGLEY-EVANS, S. C.; VOIGT, J. P. Exposure to maternal consumption of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behaviour in the rat. **Int J Dev Neurosci**, 29, n. 8, p. 785-793, Dec 2011.

XU, Y.; JONES, J. E.; KOHNO, D.; WILLIAMS, K. W. *et al.* 5-HT₂CRs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. **Neuron**, 60, n. 4, p. 582-589, Nov 26 2008.

YOKOMIZO, H.; INOBUCHI, T.; SONODA, N.; SAKAKI, Y. *et al.* Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic beta-cell function in adult offspring with sex differences in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 306, n. 10, p. E1163-1175, May 15 2014.

ZEMDEGS, J.; QUESSEVEUR, G.; JARRIAULT, D.; PENICAUD, L. *et al.* High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function and anxiety-like behavior in mice. **Br J Pharmacol**, 173, n. 13, p. 2095-2110, Jul 2016.

APÊNDICE A - ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA (PUBLICADO)

European Journal of Pharmacology 833 (2018) 298–306



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

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



Long term effects of neonatal exposure to fluoxetine on energy balance: A systematic review of experimental studies



Manuella da L.D. Barros^a, Raul Manhães-de-Castro^b, Daniele T. Alves^b, Omar Guzmán Quevedo^c, Ana Elisa Toscano^d, Alexandre Bonnin^e, Ligia Galindo^{f,*}

^a Graduate Program in Nutrition, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^c Facultad de Químico-Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, C. P. 58240, Morelia, Michoacán, Mexico

^d Department of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil

^e Zilkha Neurogenetic Institute and Department of Cell and Neurobiology, Keck School of Medicine of University of Southern California, Los Angeles, CA 90089, United States

^f Department of Anatomy, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Fluoxetine
Serotonin uptake inhibitors
Body weight
Feeding behavior
Energy balance

ABSTRACT

Serotonin exerts a modulating function on the development of the central nervous system, including hypothalamic circuits controlling feeding behavior and energy expenditure. Based on the developmental plasticity theory, early disturbances of synaptic availability of serotonin may promote phenotypic adaptations and late disorders of energy balance regulation leading to obesity and associated diseases. The aim of this systematic review is to determine the effects of pharmacological neonatal inhibition of serotonin reuptake by fluoxetine, on parameters related to feeding behavior and energy balance. Literature searches were performed in Medline/PubMed and Lilacs databases, out of which 9726 studies were found. Using predefined protocol and registered on CAMARADES website, 23 studies were included for qualitative synthesis. The internal validity was assessed using the SYRCL's risk of bias tool. Kappa index was also measured for analyzing the concordance between the reviewers. In addition, the PRISMA statement was used for reporting this systematic review. Most of the included studies demonstrated that neonatal serotonin reuptake inhibition is associated with long term reduced body weight, lower fat mass and higher thermogenic capacity and mitochondrial oxygen consumption in key metabolic tissues. Therefore, experimental fluoxetine exposure during neonatal development may promote long-term changes related to energy balance associated with a lean phenotype.

1. Introduction

Developmental plasticity refers to the ability of organisms to generate different phenotypes in response to environmental variations during early life (West-Eberhard, 2005). However, developmental phenotypic adaptations may constitute the origin of long-term health problems (Gluckman et al., 2007). Human and experimental studies have demonstrated that perinatal maternal malnutrition disturbs offspring metabolism and energy balance, increasing the risk of obesity and chronic degenerative diseases in adult life (Ravelli et al., 1976; Hales and Barker, 1992; Orozco-Solis et al., 2009; dos Santos Perez et al., 2015). Perinatal exposure to several environmental factors such as maternal stress, early weaning, maternal separation and drugs may also alter energy balance (Oliveira Ldos et al., 2011; Kummet et al.,

2012; de Souza et al., 2018).

Serotonin (5-HT) plays a crucial role in brain development and acts on the regulation of many behavioral and physiological functions (Brummelte et al., 2017). In rodents, the emergence of the first serotonin cells is seen as early as gestational day 12 (GD12) (Hendricks et al., 2003) and the final maturation occurs until postnatal day 21 (PND21) (Hansson et al., 1998). Fluoxetine is a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) frequently prescribed for the treatment of postpartum depression (Sghendo and Mifsud, 2012). However, that SSRI is not the first choice of antidepressant for postpartum depression, since it promotes high relative infant dose/plasma concentrations besides some adverse effects (Berle and Spigset, 2011; Chad et al., 2013). What is more, as early life exposure to SSRI, including fluoxetine, may cause neurobehavioral effects in the offspring, which is why the

* Correspondence to: Department of Anatomy, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil. ligia.mgalindo@ufpe.br

E-mail address: ligia.mgalindo@ufpe.br (L. Galindo).

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.013>

Received 15 September 2017; Received in revised form 1 June 2018; Accepted 7 June 2018
Available online 08 June 2018

0014-2999/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

pharmacological treatment of maternal depression must consider balancing risks and benefits (Glover and Clinton, 2016).

Fluoxetine-induced serotonergic activity during early life causes hypotrophy of 5-HT neurons, increased expression of S100B neuronal growth factor and increased 5-HT_{2C} receptor expression in rats, modifying serotonergic development (Silva et al., 2010; Bock et al., 2013; Galindo et al., 2015). Some studies have also observed that neonatal exposure to fluoxetine promotes increased oxygen consumption and reduced food intake and body weight in adult rats (da Silva et al. 2015a, 2015b; Galindo et al., 2015). Thus, it is reasonable to associate fluoxetine-induced changes in the development of the serotonergic system with long-term alterations in energy balance.

The balance between energy intake – EI (feeding behavior) and energy expenditure – EE (energy needed to maintain basal metabolism, to produce thermogenesis and to engage in physical activity) determine body weight and body composition (Levine, 2005; Blasco Redondo, 2015; Rogers and Brunstrom, 2016). Serotonin regulates energy balance by inhibiting neurons expressing neuropeptide Y (NPY) and stimulating neurons producing pro-opiomelanocortin (POMC) and α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) resulting in satiety (Heisler et al., 2006; Lam et al., 2008). Central serotonin activation of the melanocortinergic pathways also increases energy expenditure through sympathetic neurons from the hypothalamus to target tissues such as white and brown adipose tissues, stimulating lipolysis and thermogenesis (Steffens et al., 1988; Hoyer et al., 2002; Brito et al., 2007; McGlashon et al., 2015). The role of serotonin on EI and EE is well established; however, the effects of higher serotonin availability induced by fluoxetine during lactation needs to be better explored being the aim of this review.

2. Materials and methods

The protocol of this systematic review was published online in (<http://www.dcn.ed.ac.uk/camarades/research.html#protocols>) on the CAMARADES (Collaborative Approach to Meta Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies) website, according to the format for animal intervention studies determined by SYRCL (Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation) (de Vries et al., 2015). For reporting data, recommendations proposed by the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) statement were followed (Liberati et al., 2009). Two reviewers (Barros, MLD and Alves, DT) independently and concurrently conducted this study by using the predefined protocol. A third appraiser (Galindo, L) was consulted in case of disagreements between reviewers. This systematic review was carried out in two phases: study selection and data collection.

The study selection was performed in two steps. Firstly, searches were conducted in the electronic databases Medline/PubMed (National Library of Medicine/Medical Literature Analysis and Retrieve System Online) and Lilacs (Latin American and Caribbean Health Sciences) in May 2017. For the search filters, the following descriptors, surveyed in MeSH and DeCS terms, were used: “fluoxetine”, “serotonin uptake inhibitors”, “antidepressants”, “body constitution”, “feeding behavior”, “appetite regulation”, “eating”, “energy metabolism”, “body temperature”, “oxygen consumption” and “motor activity”. Studies were selected based on titles and abstracts. In the second step of study selection, eligible texts were fully read to determine definitive inclusion or exclusion. The reference lists of primary studies were also searched in order to screen for further studies.

