

1. INTRODUÇÃO

De acordo com estudos publicados pelo epidemiologista David Barker, a prevalência de algumas doenças na fase adulta apresenta uma considerável correlação com distúrbios homeostáticos ainda durante a fase fetal. Esse processo de adaptação morfofuncional é conhecido como programação fetal. A princípio, essa premissa foi aplicada às doenças cardiovasculares e síndromes metabólicas, estabelecendo a desnutrição fetal como fator de risco para o desenvolvimento de tais distúrbios.

Com o passar dos anos, a Teoria de Barker ganhou força e foi estendida para outros grupos de doenças, tais como as psicopatologias. Alguns fatores de risco têm sido identificados, dentre os quais destacam-se: a própria nutrição materna, estresse pré-natal, função endócrina materna, doenças infecciosas, uso de droga de abusos, toxinas e até mesmo disbiose intestinal. Através de mecanismos epigenéticos, esses fatores poderiam afetar a ontogenia de diferentes sistemas encefálicos envolvidos com a expressão de comportamentos afetivos.

Como a serotonina (5-HT) está envolvida ao mesmo tempo com funções neurotróficas importantes durante a embriogênese do sistema nervoso central e com a modulação das mais diversas funções neurais, inclusive a regulação do humor, esse neurotransmissor têm sido um dos alvos biológicos mais estudados na origem fetal das doenças neuropsiquiátricas, sobretudo nos transtornos de ansiedade e depressão maior. Entender os efeitos das alterações na neurotransmissão serotoninérgica durante o desenvolvimento fornece importantes pistas para compreensão da fisiopatologia desses transtornos mentais, possibilitando a descoberta de novas estratégias terapêuticas que visam melhorar o quadro clínico e, por conseguinte, o bem-estar dos pacientes.

Nesse contexto, modelos animais têm sido usados na tentativa de mimetizar algumas condições descritas em estudos epidemiológicos. Ao usar tais modelos, os pesquisadores conseguem verificar como fatores ambientais podem interferir na ontogenia encefálica e, sobretudo, identificar genes importantes para regulação e maturação dos circuitos neurais envolvidos com comportamentos semelhantes à ansiedade e depressão. Dessa forma, levando em consideração as bases epigenéticas possivelmente envolvidas em tais transtornos, acreditamos que futuramente técnicas terapêuticas cada vez mais refinadas serão capazes de alterar o padrão de expressão de tais genes a fim de prevenir, estabilizar ou curar totalmente distúrbios psiquiátricos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Serotonina

2.1.1 História

O prelúdio da descoberta da 5-HT é muito longo, durando de 1868 até meados dos anos 40 (KEPPEL-HESELINK, 1992). Nesse período pré-paradigmático, Ludwig e Schmidt relataram os efeitos do sangue desfibrinado na resistência vascular em preparações de músculo isolado de cão. No entanto, o mesmo efeito não era reproduzido quando o sangue era tratado com citrato de sódio (LUDWIG & SCHMIDT, 1868). Através de tais observações, em 1912, O'Connor sugeriu que tal substância não estaria preexistente no sangue, mas emergiria durante o processo de coagulação (O'CONNOR, 1912). No mesmo ano e em 1913, dois grupos independentes observaram fenômeno semelhante em preparações de artéria carótida de vaca após a coagulação sanguínea (JANEWAY, & PARK, 1912; STEWART & ZUCKER, 1913). Em 1932, Bayliss e Ogden descobriram que essas substâncias sanguíneas, chamadas de "vasotoninas", responsáveis pelo referido efeito vasoconstritor eram inativadas após a passagem do sangue pelos pulmões (BAYLISS & OGDEN, 1933).

Durante esse período da história da 5-HT, muitos trabalhos tiveram pouco impacto em termos de pesquisa ou foram simplesmente esquecidos nessa retrospectiva. Um importante exemplo são os achados de Heymanns e colaboradores, que demonstram os efeitos na ergotamina, um alcaloide produzido por um fungo que parasita o centeio, na vasoconstrição. Curiosamente, a ergotamina revertia a vasoconstrição induzida por sangue desfibrinado em segmentos arteriais (KEPPEL-HESELINK, 1992).

Em 1942, dois brilhantes cientistas, Maurice Rapport e Arda Green, entraram para o seleto grupo do famoso pesquisador Irvine Page, que estudava a fisiopatologia e estratégias terapêuticas para hipertensão (Figura1). Page acreditava que essa doença era causada por fatores vasoconstritores provenientes do sangue e tinha interesse especial nos estudos da renina e angiotensina (WHITAKER-AZMITIA, 1999). No entanto, toda vez que um fator sanguíneo era estudado, um novo surgia após a coagulação, atrapalhando de maneira significativa o progresso da pesquisa. Para esse propósito, com auxílio de seus novos colegas, foi elaborado um método para o isolamento da "vasotonina". Eles usaram duas toneladas de sangue de carne bovina e conseguiram concentrados estáveis e ativos de "vasotonina", que permitiram seu isolamento e caracterização (KEPPEL-HESELINK, 1992). A primeira descrição desse composto cristalino e puro foi publicada na revista científica Science em 1948. O grupo de Page, laureado por esse marco histórico, deu o nome de 5-HT ao novo composto isolado. Nesse artigo, foi atribuída à 5-HT uma função hemostática (RAPPORT et al., 1948).



Figura 1: Os pioneiros na descoberta da 5-HT. Da esquerda para direita, Maurice Rapport , Arda Green e Irvine Page. Adaptado de WHITAKER-AZMITIA, 1999.

Concomitantemente à descoberta do grupo de Page, o grupo do italiano Vittorio Erspamer teve uma contribuição muito relevante na descoberta da 5-HT (Figura 2). Esse grupo trabalhava especificamente com células enterocromafins. A partir de extrato de mucosa gástrica de coelhos, foi isolada uma substância semelhante às catecolaminas e que também era degradada pela monoaminoxidase (MAO). Essa substância foi denominada enteramina em 1938 (KEPPEL-HESELINK, 1992). Em 1952, após muitos estudos farmacológicos e químicos, foi caracterizado que a 5-HT e a enteramina eram a mesma substância (ERSPAMER & ASERO, 1952).