The selection criteria predefined in the protocol determined the inclusion or exclusion of studies during selection. Articles that were included had to satisfy the following conditions: 1) Original articles from experimental studies using rats or mice as animal models; 2) studies that used chronic administration of fluoxetine solely during the neonatal period (between the 1st and 21st PND); 3) studies that evaluated body weight, fat mass, food intake, body temperature, oxygen

consumption and physical activity as parameters related to energy balance in young or adult life. No language or date of publication restrictions was established. However, a search filter was activated to show only studies performed in animal models. Articles that used post-stress diet consumption or food intake in hyponeophagia tests were excluded.

Data collection from selected studies was carried out in three steps: collection of study characteristics, collection of results and collection of components used to assess the risk of bias. The following data regarding study characteristics were collected: name of first author, year of publication, study population, intervention period and time, dose and route of administration. The results were collected for qualitative synthesis such as the variables/parameters analyzed and the offspring age at outcome evaluation. It is important to characterize the intervention period, since different processes of central nervous system maturation influenced by 5-HT occur during the neonatal period in rats and mice. The axonal elongation is completed in the first postnatal week, and in the second and third weeks of life synaptogenesis, dendritic elaboration and myelination occur more intensely (Whitaker-Azmitia and Azmitia, 1986; Whitaker-Azmitia et al., 1996; Rice and Barone, 2000). Intervention time may also influence outcomes, since there is circadian variation in brain and plasma levels of 5-HT with hypothalamic peaks occurring at the beginning of the dark phase (Sanchez et al., 2008). In addition, drug administration requires the separation of litters from their mothers for a few moments and it has been shown that maternal separation has a long-term impact on the feeding behavior of rats depending on the light cycle phase in which the intervention is performed (da Silva et al., 2014a, 2014b). Moreover, dose and route of administration may also modify the pharmacological effects of fluoxetine, since, in pharmacokinetic terms, the half-life as well as the bioavailability of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine depends on these factors (Caccia et al., 1990; Qu et al., 2009; Sawyer and Howell, 2011).

Moreover, the quality of studies selected for review was evaluated considering individual components that may interfere with internal validity of animal experimental studies, according to the recommendations of SYRCL's risk of bias tool by Hooijmans et al. (2014). The following items were evaluated: randomization, blinding, temperature, lighting, animal housing conditions (number of animals per cage, environmental enrichment and management) and nutrition (food access and type of food). Randomization and blinding are essential components to minimize the risk of bias by ensuring the internal quality of the research as well as the reliability of the results found (Hooijmans et al., 2014). Therefore, it should be part of the methods of experimental studies (Hooijmans et al., 2014). Since there is circadian variation of hypothalamic levels of 5-HT, housing information (lighting) is important to determine exactly the time of the circadian cycle in which fluoxetine administration was performed (Sanchez et al., 2008). Temperature, animal housing conditions and nutrition should also be evaluated, since they may modify some outcomes such as body temperature/thermogenesis, physical activity and feeding behavior (Rodgers et al., 2010; Hooijmans et al., 2014).

The studies were also assessed for compliance and ethical approval by an independent organization within the Research Center, and adherence with National or International Regulatory Principles. These aspects are important to ensure the implementation of bioethical laws and principles, the environmental control of the vivarium to reduce the risk of bias and the minimal use of experimental animals, obeying the principles of the 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) (Hooijmans et al., 2014). Finally, to analyze the degree of agreement between the first and second reviewer, beyond what would be expected by random chance, the Kappa measure was performed for risk of bias assessment (Viera and Garrett, 2005).

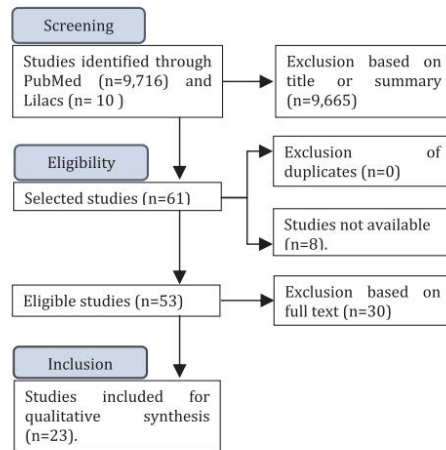


Fig. 1. Flowchart of the literature search and study selection for the systematic review, in accordance with the PRISMA statement (Liberati et al., 2009).

3. Results

A total of 9726 studies were identified in the literature search: 9716 in Medline/PubMed and 10 in Lilacs. Of these, 61 met the inclusion criteria by title and summary, from which 8 pre-selected and identified articles from PubMed could not be obtained. No duplicate was found. Finally, after applying inclusion and exclusion criteria (as defined in the Methods section) and fully reading the 53 eligible texts, 23 studies were included in this review. (Fig. 1).

The main characteristics of the included studies are described in Table 1. Of the 23 selected articles, 16 used only male rats or mice (Mendes-da-Silva et al., 2002; Chang et al., 2006; Toscano et al., 2008; Karpova et al., 2009; Rayen et al., 2011; Zheng et al., 2011; Lee, 2012; Nagano et al., 2012; Rayen et al., 2013; da Silva et al., 2014a, 2014b; Ko et al., 2014; Sarkar et al., 2014; da Silva et al., 2015a, 2015b; Galindo et al., 2015; Braz et al., 2016a, 2016b), 5 evaluated males and females (Dow-Edwards, 1998; Ansorge et al., 2004; Ansorge et al., 2008; Lee, 2009; Altieri et al., 2015) and 2 used only females (Rayen et al., 2014; Braz et al., 2016a, 2016b). The intervention period with fluoxetine was heterogeneous among the selected studies. Eleven articles administered fluoxetine daily from the 1st to 21st PND (Mendes-da-Silva et al., 2002; Toscano et al., 2008; Rayen et al., 2011; Rayen et al., 2013; da Silva et al., 2014a, 2014b; Rayen et al., 2014; da Silva et al., 2015a, 2015b; Galindo et al. 2015; Braz et al., 2016a, 2016b). The others administered the drug at different periods and frequency during the lactation phase (Dow-Edwards, 1998; Ansorge et al., 2004; Chang et al., 2006; Ansorge et al., 2008; Karpova et al., 2009; Lee, 2009; Zheng et al., 2011; Lee, 2012; Nagano et al., 2012; Ko et al., 2014; Sarkar et al., 2014; Altieri et al., 2015). Eleven studies did not report the circadian time of administration of the drug (Dow-Edwards, 1998; Mendes-da-Silva et al., 2002; Ansorge et al., 2004; Chang et al., 2006; Ansorge et al., 2008; Toscano et al., 2008; Lee, 2009; Zheng et al., 2011; Lee, 2012; Ko et al., 2014; Braz et al., 2016a, 2016b). Furthermore, in 1 study it was not possible to identify the moment of the light cycle in which the intervention was performed, since the time of drug administration was not associated with the light cycle (Braz et al., 2016a, 2016b). Particularly, fluoxetine was delivered continuously through osmotic minipump in 3 studies (Rayen et al., 2011; Rayen et al., 2013; Rayen et al., 2014) and the circadian time of ingestion of the drug was determined by the physiological consumption of water or food in 2 articles (Nagano et al., 2012; Sarkar et al., 2014). The chosen dose was

Table 1
Characteristics of selected studies. PND = postnatal day, (-) = not described.

Author, year	Population	Period of intervention	Circadian time of intervention	Dose	Route of administration
Dow-Edwards (1998)	Sprague-Dawley COBS rats (Male and female)	PND 11–19 (on alternate days)	-	25 mg/kg	Subcutaneous
Mendes-da-Silva et al. (2002)	Wistar rats (Male)	PND 1–21 (every day)	-	10 mg/kg	Subcutaneous
Ansorge et al. (2004)	Mice (Male and female wild-type and SERT-deficient mice)	PND 4–21 (every day)	-	10 mg/kg	Intraperitoneal
Chang et al. (2006)	Sprague-Dawley rats (Male)	PND 1–7 (every day)	-	5 mg/kg	Intraperitoneal
Ansorge et al. (2008)	Mice (Male and female wild-type and SERT-deficient mice)	PND 4–21 (every day)	-	10 mg/kg	Subcutaneous
Toscano et al. (2008)	Wistar rats (Male)	PND 1–21 (every day)	-	10 mg/kg	Intraperitoneal
Karpova et al. (2009)	CS7BL/6J mice (Male)	PND 4–21 (every day)	-	10 mg/kg	Subcutaneous
Lee (2009)	Wistar rats (Male and female)	PND 0–6 (every day)	10:00–11:00 a.m.	10 mg/kg	Intraperitoneal
Rayen et al. (2011)	Sprague-Dawley rats (Male)	PND 1–21 (every day)	Continuously	5 mg/kg	Subcutaneous
Zheng et al. (2011)	CS7 mice (wild-type) (Male)	PND 4–21 (every day)	-	10 mg/kg	Osmotic minipumps implanted to the dam
Lee (2012)	Wistar rats (Male)	PND 0–4 (every day)	-	20 mg/kg	Intraperitoneal
Nagano et al. (2012)	Sprague-Dawley rats (Male)	PND 2–21 (every day)	Depended on water intake	0.1 mg/mL	Subcutaneous
Rayen et al. (2013)	Sprague-Dawley rats (Male)	PND 1–21 (every day)	Continuously	5 mg/kg	Osmotic minipumps implanted to the dam
da Silva et al. (2014a, 2014b)	Wistar rats (Male)	PND 0–4 (twice a day)	07:00–08:00 a.m.	10 mg/kg	Subcutaneous
Ko et al. (2014)	Wistar rats (Male)	PND 1–21 (every day)	-	20 mg/kg	Subcutaneous
Rayen et al. (2014)	Sprague-Dawley rats (Female)	PND 1–21 (every day)	Continuously	5 mg/kg	Osmotic minipumps implanted to the dam
Sarkar et al. (2014)	Sprague-Dawley rats (Male)	PND 2–21 (every day)	Depended on the food intake	10 mg/kg	Oral – feeding needle
Altieri et al. (2015)	Mice (Male and female wild-type SERT +/+)	PND 5–21 (every day)	02:00 p.m.	10 mg/kg	Subcutaneous
Galindo et al. (2015)	Wistar rats (Male)	PND 1–21 (every day)	07:00–08:00 a.m.	10 mg/kg	Subcutaneous
da Silva et al. (2015a, 2015b)	Wistar rats (Male)	PND 1–21 (every day)	07:00–08:00 a.m.	10 mg/kg	Subcutaneous
da Silva et al. (2015a, 2015b)	Wistar rats (Male)	PND 1–21 (every day)	07:00–08:00 a.m.	10 mg/kg	Subcutaneous
Braz et al. (2016a, 2016b)	Wistar rats (Male)	PND 1–21 (every day)	07:00–08:00 a.m.	10 mg/kg	Subcutaneous
Braz et al. (2016a, 2016b)	Wistar rats (Female)	PND 1–21 (every day)	07:00–08:00 a.m.	10 mg/kg	Subcutaneous

Table 2

Risk of bias assessment using the SYRCLE's tool (47). (+) = described; (-) = not described; (?) = described, but method not reported.

Checklist	Randomization	Blinding	Temperature	Lighting	Housing conditions	Nutrition	Institutional ethics committee	National or international regulatory principles
Dow-Edwards (1998)	-	-	-	+	+	+	+	-
Mendes-da-Silva et al. (2002)	?	-	+	+	-	+	-	-
Ansorge et al. (2004)	?	-	-	-	-	-	-	-
Chang et al. (2006)	-	-	-	+	+	-	+	-
Ansorge et al. (2008)	?	-	-	+	-	+	-	+
Toscano et al. (2008)	?	-	+	+	-	+	-	-
Karpova et al. (2009)	?	-	+	+	-	+	+	+
Lee (2009)	-	-	-	+	-	+	+	-
Rayen et al. (2011)	?	-	-	+	-	+	+	+
Zheng et al. (2011)	?	+	-	+	-	-	+	+
Lee (2012)	-	-	-	+	-	+	+	-
Nagano et al. (2012)	-	-	+	+	+	+	+	+
Rayen et al. (2013)	?	-	-	+	+	+	+	+
da Silva et al. (2014a, 2014b)	-	-	+	+	-	+	+	+
Ko et al. (2014)	-	-	-	+	-	+	+	-
Rayen et al. (2014)	-	-	-	+	+	+	+	+
Sarkar et al. (2014)	?	-	-	+	+	+	+	+
Altieri et al. (2015)	-	-	-	+	-	+	+	+
Galindo et al. (2015)	-	-	+	+	+	+	+	+
da Silva et al. (2015a, 2015b)	-	-	+	+	-	+	+	+
da Silva et al. (2015a, 2015b)	-	-	+	+	-	+	+	+
Braz et al. (2016a, 2016b)	?	-	+	+	-	+	+	+
Braz et al. (2016a, 2016b)	?	-	+	+	-	+	+	-

also a heterogeneous feature among the selected studies. Most studies (15 out of 23) used a dose of 10 mg/kg of body weight, while others (7) used doses of 5–25 mg/kg (Dow-Edwards, 1998; Chang et al., 2006; Rayen et al., 2011; Lee, 2012; Rayen et al., 2013; Ko et al., 2014; Rayen et al., 2014). One study carried out the pharmacological exposure through drinking water at a concentration of 0.1 mg/mL (Nagano et al., 2012). In addition, routes of administration were either subcutaneous or intraperitoneal. Only 3 studies used osmotic minipumps implanted subcutaneously to the dam (Rayen et al., 2011; Rayen et al., 2013; Rayen et al., 2014) and 2 articles added the drug to drinking water or food (Nagano et al., 2012; Sarkar et al., 2014). Even though the drug was administered to mothers, those studies were included because fluoxetine and their metabolites can reach the neonate through breast milk and were detectable both in the plasma and in the pups' brains where they can have potential effects on the developing serotonergic system and hypothalamus (Kiryanova et al., 2016).

To assess the quality of the studies (internal validity), we used individual components recommended by SYRCLE's risk of bias tool published by Hooijmans et al. (2014) (Table 2). Only one of the selected studies reported the blinding of investigators for both the pharmacological intervention and the outcome assessments (Zheng et al., 2011). Seven studies provided the necessary information to assess housing conditions, for example, the number of animals kept per cage (Dow-Edwards, 1998; Chang et al., 2006; Nagano et al., 2012; Rayen et al., 2013; Rayen et al., 2014; Sarkar et al., 2014; Galindo et al., 2015). In addition, although 11 studies had stated that they performed randomization, none of them described how this was done (Mendes-da-Silva et al., 2002; Ansorge et al., 2004; Ansorge et al., 2008; Toscano et al., 2008; Karpova et al., 2009; Rayen et al., 2011; Zheng et al., 2011; Rayen et al., 2013; Sarkar et al., 2014; Braz et al., 2016a, 2016b). Of the 23 studies selected, 10 did not mention submission of the research project to the institutional ethics committee and/or the regulatory principles that guided the practices and care for experimental animals (Dow-Edwards, 1998; Mendes-da-Silva et al., 2002; Ansorge et al., 2004; Chang et al., 2006; Ansorge et al., 2008; Toscano et al., 2008;

Lee, 2009; Lee, 2012; Ko et al., 2014; Braz et al., 2016a, 2016b). Thirteen studies did not report temperature conditions (Dow-Edwards, 1998; Ansorge et al., 2004; Chang et al., 2006; Ansorge et al., 2008; Lee, 2009; Rayen et al., 2011; Zheng et al., 2011; Lee, 2012; Rayen et al., 2013; Ko et al., 2014; Rayen et al., 2014; Sarkar et al., 2014; Altieri et al., 2015) and only 1 did not describe lighting conditions (Ansorge et al., 2004). Although they used light/dark cycle 12/12 h, 7 studies did not report the time at which the lights were on (Dow-Edwards, 1998; Chang et al., 2006; Lee, 2009; Zheng et al., 2011; Ko et al., 2014; Sarkar et al., 2014; Braz et al., 2016a, 2016b). In addition, 3 articles included in this review did not mention access and/or type of nutrition (Ansorge et al., 2004; Chang et al., 2006; Zheng et al., 2011). For all these parameters, the Kappa index (concordance between reviewers) was equal to 1.