Figura 2: Vittorio Erspamer em seu laboratório em Roma. Adaptado de WHITAKER-AZMITIA, 1999.

O papel da 5-HT como um neurotransmissor ocorreu logo após essa descoberta. Betty Twarog descobriu a presença da 5-HT em gânglio nervoso de moluscos bivalves. Ainda em 1952, ela procurou o grupo de Page a fim de investigar a presença de 5-HT no sistema nervoso central de mamíferos (WHITAKER-AZMITIA, 1999). Através de um método de detecção mais eficiente do que o de Erspamer, Twarog e Page, verificaram a presença de grande concentração de amina biogênica em extratos de encéfalos de cães, coelhos e ratos (TWAROG & PAGE, 1953). Apesar disso, a função da 5-HT no sistema nervoso central ainda não era clara (KEPPEL-HESELINK, 1992). O primeiro passo nessa direção foi dado por Ernesta Mazarri e John Hart, que demonstraram que a 5-HT apresentava ações inibitórias na transmissão sináptica (MARRAZZI & HART, 1955).

A participação da 5-HT na fisiopatologia de doenças mentais foi proposta pela primeira vez por Dilworth Wooley e Elliott Shaw em 1954 (WOOLLEY & SHAW, 1954). Como a 5-HT era encontrada no encéfalo, os efeitos comportamentais de alguns de seus chamados "anti-metabólitos", tais como ácido lisérgico e harmalina, seriam resultado de um estado de deficiência induzida de 5-HT no sistema nervoso central (WOOLLEY & SHAW, 1954). Desse modo, foi conjecturado que doenças como a esquizofrenia poderiam ser decorrentes de uma deficiência de 5-HT (KEPPEL-HESELINK, 1992). O próprio Wooley também acreditava que 5-HT apresentava papel relevante na embriogênese do sistema nervoso central, devido a sua semelhança às auxinas, que são substâncias responsáveis pelo crescimento vegetal (WHITAKER-AZMITIA, 1999). No entanto, tais hipóteses foram rechaçadas por muitos anos. Essas hipóteses só foram restabelecidas de fato após a descoberta dos receptores e transportadores de 5-HT, bem como de drogas que atuam em tais alvos farmacológicos (SJOERDSMA & PALFREYMAN, 1990).

2.1.2 Embriogênese do Sistema Serotonérgico

Os neurônios serotonérgicos são originados no primeiro mês de gestação em primatas e a partir do décimo dia embrionário em camundongos (LEVITT & RAKIC, 1982). Um dia após a sua formação, os neurônios da rafe já são capazes de produzir 5-HT e começam a se ramificar profusamente. Um grupo de neurônios se projeta caudalmente em direção à medula espinhal, enquanto outro se projeta cranialmente ao prosencéfalo. O desenvolvimento completo dessa complexa rede sináptica é lenta e se completa somente após o nascimento em roedores (LIDOV & MOLLIVER, 1982).

À princípio, a região do tubo neural na qual os neurônios precursores desse sistema são originados já está bem definida. Esse processo envolve uma ação conjunta de uma série de fatores de transcrição, que atuam como marcadores posicionais e possibilitam a formação de um espaço tridimensional para especificação dos neurônios precursores (Figura 3). Em cocultura de células, foi observado que o Shh, Fgf4 e Fgf8 estão envolvidos nesse fenômeno e são produzidos respectivamente na notocorda, tubo neural e na junção entre o rombencéfalo e mesencéfalo (GORIDIS & ROHRER, 2002).

O papel da sinalização exercida pelo Shh foi provada recentemente em camundongos transgênicos em que os receptores desse fator de transcrição estão constitutivamente ativados. Nesses animais, os neurônios serotonérgicos são reposicionados no cerebelo. Esse trabalho claramente indica o papel do Shh no posicionamento dorsoventral dos neurônios serotonérgicos. Outros fatores de transcrição, como Nkx2.2 e Gata3, estão envolvidos na formação dos grupamentos caudais de neurônios serotonérgicos (BRISCOE et al., 2009; VAN DER WEES et al., 2009).

Uma vez que o posicionamento anatômico do sistema serotonérgico esteja estabelecido, outros fatores de transcrição são produzidos para que haja a determinação fenotípica dos neurônios precursores. Dentre esses fatores, dois se destacam: Lmx1 e Pet1a. Esse último fator poderia ativar a expressão de genes associados com o fenótipo serotonérgicos, tais como: Tph, Aadc, Vmat e Sert. Em camundongos knockout para Pet1a, muitos neurônios serotonérgicos da rafe não conseguem se diferenciar ou apresentam expressão reduzida de Tph e Sert (HENDRICKS et al., 1999; YU-QIANG et al., 2003).

Conforme os neurônios da rafe começam a se diferenciar, a 5-HT principia a ser liberada, promovendo de maneira autócrina efeitos tróficos. De fato, em culturas de neurônios da rafe mesencefálica, 5-HT aumenta sua própria síntese e o crescimento axonal (DE VITRY et al., 1986). Além disso, durante a embriogênese, o sistema serotonérgico é um dos primeiros sistemas de neurotransmissores que inerva estruturas cerebrais e demonstra atividade funcional. Nesta fase, a 5-HT atua como um fator de crescimento que influencia a plasticidade neuronal e glial, bem como na sinaptogênese (AZMITIA, 2001). Por outro lado, a 5-HT poderia inibir a diferenciação de outros precursores neurais em neurônios serotonérgicos. Essa premissa foi demonstrada em preparações de medula espinhal, onde a supressão de inputs serotonérgicos induziu a formação de novos interneurônios serotonérgicos (BRANCHEREAU et al., 2002).