This systematic review presents studies that evaluated body weight, fat mass, food intake, body temperature, oxygen consumption or physical activity in young and/or adult life after neonatal exposure to fluoxetine. The results from selected articles are described in three subgroups: body constitution, feeding behavior and energy expenditure (Table 3).

Besides exercising broad function during neurodevelopment, serotonin participates in the central control of feeding behavior and energy expenditure during adult life (Whitaker-Azmitia et al., 1996; Donovan and Tecott, 2013). Therefore, based on the developmental plasticity theory, manipulation of the serotonergic system during lactation could modify energy balance and, consequently, body weight in the long term (West-Eberhard, 2005; Gluckman et al., 2007). Taking this into account, fifteen of the included studies evaluated the effects of fluoxetine treatment during nursing on body weight at a young and/or an adult age (Dow-Edwards, 1998; Mendes-da-Silva et al., 2002; Toscano et al., 2008; Karpova et al., 2009; Rayen et al., 2011; Lee, 2012; Nagano et al., 2012; Rayen et al., 2013; da Silva et al., 2014a, 2014b; Rayen et al., 2014; Altieri et al., 2015; da Silva et al., 2015a, 2015b; Galindo et al., 2015; Braz et al., 2016a, 2016b) and most of these studies (10 out of 15) found a body weight reduction in both

Table 3

Effects of neonatal exposure to fluoxetine on the variables analyzed related to energy balance. PND = postnatal day; ND = no difference.

Author, year	Outcomes analyzed	Age of the samples to outcomes	Results
BODY CONSTITUTION			
Dow-Edwards (1998)	Body weight	60 days of age	ND
Mendes-da-Silva et al. (2002)	Body weight	60 days of age	ND
Toscano et al. (2008)	Body weight	30 days of age 71 days of age	Reduction ND
Karpova et al. (2009)	Body weight	90 and 110 days of age	Reduction
Rayen et al. (2011)	Percentage in weight gain	From PND29 to PND42 (rats were weighed once between PND 29–31 and once between PND 39–42)	Reduction
Lee (2012)	Body weight	30 days of age	ND
Nagano et al. (2012)	Body weight	7 weeks of age 10 weeks of age	ND Reduction
Rayen et al. (2013)	Body weight	Between PND 70–76	ND
da Silva et al. (2014a, 2014b)	Body weight	60 days of age	Reduction
Rayen et al. (2014)	Body weight	Between PND 108–116	ND
Altieri et al. (2015)	Body weight	3 or 10 months of age (adulthood)	Reduction
Galindo et al. (2015)	Body weight	30, 60, 90, 120, 150, 180 and 215 days of age	Reduction
	Abdominal fat gain	215 days of age (after 5 weeks of a hypercaloric diet)	ND
		215 days of age (after 5 weeks of a hypercaloric diet)	Reduction
da Silva et al. (2015a, 2015b)	Body weight	40 and 60 days of age	Reduction
	White adipose tissue	60 days of age	Reduction
da Silva et al. (2015a, 2015b)	Body weight	60 days of age	Reduction
Braz et al. (2016a, 2016b)	Body weight	40 and 60 days of age	Reduction
FEEDING BEHAVIOR			
da Silva et al. (2014a, 2014b)	Chow food intake	40 days of age	ND
Galindo et al. (2015)	Chow food intake	180 days of age	Reduction
	Hypercaloric food intake	From PND 180 to PND 215 (during 5 weeks of a hypercaloric diet)	ND
da Silva et al. (2015a, 2015b)	Chow food intake	40 days of age	ND
ENERGY EXPENDITURE			
Dow-Edwards (1998)	Motor activity* (Similar to OFT)	60 days of age	Male: ND in distance traveled and vertical activity, but loss of sensitivity to the depressive effects of quipazine on distance traveled and vertical activity. Female: Reduction in distance traveled and ND in vertical activity, but loss of quipazine sensitivity on vertical activity.
Ansorge et al. (2004)	Motor activity	Starting at 12 weeks of age	Home-cage activity: ND Open field test: Reduction in distance traveled, ambulatory time and vertical activity
Chang et al. (2006)	Motor activity (Open field test)	45 days of age	ND
Ansorge et al. (2008)	Motor activity (Open field test)	2 months of age 3 months of age 16 months of age	ND Reduction in ambulatory time and vertical activity Reduction in ambulatory time
Karpova et al. (2009)	Motor activity (Open field test)	110 days of age	Reduction in rearing time
Lee (2009)	Motor activity (Open field test)	30–35 days of age	Reduction in total ambulation and rearing
Rayen et al. (2011)	Motor activity (Open field test)	Once between PND 32–34	ND
Zheng et al. (2011)	Motor activity (Open field test)	100 days of age	Reduction in total distance traveled and moving time
Lee (2012)	Motor activity (Open field test)	30 days of age	Reduction in travel distance and entrance times
Nagano et al. (2012)	Motor activity (Open field test)	11–13 weeks of age	ND
Rayen et al. (2013)	Motor activity (Similar to OFT)	Once between PND 70–76	ND
Ko et al. (2014)	Motor activity (Open field test)	> 8 weeks of age	Reduction in distance traveled
Rayen et al. (2014)	Motor activity (Similar to OFT)	Once between PND 92–103	ND
Sarkar et al. (2014)	Motor activity (Open field test)	90 days of age	ND
Altieri et al. (2015)	Motor activity	3 or 10 months of age (adulthood)	Reduction in exploration (total arm entries and rears in the elevated plus maze and total distance traveled in the open field)

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Author, year	Outcomes analyzed	Age of the samples to outcomes	Results
da Silva et al. (2015a, 2015b)	Motor activity Body temperature (Rectal temperature) Basal mitochondrial oxygen consumption (Brown adipose tissue)	40 days of age 60 days of age	Home cage voluntary locomotor activity for 24h: ND Basal: ND After cold exposure (15°C): Lower Δ temperature Increase
da Silva et al. (2015a, 2015b)	Basal mitochondrial oxygen consumption (Skeletal muscle)	60 days of age	Increase
Braz et al. (2016a, 2016b)	Basal mitochondrial oxygen consumption (Heart)	60 days of age	Reduction, but increase in respiratory control ratio

young and/or adult life (Toscano et al., 2008; Karpova et al., 2009; Rayen et al., 2011; Nagano et al., 2012; da Silva et al., 2014a, 2014b; Altieri et al., 2015; da Silva et al., 2015a, 2015b; Galindo et al., 2015; Braz et al., 2016a, 2016b). Interestingly, two studies observed body weight reduction and no difference at different ages of evaluation (Toscano et al., 2008; Nagano et al., 2012).

To elucidate whether reduction of body weight was maintained throughout life, and if it was accompanied by reduction of body adiposity, this review investigated the repercussions of neonatal exposure to fluoxetine on white adipose tissue (WAT). da Silva et al. (2015a, 2015b) observed a reduction in total body adiposity (mesenteric and epididymal) and in body adiposity relative to body weight in 60-day old male rats treated with fluoxetine during lactation and fed a standard diet (da Silva et al., 2015a, 2015b). Although Galindo et al. (2015) did not identify any alterations in abdominal adiposity in 180-day old male rats after neonatal fluoxetine treatment, they found a lower accumulation of abdominal fat when the fluoxetine-treated rats were fed a hypercaloric diet for five weeks (from 180 to 215 days of age) (Galindo et al., 2015). This was observed even though the hypercaloric diet consumption was similar between control and fluoxetine groups (Galindo et al., 2015). In addition, triglyceride levels as well as plasma cholesterol levels did not differ between fluoxetine-treated and untreated groups either before or after the exposure to a hypercaloric diet (Galindo et al., 2015).

Body weight is directly related to energy balance and its reduction may be associated with lower EI and/or higher EE (Rogers and Brunstrom, 2016). In terms of food intake, Galindo et al. (2015) identified that increased neonatal serotonergic activity reduces standard diet consumption in 180-day old rats (Galindo et al., 2015). However, da Silva et al. (2014a, 2014b, 2015a, 2015b) did not observe any alterations in standard diet consumption in young rats of 40 days of age (da Silva et al., 2014a, 2014b; da Silva et al., 2015a, 2015b). Although fluoxetine has anorexic effects on caloric intake, in the study by da Silva et al. (2015a, 2015b), milk consumption was also not altered in rats at the 7th, 14th and 21st postnatal days using fluoxetine administration (Lauzurica et al., 2013; da Silva et al., 2015a, 2015b).

This review also aims at clarifying if a reduction of body weight and body fat is associated with an increase in EE. Hence, some parameters related to basal metabolism, thermogenesis and physical activity were investigated. Although there are several ways for evaluating the basal metabolic rate (or resting EE), measuring oxygen consumption is considered the most precise method (Blasco Redondo, 2015). Two of the studies selected for qualitative synthesis pointed to higher basal mitochondrial O_2 consumption in brown adipose tissue (BAT) (da Silva et al., 2015a, 2015b) and skeletal muscle (da Silva et al., 2015a, 2015b) in 60-day old rats submitted to neonatal treatment with fluoxetine. In these studies, higher ADP-stimulation, resting and uncoupling mitochondrial oxygen consumption were also verified (da Silva et al., 2015a, 2015b). In addition, another study by Braz et al. (2016a, 2016b) observed increased mitochondrial respiratory capacity in heart tissue (Braz et al., 2016a, 2016b).

In this systematic review, we found only one article that studied the effects of neonatal exposure to fluoxetine on body temperature (the outcome chosen to indicate thermogenesis) (da Silva et al., 2015a, 2015b). da Silva et al. (2015a, 2015b) observed that the basal temperature of 40-day old rats exposed to fluoxetine during lactation was not altered (da Silva et al., 2015a, 2015b). However, when exposed to cold, these animals presented a lower body temperature drop, indicating a greater thermogenic capacity (da Silva et al., 2015a, 2015b). This study also reported that neonatal exposure to fluoxetine increased the amount of BAT, BAT/body weight as well BAT/WAT ratio (da Silva et al., 2015a, 2015b). In addition, there was an increase in the protein expression of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP-1) in the BAT (da Silva et al., 2015a, 2015b).

In addition to oxygen consumption and thermogenesis, physical activity contributes to delineating EE. The database search returned studies that evaluated physical activity using many methodologies. To better delineate outcomes, we only considered papers that evaluated “home-cage activity” or open field test - OFT (including similar apparatus/methodology) in terms of distance traveled, total ambulation (quantified in time, space or counts) and vertical activity. These criteria returned 2 studies that analyzed the effects of neonatal exposure to fluoxetine on home-cage activity in 12-week old mice (Ansorge et al., 2004) and 40-day old rats (da Silva et al., 2015a, 2015b). Despite methodological differences, the studies by Ansorge et al. (2004) and da Silva et al. (2015a, 2015b) did not find effects of early life fluoxetine exposure on time of free locomotor activities or activity counts in both young and adult animals (Ansorge et al., 2004; da Silva et al., 2015a, 2015b). Fifteen studies assessed the effects of neonatal exposure to fluoxetine on locomotor activity using the OFT or a similar apparatus/methodology (Dow-Edwards, 1998; Ansorge et al., 2004; Chang et al., 2006; Ansorge et al., 2008; Karpova et al., 2009; Lee, 2009; Rayen et al., 2011; Zheng et al., 2011; Lee, 2012; Nagano et al., 2012; Rayen et al., 2013; Ko et al., 2014; Rayen et al., 2014; Sarkar et al., 2014; Altieri et al., 2015). Some studies reported reduction of locomotor activity (Dow-Edwards, 1998; Ansorge et al., 2004; Ansorge et al., 2008; Karpova et al., 2009; Lee, 2009; Zheng et al., 2011; Lee, 2012; Ko et al., 2014; Altieri et al., 2015), while others showed no difference between treated and untreated animals (Dow-Edwards, 1998; Chang et al., 2006; Ansorge et al., 2008; Rayen et al., 2011; Nagano et al., 2012; Rayen et al., 2013; Rayen et al., 2014; Sarkar et al., 2014), depending for example on the sex and the age of animals that were analyzed.

4. Discussion

Overall, the results suggest that neonatal exposure to fluoxetine may affect early and long term body weight, even though route, dose and period of administration were different among the studies analyzed. The neonatal reduction of body weight during SSRI administration is accompanied by reduced somatic growth and cranio-encephalic development, also starting in the first postnatal week (Deiro et al., 2004; Deiro et al., 2006). Studies using pre-osteoblast cell culture reveal that

SSRI treatment inhibits bone development by decreasing cell proliferation and maturation (Cray et al., 2014; Fraher et al., 2016). In addition, increased 5-HT levels through diet manipulations during critical developmental periods reduce growth hormone (GH) levels and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) expression in the liver and muscle of neonates (Castrogiovanni et al., 2014). This may occur because 5-HT modulates hypothalamic growth hormone-releasing hormone (GHRH) and pituitary GH secretion, an effect that may depend on the type of 5-HT receptor stimulated (Valverde et al., 2000; Pinilla et al., 2001). Furthermore, through the 5-HT_{2C} and 5-HT_{1B} receptors, serotonin increases EE by stimulating POMC neurons to produce anorexigenic neuropeptides and inhibiting NPY neurons that express orexigenic neuropeptides, respectively (Heisler et al., 2006; Lam et al., 2008; Xu et al., 2008; Marston et al., 2011). Increased serotonergic activity on POMC and NPY neurons during lactation could increase EE and generate energy insufficiency that impedes normal neonatal growth. Therefore, the lower body weight phenotype of animals exposed to fluoxetine during lactation may also be a consequence of impaired somatic development in early postnatal life. Even though the adult phenotype could be modified during pubertal growth in the absence of SSRI exposure (Phillip et al., 2001; Takano et al., 2008), no studies evaluated the long-term repercussions of exposure to fluoxetine during nursing on murine measurements besides body weight in adulthood.

In terms of WAT, increased expression of the 5-HT_{2C} receptor and reduced expression of NPY in the hypothalamus were measured after chronic exposure to the hypercaloric diet in adult rats treated with fluoxetine during lactation (Galindo et al., 2015). Although it was recently shown that 5-HT induces lipogenesis and fat accumulation locally in the WAT, this neurotransmitter exerts a lipolytic action centrally (Watanabe et al., 2011; Oh et al., 2015; Rozenblit-Susan et al., 2016). This occurs via 5-HT_{2C} hypothalamic receptors, since 5-HT induces the production of the anorexigenic neuropeptide α -MSH that acts on the melanocortinergic receptors (Heisler et al., 2006; Marston et al., 2011). In turn, activation of these receptors stimulates EE and lipolysis in WAT through sympathetic innervations, reducing adiposity (Heisler et al., 2006; Brito et al., 2007). Chronic exposure to SSRI observed decreased retroperitoneal fat and plasma leptin levels (Dryden et al., 1999; Lauzurica et al., 2013). Thus, lower abdominal fat accumulation may result from an increase in lipid oxidation favored by increased expression of 5-HT_{2C} (Galindo et al., 2015).

Indeed, neonatal exposure to fluoxetine promotes structural changes and modifies homeostatic control mechanisms that regulate feeding behavior (Hansen and Mikkelsen, 1998; Silva et al., 2010; Limon-Morales et al., 2014; Galindo et al., 2015). For example, exposure to fluoxetine during lactation causes hypotrophy of the serotonergic system; increases 5-HT_{1A} post-synaptic receptor expression in the hypothalamus and down regulates these autoreceptors and SERT in the dorsal raphe nucleus (Hansen and Mikkelsen, 1998; Silva et al., 2010; Limon-Morales et al., 2014). It was also observed lower 5-HT_{2C} and NPY gene expression in the hypothalamus of 180-day old rats (Galindo et al., 2015). However, it wasn't verified any alteration in diet consumption in rats at 40 days of age (da Silva et al., 2014a, 2014b; da Silva et al., 2015a, 2015b). Aging alters the activity of orexigenic/anorexigenic factors, and consequently, feeding behavior (Kmiec, 2011). For example, older rats are more sensitive to the hypophagic effect of fenfluramine (Jourdan et al., 2003). In addition, the response to perinatal exposure to fluoxetine in the novelty-suppressed feeding test is age-dependent and a reduction in latency for feeding was observed only in adolescent rats (Francis-Oliveira et al., 2013). Nevertheless, it is interesting to note that alterations in the behavioral satiety sequence were observed (increased cleaning and resting times) (da Silva et al., 2014a, 2014b). In sum, neonatal increases in 5-HT levels modified central control mechanisms as well as the microstructure of feeding behavior.