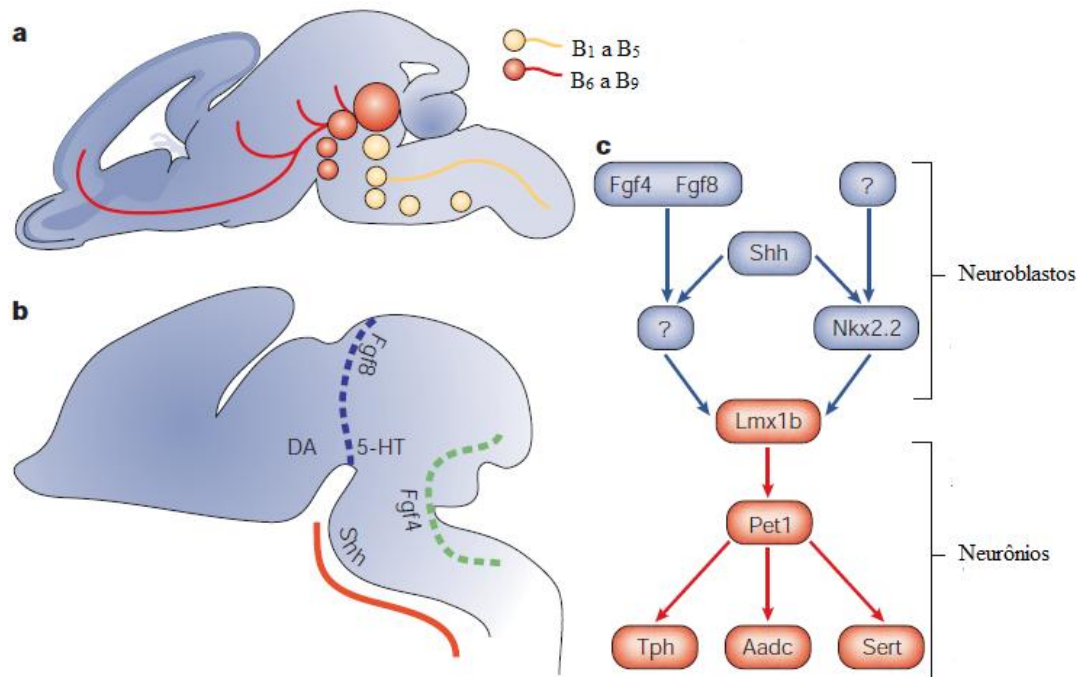


Figura 3: Embriogênese do sistema serotoninérgico. a) Organização dos neurônios serotoninérgicos no tronco encefálico. O grupo B₁ a B₅ (amarelo) se projeta caudalmente em direção à medula espinhal, enquanto o B₆ a B₉ (vermelho) se projeta cranialmente ao prosencéfalo. b) A especificação de neurônios precursoros de 5-HT no tubo neural é determinada pela ação conjunta de determinados fatores de transcrição. c) Cascata transcripcional para determinação do fenótipo serotoninérgico em neurônios. Adaptado de GASPAR et al., 2003.

2.1.3 Neuroanatomia do Sistema Serotoninérgico

Com o desenvolvimento de técnicas histológicas e baseado em características citoarquitetônicas, Dahlstrom e Fuxe descreveram nove agrupamentos de neurônios serotoninérgicos, as quais eles designaram de B₁ a B₉, presentes em sua maioria no na rafe mesencefálica (Quadro 1). Apesar dos corpos celulares de neurônios serotoninérgicos estarem restritos basicamente a essa região, seus axônios projetam-se para quase todas regiões do sistema nervoso central (DAHLSTRÖM & FUXE, 1963; TÖRK, 1990).

A maior densidade de neurônios serotoninérgicos está presente no grupo B₇, que é contínua a um outro menor, o B₆. Esses dois agrupamentos compõem o núcleo dorsal da rafe. Um outro grupo proeminente é o B₈ que compreende a região do núcleo medial da rafe. Já o grupo B₉, que engloba o tegmento ventrolateral da ponte e mesencéfalo, forma uma extensão lateral da rafe mediana e, portanto, não é considerado um dos núcleos do plano mediano da rafe (JACOBS & AZMITIA, 1992). Os neurônios serotoninérgicos dos núcleo da rafe diferem em suas características eletrofisiológicas e na sua inibição por ativação do autorreceptor somatodendrítico, assim como na morfologia e organização topográfica de suas projeções axonais para o prosencéfalo. Essas diferenças podem ser extremamente importantes na compreensão do papel desses dois sistemas serotoninérgicos na função cerebral de pacientes saudáveis e com doenças mentais (HORNUNG, 2003; BECK et al., 2004).

Quadro 1: Classificação dos agrupamentos serotoninérgicos de acordo com Dahlstrom e Fuxe.

Grupo	Estrutura anatômica
B ₁	Núcleo pálido da rafe Região caudoventrolateral do bulbo
B ₂	Núcleo obscuro da rafe
B ₃	Núcleo magno da rafe Região rostroventrolateral do bulbo Núcleo reticular paragigantocelular lateral
B ₄	Região dorsolateral do núcleo pálido da rafe
B ₅	Porção caudal do núcleo medial da rafe
B ₆	Porção caudal do núcleo dorsal da rafe
B ₇	Porção rostral do núcleo dorsal da rafe
B ₈	Porção rostral do núcleo medial da rafe Núcleo linear caudal da rafe
B ₉	Núcleo pontino oral Núcleo pontino oral Região supraleminiscal

As projeções serotoninérgicas ascendentes que se projetam ao córtex cerebral e outras regiões do prosencéfalo surgem principalmente dos quatro agrupamentos neuronais supracitados e são organizadas topograficamente. Os núcleos dorsal e medial da rafe dão origem à projeções distintas, mas sobrepostos parcialmente (HORNUNG, 2003). Enquanto fibras nervosas do núcleo medial da rafe se projetam sobretudo ao hipocampo dorsal, hipotálamo e área septal, as do núcleo dorsal da rafe se projetam para o hipocampo ventral, amígdala e corpo estriado (HORNUNG, 2003; HENSLER, 2006).

Os demais agrupamentos, B₁ a B₄, apresentam menor densidade de neurônios serotoninérgicos e estão localizados mais caudalmente, mais precisamente na ponte e no bulbo. Os corpos celulares desses neurônios dão origem a axônios que se projetam para demais áreas do tronco encefálico e medula. As principais vias descendentes que aferem à medula são: do núcleo magno da rafe (B₃) para lâmina I e II do corno dorsal; do núcleo obscuro da rafe (B₂, B₄) para lâmina IX do corno ventral e da região rostroventrolateral do bulbo e núcleo reticular paragigantocelular lateral (B₃) para a coluna intermédio-lateral. As projeções do núcleo pálido da rafe (B₁) e do núcleo obscuro da rafe (B₂, B₄) também se projetam aos núcleos motores somáticos, como o núcleo motor trigeminal e o núcleo facial (WATERHOUSE et al., 1986; JACOBS & AZMITIA, 1992).