Neonatal exposure to sertraline is related to higher resting oxygen consumption associated to a leaner body composition and lower BW,

featuring a hypermetabolic state, in adult mice (Kummet et al., 2012). It has been recently demonstrated that serotonin, through 5-HT_{2C} receptors, increases the expression of mitochondrial genes associated with oxidative metabolism (Harmon et al., 2016). However, the mechanisms by which neonatal exposure to SSRI promotes increased mitochondrial respiration are still unclear. Some studies indicate that fluoxetine (either acutely or chronically administered at different stages of development) increases the activity of citrate synthase; a key enzyme of the Krebs cycle (Abelaira et al., 2011; Agostinho et al., 2011; da Silva et al., 2015a, 2015b), which may be implicated in, increased respiratory activity (Groen et al., 1982; da Silva et al., 2015a, 2015b). Thus, body weight reduction could be associated with increased mitochondrial respiration in several tissues (da Silva et al., 2015a, 2015b; Braz et al., 2016a, 2016b). In addition, mitochondrial function modification in encephalic regions involved in the control of EE (e.g. hypothalamus) may also explain the phenotype of lower body weight (da Silva et al., 2015a, 2015b).

Oxygen consumption is also implicated in the production of reactive oxygen species, oxidative stress and, consequently, mitochondrial and tissue function (Sies, 1991). Therefore, some studies show that the increase of mitochondrial oxygen consumption in response to neonatal exposure to fluoxetine is accompanied by an increased activity of antioxidant enzymes and reduced reactive oxygen species production in the long-term (da Silva et al., 2014a, 2014b; da Silva et al., 2015a, 2015b; Braz et al., 2016a, 2016b). These results were observed in peripheral tissues, such as BAT, skeletal muscle and heart, but also in central nervous system regions such as the hippocampus and hypothalamus (da Silva et al., 2014a, 2014b; da Silva et al., 2015a, 2015b; Braz et al., 2016a, 2016b). Accordingly, an increase in serotonergic activity during lactation could promote higher O₂ consumption compensated with better antioxidant capacity and lower reactive oxygen species production.

The development of BAT as well as UCP-1 regulation was probably a determinant factor for the evolutionary success of mammals, since this tissue works by producing heat from food and promoting thermoregulation (Cannon and Nedergaard, 2004). Thermogenesis in BAT is activated whenever the body needs extra heat, but also by food intake (Cannon and Nedergaard, 2004). This process occurs especially in BAT through proton escape regulated by UCP-1 (Adams, 2000; Krauss et al., 2005). Centrally, the rate of thermogenesis is controlled via a neuronal pathway initiated in the hypothalamus (Cannon and Nedergaard, 2004). 5-HT that is released into the hypothalamus modulates the activity of hypothalamic POMC neurons and, consequently, regulates sympathetic flow to the BAT (Heisler et al., 2006; Brito et al., 2007). Thus, it seems that a higher amount of BAT associated with increased UCP-1 protein expression improves the thermogenic capacity in response to cold and may favor increased EE in animals exposed to fluoxetine during neonatal period (da Silva et al., 2015a, 2015b; Galindo et al., 2015).

Despite the variable results reported in OFT, many of the selected studies point out that the neonatal increase in 5-HT levels using fluoxetine causes alterations in neuromotor development and emotional behaviors, which can influence motor performance and consequently, EE (Ansorge et al., 2004; Ansorge et al., 2008; Karpova et al., 2009; Lee, 2009; Lee, 2012; Ko et al., 2014). Animals exposed to fluoxetine during neonatal period presented impairment of the structure and function of the somatosensory, motor and limbic systems associated with hypocomotion (Lee, 2009; Lee, 2012; Ko et al., 2014). Since there was no difference in home-cage activity, it was suggested that a reduction of exploratory activity in mice was related to emotional aspects expressed in response to a novel environment (Ansorge et al., 2004). Accordingly, neonatal fluoxetine-treated animals had altered adult emotional behavior, having a tendency towards anxiety and depression-related phenotypes (Ansorge et al., 2004; Ansorge et al., 2008).

The studies analyzed in this review indicate that neonatal exposure to fluoxetine promotes reduction in body weight and adiposity

throughout life. This phenotype could not be directly associated with a reduction in food intake due to the heterogeneity in the methods and results of included studies. Nevertheless, results suggest that an increase of extracellular 5-HT levels during lactation induces permanent changes in central homeostatic control as well as in the microstructure of feeding behavior. Results also suggest that offspring weight reduction could result from increased EE characterized by higher O₂ consumption and increased thermogenic capacity in key metabolic tissues. Therefore, increased neonatal extracellular 5-HT levels may support an adaptive increase in EE, promoting a lean phenotype. In metabolic terms, a phenotype that increases EE and promotes a lower body weight could be considered a positive effect of neonatal exposure to fluoxetine. However, this point should be the subject of further research, since the serotonergic system has a prominent role in the mechanisms underlying phenotypic plasticity. Lastly, early pharmacological changes in synaptic 5-HT availability might improve the metabolic plasticity, instead of acting as a disadvantageous factor.

Acknowledgments

The authors are grateful to Ashley Castellanos-Jankiewicz for the language review.

Author information

M. da L.D.B. conducted the search, analyzed the results, and wrote the manuscript; D.T.A. was the second reviewer for database searches; O.G.Q. and A.E.T. analyzed the results and helped with discussion of outcomes; A.B. contributed to the final review and edition of the manuscript; L.C.M.G. and R.M.C. designed the study, analyzed the results and wrote the manuscript.

Funding sources

This work was supported by CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development) #446675/2014-8 by L.C.M.G.; FACEPE (Foundation of Support to Science and Technology of Pernambuco) by R.M.C. and M. da L.D.B.; L.C.M.G. was also supported by CAPES Foundation Fellowship#BEX- 99999.000824/2015-01. A.B. was supported by NIMH Grant #1R01MH106806.

Conflicts of interest

The funding sources had no involvement in study design, collection, analysis, data interpretation, writing of the report, nor in the decision to submit the article for publication.