As fibras que aferem aos núcleos da rafe incluem conexões entre núcleo medial da rafe e núcleo dorsal da rafe, B₉, B₁ e B₃. Os núcleos de rafe também recebem fibras nervosas de outras regiões do tronco encefálico, como a substância negra e área tegmental ventral, núcleo vestibular superior, *locus coeruleus*, núcleo do trato solitário. Outras fibras aferentes incluem neurônios oriundos do hipotálamo, córtex e estruturas límbicas (JACOBS & AZMITIA, 1992). Na figura 4, encontram-se os principais circuitos ascendentes dos núcleos da rafe.

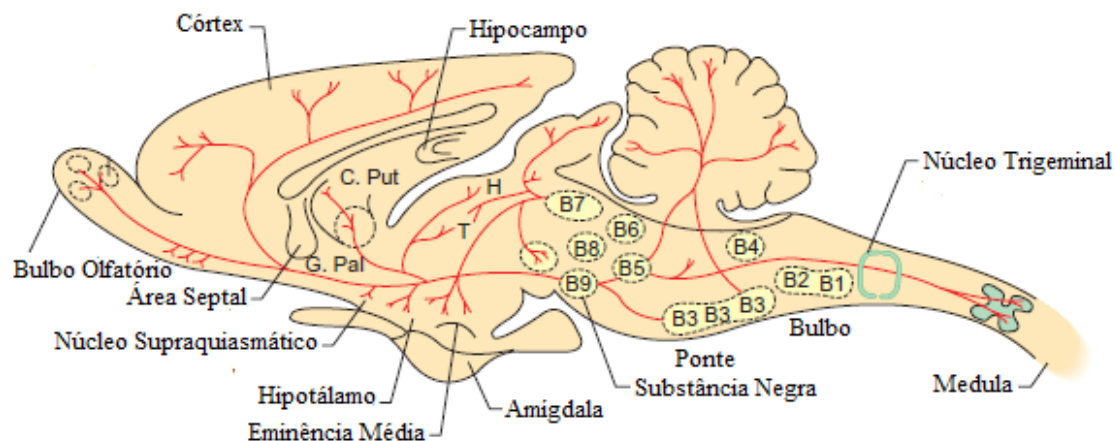


Figura 4: Desenho esquemático da organização anatômica do sistema serotoninérgico e seus principais circuitos em uma seção sagital do sistema nervoso central do rato. Adaptado de HENSLER, 2006.

2.1.4 Síntese da Serotonina

A 5-HT é produzida a partir do triptofano, obtido através de alimentos proteicos oriundos da dieta (YOUNG, 2007). Para que esse aminoácido atravessasse a barreira hematoencefálica, é necessário um mecanismo de transporte facilitado. Outros aminoácidos neutros, como fenilalanina, metionina e leucina competem com o triptofano pelo mesmo transportador (PARDRIDGE, 1977). A conversão de triptofano em 5-HT ocorre através de dois passos enzimáticos. A primeira reação é catalisada por uma enzima chamada triptofano hidroxilase (TPH), enquanto a segunda, pela aminoácido aromático descarboxilase (AADC) (ASEGAWA & NAKAMURA, 2010) (Figura 5).

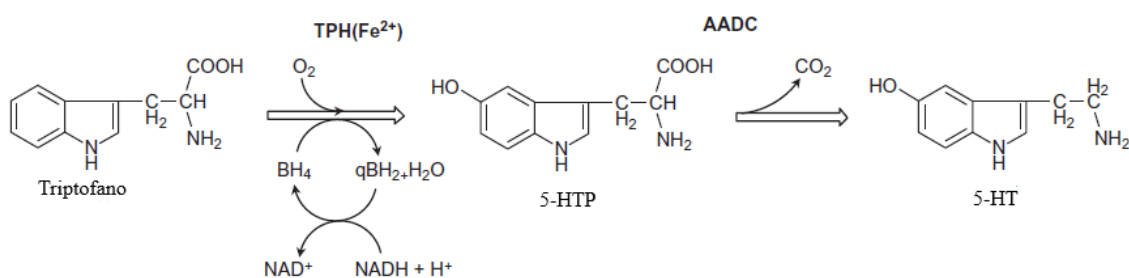


Figura 5: Biossíntese da 5-HT a partir do triptofano. A triptofano hidroxilase (TPH) requer oxigênio molecular (O_2) e tetrahydrobiopterina (BH_4) como co-substrato. A enzima tem requerimento absoluto de íon ferroso (Fe^{2+}). O produto dessa primeira reação, 5-hidroxi-L-triptofano (5-HTP), é convertido em serotonina (5-HT) pela ação da aminoácido aromático descarboxilase (AADC). Adaptado de ASEGAWA & NAKAMURA, 2010.

Existem duas isoformas de TPH: a TPH1 e a TPH2. Essas isoformas são expressas por genes independentes. Enquanto a segunda é mais comumente encontrada no SNC, a primeira está mais presente em órgãos e tecidos periféricos. Além disso, são diferenciadas pelas suas características cinéticas e pela composição proteica (McKINNEY, 2005).

A TPH apresenta o Fe^{+2} como cofator, bem como o O_2 e BH_4 como co-substratos. Tanto o Fe^{+2} quanto a BH_4 são importantes reguladores da atividade da TPH (CANSEV & WURTMAN, 2007). A concentração de BH_4 no SNC não está no nível de saturação para TPH e, portanto, essa enzima exerce apenas uma fração de sua $V_{\text{máx}}$. Microinjeções de BH_4 no cérebro aumentam a atividade da TPH (MIWA et al., 1985). Em níveis fisiológicos, a BH_4 também aumenta a inativação de TPH pelo óxido nítrico, outro mecanismo que poderia regular a síntese de 5-HT (KUHN & ARTHUR, 1997). Além disso, o requerimento essencial de Fe^{+2} , bem como a inibição da TPH pelo Fe^{+3} representa que o metabolismo do ferro é importante para a síntese de 5-HT. Essa inibição é dependente da oxidação do H_2O_2 em O_2 e de Fe^{+2} em Fe^{+3} (HASEGAWA & ICHIYAMA, 2005), com a subsequente formação de espécies reativas de oxigênio, o que indica que a atividade da TPH é regulada pelo status redox celular (MAXIMINO, 2012).

Além da modulação exercida pelos próprios cofatores e co-substratos, outro importante mecanismo de regulação é a fosforilação. A fosforilação pela PKA aumenta a $V_{\text{máx}}$ da TPH sem alterar seu K_m (KUHN et al., 1997). Resultados semelhantes foram obtidos através da fosforilação mediada pela proteína CaMKII (KUHN et al., 2007). A TPH também é ativada por hormônios do estresse. Nesse contexto, estressores psicológicos ou físicos, bem como a administração de corticosteroides, aumentam a atividade de TPH no cérebro. Este aumento na atividade é provavelmente causado por alterações na expressão gênica (AZMITIA & MCEWEN, 1974).

Em relação a outra proteína responsável na síntese de 5-HT, a AADC, é uma enzima solúvel dependente de piridoxal fosfato, que converte 5HTP em 5-HT (HENSLER, 2006). Utilizando a tomografia por emissão de pósitrons, foi demonstrado que a administração de piridoxina aumenta a taxa de síntese de 5-HT no cérebro de macaco. Esse fato presumivelmente reflete um efeito regulador da piridoxina na atividade da AADC e levanta a questão interessante da suplementação de piridoxina em situações associadas com deficiência de 5-HT (HARTVIG et al., 1995).

A AADC está presente não só nos neurônios serotonérgicos, mas também nos catecolaminérgicos, onde converte DOPA em dopamina (SUMI-ICHINOSE et al., 1992). No entanto, o pH, as concentrações de substrato e cofatores são diferentes para melhor atividade da enzima em homogeneizados de cérebro quando se utiliza 5HTP ou DOPA como substrato (RAHMAN et al., 1981). Uma vez que a concentração de 5HTP é muito menor do que o K_m da AADC, é possível aumentar os níveis de 5-HT no cérebro não só pelo aumento da ingestão de triptofano, mas também pelo consumo de 5HTP (HENSLER, 2006).

A hidroxilação inicial do triptofano, ao contrário da descarboxilação de 5-HTP, parece ser o passo limitante para síntese de 5-HT. Dessa forma, a inibição dessa reação resulta numa depleção marcada dos níveis de 5-HT no cérebro. Nesse contexto, o inibidor enzimático mais amplamente utilizado em ensaios biológicos é a p-CPA (SANDERS-BUSH et al., 1972; GREEN & GRAHAME-SMITH, 2013). A p-CPA inibe irreversivelmente a TPH, incorporando-se na enzima para produzir uma proteína inativa. Essa inativação resulta numa redução duradoura dos níveis de 5-HT. Para que haja a recuperação da atividade enzimática e o restabelecimento dos níveis de 5-HT, há a necessidade da síntese de uma nova enzima (AGHAJANIAN et al., 1973; GREEN & GRAHAME-SMITH, 2013).

2.1.5 Armazenamento, Liberação e Recaptação de Serotonina

Assim como outras aminas biogênicas, a 5-HT é armazenada em vesículas. As vesículas que armazenam esse neurotransmissor são diferentes daquelas presentes em neurônios catecolaminérgicos em dois principais pontos: as vesículas armazenadoras de 5-HT apresentam níveis muito baixos de ATP e contém uma proteína específica denominada SBP (TAMIR & GERSHON, 1990). Na presença de Fe^{+2} , essa proteína se liga à 5-HT com elevada afinidade e são liberadas juntas através de um processo dependente de cálcio (TAMIR et al., 1976). O armazenamento nessas vesículas é dependente de um mecanismo de transporte ativo, cujo gradiente eletroquímico é gerado a partir de uma H^+ ATPase (Figura 6A). Em síntese, uma amina citoplasmática é trocada por um próton vesicular (LAWAL & KRANTZ, 2013).

A liberação de 5-HT nas vesículas ocorre a partir de mecanismos de exocitose. Existem evidências consideráveis que comprovam esse fato. Primeiro, 5-HT encontra-se ionizada em pH fisiológico, o que a impede de atravessar membranas plasmáticas por difusão simples. Segundo, a maioria das 5-HT intraneuronal está contida em vesículas de armazenamento e outras proteínas também estocadas nelas, incluindo a SBP, são liberadas em conjunto com a 5-HT. Em terceiro lugar, a liberação de 5-HT induzida pela despolarização ocorre por um processo dependente de cálcio. Na verdade, parece que o influxo de cálcio extracelular com ou sem despolarização da membrana pode aumentar a liberação de 5-HT (HENSLER, 2006).

Não obstante, a liberação de 5-HT é regulada parcialmente pela taxa de disparo de neurônios dos núcleos da rafe. Numerosos estudos com uma variedade de técnicas revelaram que uma maior taxa de disparo de tais neurônios aumenta a liberação de 5-HT em terminais sinápticos. O efeito oposto é observado mediante à hiperpolarização (HARSING, 2006). O principal mecanismo relacionado com essa modulação é a ativação de autorreceptores somatodendríticos pela própria 5-HT ou por fármacos agonistas que retardam a taxa de disparo de neurônios serotoninérgicos, diminuindo a síntese e liberação desse neurotransmissor (MAEJIMA et al., 2013).

Fármacos como D-FEN e MDMA inibem diretamente o transporte vesicular da 5-HT, competindo pelo seu sítio de ligação. Estes agentes também dissipam o gradiente eletroquímico e, conseqüentemente, inibem a captação de 5-HT na vesícula (Figura 6). Tal efeito eleva os níveis citoplasmáticos da 5-HT e eleva sua extrusão celular pela reversão do fluxo do SERT. A consequência de tais ações farmacológicas é a estimulação da liberação de 5-HT por um processo não exocítico. Além disso, esse processo de liberação não é modulado por auto ou heterorreceptores (HENSLER, 2010).