References

- Abelaira, H.M., Reus, G.Z., et al., 2011. Effects of acute and chronic treatment elicited by lamotrigine on behavior, energy metabolism, neurotrophins and signaling cascades in rats. *Neurochem. Int.* 59 (8), 1163–1174.
- Adams, S.H., 2000. Uncoupling protein homologs: emerging views of physiological function. *J. Nutr.* 130 (4), 711–714.
- Agostinho, F.R., Reus, G.Z., et al., 2011. Treatment with olanzapine, fluoxetine and olanzapine/fluoxetine alters citrate synthase activity in rat brain. *Neurosci. Lett.* 487 (3), 278–281.
- Altieri, S.C., Yang, H., et al., 2015. Perinatal vs genetic programming of serotonin states associated with anxiety. *Neuropsychopharmacology* 40 (6), 1456–1470.
- Ansorge, M.S., Morelli, E., et al., 2008. Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. *J. Neurosci.* 28 (1), 199–207.
- Ansorge, M.S., Zhou, M., et al., 2004. Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science* 306 (5697), 879–881.
- Berle, J.O., Spigset, O., 2011. Antidepressant use during breastfeeding. *Curr. Women's Health Rev.* 7 (1), 28–34.
- Blasco Redondo, R., 2015. Resting energy expenditure: assessment methods and applications. *Nutr. Hosp.* 31 (Suppl. 3), 245–254.
- Bock, N., Koc, E., et al., 2013. Chronic fluoxetine treatment changes S100B expression during postnatal rat brain development. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 23 (7), 481–489.
- Braz, G.R., Freitas, C.M., et al., 2016. Neonatal SSRI exposure improves mitochondrial function and antioxidant defense in rat heart. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 41 (4), 362–369.
- Braz, G.R., Pedroza, A.A., et al., 2016. Serotonin modulation in neonatal age does not impair cardiovascular physiology in adult female rats: hemodynamics and oxidative stress analysis. *Life Sci.* 145, 42–50.
- Brito, M.N., Brito, N.A., et al., 2007. Differential activation of the sympathetic innervation of adipose tissues by melanocortin receptor stimulation. *Endocrinology* 148 (11), 5339–5347.
- Brummelte, S., Glanaghy, E.Mc., Bonnin, A., Oberlander, T.F., 2017. Developmental changes in serotonin Signaling: Implications for early Brain function, Behavior and Adaptation. *Neurosci.* 7 (342), 212–231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.02.037>.
- Caccia, S., Cappi, M., et al., 1990. Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 100 (4), 509–514.
- Cannon, B., Nedergaard, J., 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84 (1), 277–359.
- Castrogiovanni, P., Musumeci, G., et al., 2014. Effects of high-tryptophan diet on pre- and postnatal development in rats: a morphological study. *Eur. J. Nutr.* 53 (1), 297–308.
- Chad, L., Pupco, A., et al., 2013. Update on antidepressant use during breastfeeding. *Can. Fam. Physician* 59 (6), 633–634.
- Chang, Y.C., Tzeng, S.F., et al., 2006. Early-life fluoxetine exposure reduced functional deficits after hypoxic-ischemia brain injury in rat pups. *Neurobiol. Dis.* 24 (1), 101–113.
- Cray Jr., J.J., Weinberg, S.M., et al., 2014. Selective serotonin reuptake inhibitor exposure alters osteoblast gene expression and craniofacial development in mice. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 100 (12), 912–923.
- Deiro, T.C., Manhaes-de-Castro, R., et al., 2004. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37 (10), 1503–1509.
- Deiro, T.C., Manhaes-de-Castro, R., et al., 2006. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiol. Behav.* 87 (2), 338–344.
- Donovan, M.H., Tecott, L.H., 2013. Serotonin and the regulation of mammalian energy balance. *Front. Neurosci.* 7, 36.
- Dow-Edwards, D.L., 1998. Prewaning cocaine administration alters the adult response to quipazine: comparison with fluoxetine. *Neurotoxicol. Teratol.* 20 (2), 133–142.
- Dryden, S., Brown, M., et al., 1999. Decreased plasma leptin levels in lean and obese Zucker rats after treatment with the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Horm. Metab. Res.* 31 (6), 363–366.
- Fraser, D., Hodge, J.M., et al., 2016. Citalopram and sertraline exposure compromises embryonic bone development. *Mol. Psychiatry* 21 (5), 722.
- Francis-Oliveira, J., Ponte, B., et al., 2013. Fluoxetine exposure during pregnancy and lactation: effects on acute stress response and behavior in the novelty-suppressed feeding are age and gender-dependent in rats. *Behav. Brain Res.* 252, 195–203.
- Galindo, L.C., Barros Mda, L., et al., 2015. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 46, 76–81.
- Glover, M.E., Clinton, S.M., 2016. Of rodents and humans: a comparative review of the neurobehavioral effects of early life SSRI exposure in preclinical and clinical research. *Int. J. Dev. Neurosci.* 51, 50–72.
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., et al., 2007. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am. J. Hum. Biol.* 19 (1), 1–19.
- Groen, A.K., Wanders, R.J., et al., 1982. Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* 257 (6), 2754–2757.
- Hales, C.N., Barker, D.J., 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35 (7), 595–601.
- Hansen, H.H., Mikkelsen, J.D., 1998. Long-term effects on serotonin transporter mRNA expression of chronic neonatal exposure to a serotonin reuptake inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 352 (2–3), 307–315.
- Harmon, J.L., Wills, L.P., et al., 2016. 5-HT2 receptor regulation of mitochondrial genes: unexpected pharmacological effects of agonists and antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 357 (1), 1–9.
- Heisler, L.K., Jobst, E.E., et al., 2006. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron* 51 (2), 239–249.
- Hendricks, T.J., Fyodorov, Dmitry V., Wegman, Lauren J., Lelutiu, Nadia B., Pehek, Elizabeth A., Yamamoto, Bryan, Silver, Jerry, Weeber, Edwin J., Sweatt, J.David, Deneris, Evan S., 2003. Pet-1 ETS Gene Plays a Critical Role in 5-HT Neuron Development and Is Required for Normal Anxiety-like and Aggressive Behavior Timothy. *Neuron* 37 (2), 233–247.
- Hooijmans, C.R., Rovers, M.M., et al., 2014. SYRCL's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med. Res. Methodol.* 14, 43.
- Hoyer, D., Hannon, J.P., et al., 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71 (4), 533–554.
- Jourdan, D., Pic, I., et al., 2003. Effect of fenfluramine on caloric intake and macronutrient selection in Lou/c rats during aging. *Neurobiol. Aging* 24 (1), 67–76.
- Karpova, N.N., Lindholm, J., et al., 2009. Long-lasting behavioural and molecular alterations induced by early postnatal fluoxetine exposure are restored by chronic fluoxetine treatment in adult mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 19 (2), 97–108.
- Kiryanova, V., Meunier, S.J., et al., 2016. Effects of maternal stress and perinatal fluoxetine exposure on behavioral outcomes of adult male offspring. *Neuroscience* 320, 281–296.
- Kmiec, Z., 2011. Aging and peptide control of food intake. *Curr. Protein Pept. Sci.* 12 (4), 271–279.
- Ko, M.C., Lee, L.J., et al., 2014. Long-term consequences of neonatal fluoxetine exposure in adult rats. *Dev. Neurobiol.* 74 (10), 1038–1051.