Os efeitos sinápticos de muitos neurotransmissores, incluindo a 5-HT, são finalizados pela ligação destas moléculas à proteínas transportadoras específicas. No caso da 5-HT, a recaptação é mediada principalmente pelo SERT (RUDNICK, 2006). Essa proteína está localizada em neurônios serotoninérgicos ao longo do axônio e sua atividade regula a concentração de 5-HT no espaço extracelular, influenciando assim a transmissão sináptica (ZHOU et al., 1998). Trata-se, sobretudo, de um sistema de recaptação saturável e de alta afinidade, com um valor de K_m para 5-HT de aproximadamente 0,2-0,5 μM (DAWS, 2009).

Além disso, a recaptação promovida pelo SERT é um processo ativo, dependente de temperatura e que requer um gradiente químico de Na^+ e Cl^- (RUDNICK, 2006). É bloqueado por inibidores metabólicos, bem como por inibidores da atividade

de Na^+/K^+ ATPase (Figura 6B). Partindo de tais premissas, tem sido inferido que a síntese de ATP necessária para a captação de 5-HT não é diretamente utilizada para transportar esse neurotransmissor, mas para manter o transporte dependente do gradiente de Na^+ através da membrana plasmática (HENSLEER, 2006).

Os mecanismos de regulação do SERT podem ser transcricionais, transduccionais ou pós-transduccionais (glicosilação ou fosforilação). Em relação à modulação transcricional, a expressão gênica do SERT é influenciada por vias de sinalização intracelular dependentes de AMPc, pelas concentrações intracelulares de cálcio, pelo tratamento com inibidores da calmodulina, pela ativação PKC e pela via NO/GMPc/PKG. A ativação da PKC provoca infra-regulação do SERT. No entanto, a ocupação dessa transportador pelo seu substrato induz uma alteração conformacional, que impede a fosforilação, reduzindo assim a internalização da proteína (ZAHNISER & DOOLEN, 2001).

A ação da 5-HT nas sinapses é também interrompida pela sua recaptação por várias proteínas transportadoras presentes na glia e em outros neurônios. Por exemplo, embora o RNAm para o SERT não tenha sido detectado na glia, as culturas primárias de astrócitos são capazes absorver 5-HT. Essa absorção de 5-HT por essas células e por outros neurônios não serotoninérgicos ocorre através de outros transportadores recentemente descobertos, tais como: OCT, PMAT, além do NET e DAT. Todos estes transportadores são capazes de recaptar 5-HT, bem como os seus substratos originais oriundos do fluido extracelular no cérebro. Esses sistemas de recaptação alternativos desempenham um papel importante na regulação das concentrações extracelulares de 5-HT principalmente quando a função SERT está comprometida, seja bioquímica ou farmacologicamente (DAWS, 2009).

O transportador de 5-HT (SERT) é o alvo dos ISRS, tais como fluoxetina, sertralina e paroxetina (SANCHEZ et al., 2014). A administração aguda dessa classe de fármacos aumenta a liberação de 5-HT preferencialmente nos núcleos de rafe (MALAGIÉ et al., 1995). À princípio, esses fármacos foram criados para serem utilizados com antidepressivos, mas atualmente têm sido utilizados para tratamento de muitas outras doenças neuropsiquiátricas (transtornos alimentares, ansiedade e transtorno obsessivo-compulsivo) (MAYER & WALSH, 1997; VASWANI et al., 2003; ISSARI et al., 2016).

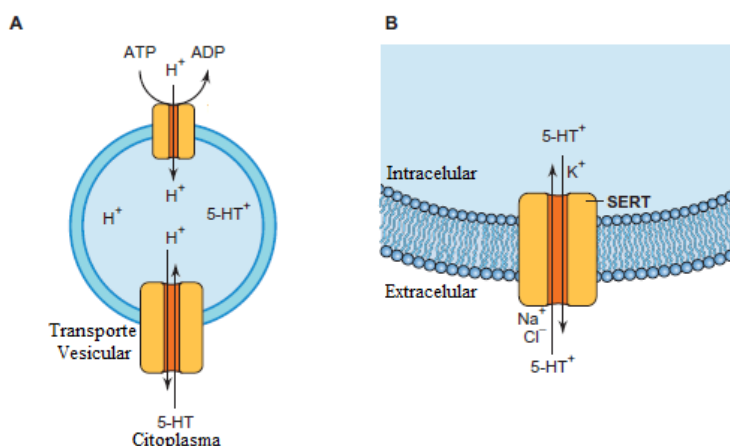


Figura 6: Desenho esquemático do funcionamento do VMAT (A) e SERT (B). Para mais informações, ler o texto. Adaptado de HENSLEER, 2006.

2.1.6 Metabolismo da Serotonina

Após a recaptação da 5-HT na fenda sináptica, esse neurotransmissor é metabolizada pela MAO, que está localizada na membrana externa das mitocôndrias. Essa enzima cataliza a desaminação oxidativa da 5-HT, convertendo-a em 5-HIAL. Esse composto, por sua vez, é ainda biotransformado em 5-HIAA pela aldeído redutase ou álcool desidrogenase. Este último metabólito está presente no cérebro em concentrações de apenas 1-5%. A 5-HT também pode ser metabolizada por vias alternativas através de um processo de sulfonação catalisada pela sulfotransferase ou por glucoronidação mediada por uma glucoronil-transferase. Além disso, a 5-HT é convertida em melatonina através de duas etapas enzimáticas caracterizada por uma inicial acetilação catalisada pela N-acetil-transferase e uma subsequente metilação desencadeada pela hidroxiindole-O-metiltransferase (Figura 7). Essa rota de metabolização ocorre principalmente na pineal, embora também ocorra em outros tecidos, como retina, trato gastrointestinal e tireoide (BORTOLATO et al., 2010).

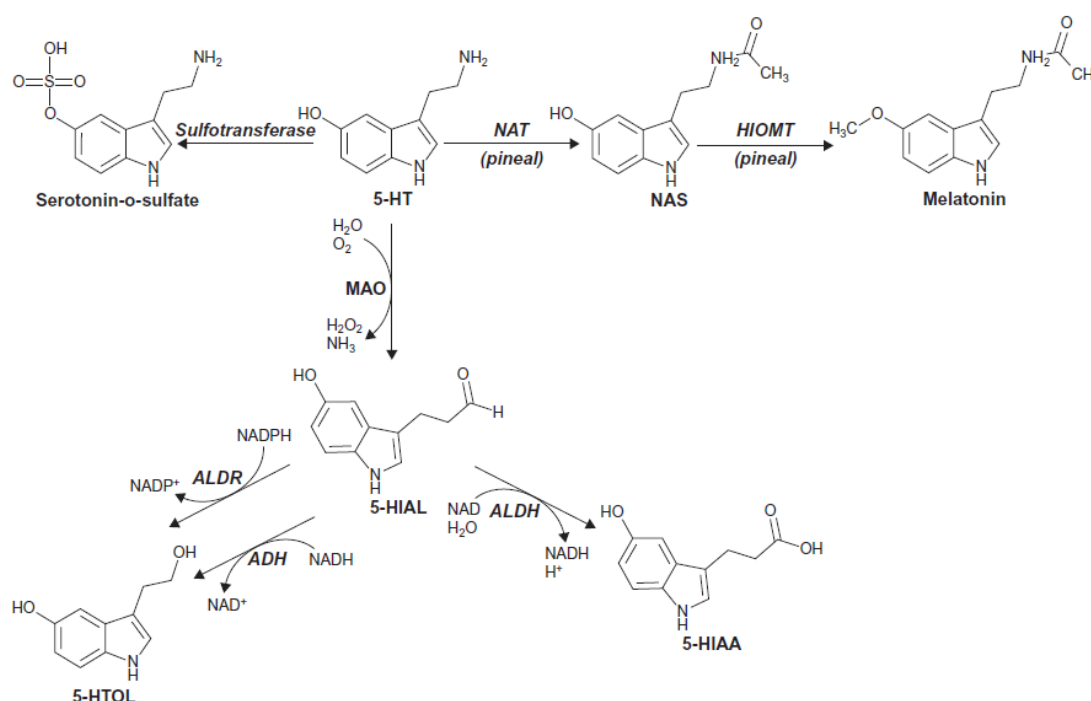


Figura 7: Biotransformação da 5-HT. ALDR, Aldeído redutase; ADH, álcool desidrogenase; ALDH, aldeído desidrogenase; NAT, N-acetil-transferase; NAS, N-acetilserotonina; HIOMT, hidroxiindole-O-metiltransferase. Para mais detalhes, ver o texto. (BORTOLATO et al., 2010).

A reação catalisada pela MAO necessita de FAD como cofator redox (MILLER, & EDMONDSON, 1999). A ligação covalente desse cofator aos resíduos de cisteína da MAO é essencial para atividade dessa enzima (WU et al., 1993). A primeira etapa da reação envolve a concomitante redução do FAD em FADH₂ e conversão do grupo amina da 5-HT em imina. Já a segunda etapa é caracterizada pela oxidação do FADH₂ e redução do oxigênio em H₂O₂, seguida da hidrólise do grupo imina (BORTOLATO et al., 2010).

A MAO está presente em duas isoformas em mamíferos, MAO A e MAO B. Embora as duas enzimas não tenham especificidade absolutas às monoaminas, a 5-HT é principalmente degradada pela MAO A, com uma afinidade 120 vezes maior que a MAO B. As duas isoenzimas estão presentes em elevados níveis no encéfalo, mas com distribuição e localização subcelular distintas (BORTOLATO & SHIH, 2011).

Em geral, MAO A é predominantemente encontrada em neurônios catecolaminérgicos, enquanto a MAO B é mais prevalente em neurônios serotoninérgicos, neurônios histaminérgicos e astrócitos. O significado funcional desse padrão de distribuição não está exatamente claro (NAGATSU, 2004). Mas, apesar da maior afinidade pela MAO A, a biotransformação da 5-HT pela MAO B resulta na manutenção de níveis elevados de 5-HT neurônios serotoninérgicos (HENSLEY, 2006).

Em relação à localização subcelular, MAO A está presente nas mitocôndrias dos terminais sinápticos, enquanto a MAO B, nas mitocôndrias dos corpos celulares. Essa compartimentalização apresenta uma lógica funcional por dois fatores: a síntese de 5-HT é muito maior nos corpos celulares do que nos axônios e a MAO A apresenta afinidade bem maior por esse substrato do que a MAO B. Desse modo, a metabolização lenta da 5-HT pela MAO B não interfere na dinâmica de recaptação vesicular baseada em gradiente eletroquímico (MAXIMINO, 2012).

2.1.7 Receptores Serotoninérgicos

Em vertebrados, a classificação dos receptores serotoninérgicos tem seguido uma evolução lenta nos últimos 50 anos. Essa classificação pode ser separada em dois períodos principais: um período farmacológico (desenvolvimento de ligantes específicos) e um período molecular (clonagem dos receptores). O período farmacológico definiu quatro classes (5-HT₁₋₄), enquanto o período de clonagem molecular, mais três (5-HT₅₋₇) (Figura 8). Algumas subclasses também foram definidas pela biologia molecular (BOCKAERT et al., 2010).

Até agora, em humanos, 14 receptores distintos para 5-HT foram clonados. Com exceção do receptor 5-HT₃ que é ionotrópico, todas as outras demais classes são metabotrópicas. As vias de sinalização canônicas para esses receptores envolvem acoplamento positivo ou negativo à adenilato ciclase e vias associadas aos fosfoinosítídeos de membrana. Vias não canônicas também têm sido descritas e incluem a ativação de NOS e fosfolipase A2 (TURNER, 2008).

Os receptores 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ são acoplados à proteína Gs e ativam a adenilato ciclase. Essa enzima, a partir do ATP, sintetiza AMPc, que ativa a PKA. Por sua vez, a PKA fosforila proteínas, as quais modulam a atividade de canais catiônicos, resultando em despolarização neuronal. Em contraste, os receptores da família 5-HT₁ são acoplados à proteína Gi, que inibe adenilato ciclase, resultando em hiperpolarização. Os 5-HT₂Rs são acoplados à proteína Gq, que ativa a fosfolipase C. Essa enzima cliva fosfolipídios de membrana e os convertem em IP₃ diacilglicerol. Enquanto esse ativa a PKC, aquele libera Ca⁺² dos estoques intracelulares, auxiliando também na despolarização do neurônio. Além disso, o aumento dos níveis intracelulares de Ca⁺² ativa o complexo CamK que, conjuntamente à PKA e PKC, modulam a expressão gênica através da fosforilação de fatores de transcrição. Os receptores 5-HT₅ acoplam-se negativamente à adenilato ciclase e positivamente aos canais de Ca⁺² IP₃-sensíveis. Já

os receptores 5-HT₃ são canais catiônicos não seletivos que, quando ativados, resultam em rápida despolarização (LAM & HESLER, 2007).