- Krauss, S., Zhang, C.Y., et al., 2005. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (3), 248–261.
- Kummet, G.J., Haskell, S.E., et al., 2012. Neonatal SSRI exposure programs a hypermetabolic state in adult mice. *J. Nutr. Metab.* 2012, 431574.
- Lam, D.D., Przydzial, M.J., et al., 2008. Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. *Endocrinology* 149 (3), 1323–1328.
- Lauzurica, N., Garcia-Garcia, L., et al., 2013. Hypophagia and induction of serotonin transporter gene expression in raphe nuclei of male and female rats after short-term fluoxetine treatment. *J. Physiol. Biochem.* 69 (1), 69–74.
- Lee, L.J., 2009. Neonatal fluoxetine exposure affects the neuronal structure in the somatosensory cortex and somatosensory-related behaviors in adolescent rats. *Neurotox. Res.* 15 (3), 212–223.
- Lee, L.J., 2012. Neonatal fluoxetine exposure alters motor performances of adolescent rats. *Dev. Neurobiol.* 72 (8), 1122–1132.
- Levine, J.A., 2005. Measurement of energy expenditure. *Public Health Nutr.* 8 (7A), 1123–1132.
- Liberati, A., Altman, D.G., et al., 2009. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *J. Clin. Epidemiol.* 62 (10), e1–34.
- Limon-Morales, O., Soria-Fregozo, C., et al., 2014. Altered expression of 5-HT_{1A} receptors in adult rats induced by neonatal treatment with clomipramine. *Physiol. Behav.* 124, 37–44.
- Marston, O.J., Garfield, A.S., et al., 2011. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. *Eur. J. Pharmacol.* 660 (1), 70–79.
- McGlashon, J.M., Gorecki, M.C., et al., 2015. Central serotonergic neurons activate and recruit thermogenic brown and beige fat and regulate glucose and lipid homeostasis. *Cell Metab.* 21 (5), 692–705.
- Mendes-da-Silva, C., de Souza, S.L., et al., 2002. Neonatal treatment with fluoxetine reduces depressive behavior induced by forced swim in adult rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 60 (4), 928–931.
- Nagano, M., Liu, M., et al., 2012. Early intervention with fluoxetine reverses abnormalities in the serotonergic system and behavior of rats exposed prenatally to dexamethasone. *Neuropharmacology* 63 (2), 292–300.
- Oh, C.M., Namkung, J., et al., 2015. Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues. *Nat. Commun.* 6, 6794.
- Oliveira Ldos, S., da Silva, L.P., et al., 2011. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. *Behav. Process.* 86 (1), 119–124.
- Orozco-Solis, R., Lopes de Souza, S., et al., 2009. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol. Behav.* 96 (3), 481–492.
- Phillip, M., Maor, G., et al., 2001. Testosterone stimulates growth of tibial epiphyseal growth plate and insulin-like growth factor-1 receptor abundance in hypophysectomized and castrated rats. *Endocrine* 16 (1), 1–6.
- Pinilla, L., Gonzalez, L.C., et al., 2001. 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor agonists blunt α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA)-stimulated GH secretion in prepubertal male rats. *Eur. J. Endocrinol.* 144 (5), 535–541.
- Qu, Y., Aluisio, L., et al., 2009. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nor-fluoxetine in rats: increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 92 (3), 469–473.
- Ravelli, G.P., Stein, Z.A., et al., 1976. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N. Engl. J. Med.* 295 (7), 349–353.
- Rayen, I., van den Hove, D.L., et al., 2011. Fluoxetine during development reverses the effects of prenatal stress on depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis in adolescence. *PLoS One* 6 (9), e24003.
- Rayen, I., Steinbusch, H.W., et al., 2013. Developmental fluoxetine exposure and prenatal stress alter sexual differentiation of the brain and reproductive behavior in male rat offspring. *Psychoneuroendocrinology* 38 (9), 1618–1629.
- Rayen, I., Steinbusch, H.W., et al., 2014. Developmental fluoxetine exposure facilitates sexual behavior in female offspring. *Psychopharmacology (Berl.)* 231 (1), 123–133.
- Rice, D., Baron Jr., S., 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 108 (Suppl. 3), 511–533.
- Rodgers, R.J., Holch, P., et al., 2010. Behavioural satiety sequence (BSS): separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97 (1), 3–14.
- Rogers, P.J., Brunstrom, J.M., 2016. Appetite and energy balancing. *Physiol. Behav.* 164 (Pt B), 465–471.
- Rozenblit-Susan, S., Chapnik, N., et al., 2016. Metabolic effect of fluvoxamine in mouse peripheral tissues. *Mol. Cell Endocrinol.* 424, 12–22.
- dos Santos Perez, G., Santana dos Santos, L., et al., 2015. Maternal and post-weaning exposure to a high fat diet promotes visceral obesity and hepatic steatosis in adult rats. *Nutr. Hosp.* 32 (4), 1653–1658.
- Sanchez, S., Sanchez, C., et al., 2008. Circadian variations of serotonin in plasma and different brain regions of rats. *Mol. Cell Biochem* 317 (1–2), 105–111.
- Sarkar, A., Chachra, P., et al., 2014. Postnatal fluoxetine-evoked anxiety is prevented by concomitant 5-HT_{2A/C} receptor blockade and mimicked by postnatal 5-HT_{2A/C} receptor stimulation. *Biol. Psychiatry* 76 (11), 858–868.
- Sawyer, E.K., Howell, L.L., 2011. Pharmacokinetics of fluoxetine in rhesus macaques following multiple routes of administration. *Pharmacology* 88 (1–2), 44–49.
- da Silva, A.I., Braz, G.R., et al., 2015a. Fluoxetine induces lean phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1 expression. *J. Bioenerg. Biomembr.* 47 (4), 309–318.
- da Silva, A.I., Braz, G.R., et al., 2015b. Effect of fluoxetine treatment on mitochondrial bioenergetics in central and peripheral rat tissues. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 40 (6), 565–574.
- da Silva, A.I., Galindo, L.C., Monteiro, et al., 2014a. Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 92 (4), 330–337.
- da Silva, M.C., de Souza, J.A., et al., 2014b. Effects of maternal separation on the dietary preference and behavioral satiety sequence in rats. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 5 (3), 219–228.
- de Souza, J.A., da Silva, M.C., et al., 2018. Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males. *Appetite* 123, 114–119.
- Sghendo, L., Mifsud, J., 2012. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. *J. Pharm. Pharmacol.* 64 (3), 317–325.
- Sies, H., 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* 69 (21–23), 965–968.
- Silva, C.M., Goncalves, L., et al., 2010. Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. *Neurosci. Lett.* 483 (3), 179–183.
- Steffens, A.B., Scheurink, A.J., et al., 1988. Hypothalamic food intake regulating areas are involved in the homeostasis of blood glucose and plasma FFA levels. *Physiol. Behav.* 44 (4–5), 581–589.
- Takano, H., Aizawa, T., et al., 2008. Normal bone growth requires optimal estrogen levels: negative effects of both high and low dose estrogen on the number of growth plate chondrocytes. *Tohoku J. Exp. Med.* 214 (3), 269–280.
- Toscano, A.E., Amorim, M.A., et al., 2008. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? *Life Sci.* 82 (21–22), 1131–1136.
- Valverde, I., Penalva, A., et al., 2000. Influence of different serotonin receptor subtypes on growth hormone secretion. *Neuroendocrinology* 71 (2), 145–153.
- de Vries, R.B.M., Hooijmans, C.R., et al., 2015. A protocol format for the preparation, registration and publication of systematic reviews of animal intervention studies. *Evid.-Based Preclin. Med.* 2 (1), 1–9.
- Viera, A.J., Garrett, J.M., 2005. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam. Med.* 37 (5), 360–363.
- Watanabe, H., Rose, M.T., et al., 2011. Role of peripheral serotonin in glucose and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 22 (3), 186–191.
- West-Eberhard, M.J., 2005. Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (Suppl. 1), 6543–6549.
- Whitaker-Azmitia, P.M., Azmitia, E.C., 1986. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors. *Neurosci. Lett.* 67 (3), 307–312.
- Whitaker-Azmitia, P.M., Druse, M., et al., 1996. Serotonin as a developmental signal. *Behav. Brain Res.* 73 (1–2), 19–29.
- Xu, Y., Jones, J.E., et al., 2008. 5-HT_{2C}Rs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. *Neuron* 60 (4), 582–589.
- Zheng, J., Xu, D.F., et al., 2011. Neonatal exposure to fluoxetine and fluvoxamine alters spine density in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 4 (2), 162–168.

ANEXO A - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA-UFPE) – EXPERIMENTO 1.



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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

Recife, 14 de maio de 2015.

Ofício nº 44/15

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

Para: **Profª Ligia Galindo**

Departamento de anatomia - CCB

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.010005/2015-57

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, “**Desnutrição protéica e inibição da recaptção da serotonina neonatais: estudo das possíveis alterações fenotípicas no comportamento alimentar e no gasto energético em ratos adultos**”.

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

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

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

Origem dos animais: biotério; Animais: ratos heterogênicos; Linhagem: Wistar; Idade: 180 dias; Sexo: machos; Nº total de animais: 96.

Atenciosamente,

 **PEDRO V. LARETTI**
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584

CCB: Integrar para desenvolver

ANEXO B - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS (CEUA-UFPE) – EXPERIMENTO 2.



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

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

Recife, 27 de dezembro de 2016.

Ofício nº 119/16

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

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

Departamento de Nutrição

Centro de Ciências da Saúde

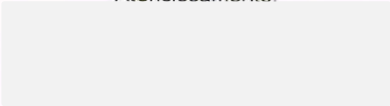
Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 0045/2016

Certificamos que a proposta intitulada **“Uso perinatal de dieta hiperlipídica/hipercalórica: repercussões precoces e tardias da inibição neonatal da recaptação de serotonina sobre o comportamento alimentar e o perfil metabólico em ratos”**, registrada com o nº **0045/2016**, sob a responsabilidade de Prof. Dr. **Raul Manhães de Castro** - 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 07/12/2016.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da autorização	16/01/2017 - 29/02/2020
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de animais	160
Peso/Idade	220 gramas / 120 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério do Depto de Nutrição da UFPE

Atenciosamente.


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