A taxa de disparo de neurônios serotoninérgicos é regulado pelos autorreceptores. Dentre os quais, destacam-se os receptores acoplados negativamente à adenilato ciclase. O subtipo 5-HT_{1A} é considerado principal autorreceptor somatodendrítico, enquanto que o subtipo 5-HT_{1B} é um autorreceptor pré-sináptico. Os receptores também atuam como heterorreceptores em neurônios não serotoninérgicos, onde inibem a liberação de outros neurotransmissores (MCDEVITT & NEUMAIER, 2011). Ademais, foi demonstrado que os receptores 5-HT₄ exercem uma retroalimentação positiva sobre os neurônios serotoninérgicos do NDR (LUCAS, & DEBONNEL, 2004).

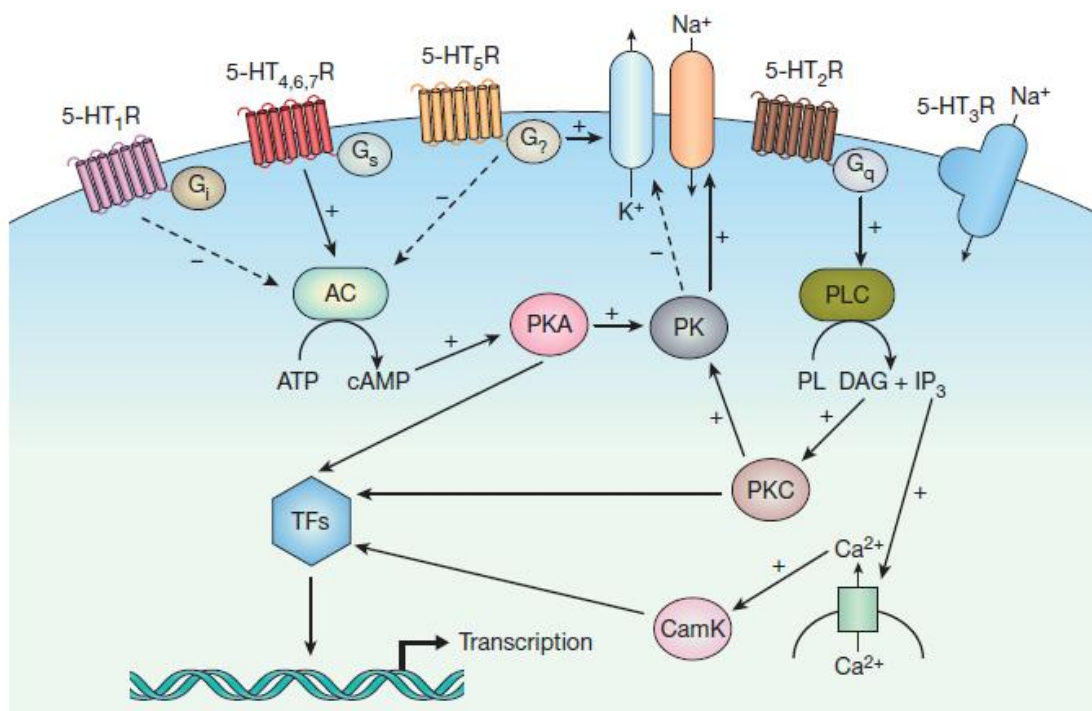


Figura 8: Receptores serotoninérgicos (5-HTRs) e suas correspondentes cascatas de sinalização intracelulares. Adenilato ciclase (AC) fosfolipase C (PLC), fosfolipídeos (PL), diacilglicerol (DAG), inositol trifosfato (IP₃), fatores de transcrição (TF). Mais detalhes, ver o texto. Linhas pontilhadas indicam efeitos inibitórios (LAM & HESLER, 2007).

As famílias de receptores 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ e 5-HT₄ têm sido amplamente estudadas. Portanto suas propriedades funcionais estão melhor compreendidas do que dos demais receptores serotoninérgicos (KAPCZINSKI et al., 2000). Os receptores da família 5-HT₁ estão localizados sobretudo no SNC e sua ativação está relacionada com inibição neuronal e com diversas repostas comportamentais, tais como: termorregulação, ansiedade, sono, alimentação e resposta sexual. A família 5-HT₂ está presente no fundo do estômago, plaquetas e vasos sanguíneos, coração e SNC. A ativação desses receptores causa contração da musculatura lisa do trato gastrointestinal, agregação plaquetária, vasoconstricção e alterações de comportamento alimentar e efeitos alucinógenos. Os receptores da família 5-HT₃ são encontrados no trato gastrointestinal e SNC. Estão relacionados com resposta nociceptiva e motilidade gastrointestinal. Antagonistas de receptores 5-HT₃, como a ondansetrona, são utilizados para tratamento

de náuseas, vômitos e diarreia. Quanto aos receptores 5-HT₄, são amplamente encontrados no trato gastrointestinal, coração e SNC. Estão relacionados com o reflexo de peristaltismo (PYTLIAK et al., 2011). Os receptores 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ foram clonados nessa década e sua fisiologia ainda não é bem compreendida. Todavia, acredita-se que estejam relacionados com comportamento exploratório, aprendizado e ritmo circadiano, respectivamente (RANG et al., 2015).

2.2. Ansiedade

A ansiedade é um comportamento caracterizado por um estado de tensão, apreensão e desconforto, que se origina a partir de uma ameaça interna ou externa iminente e estão associados a estímulos aversivos, imprevisíveis e incontrolláveis (LEITE & SIQUEIRA, 2006). É considerada uma emoção semelhante ao medo. Porém, enquanto este é fruto de ameaça definida, na ansiedade a fonte de perigo é incerta ou desconhecida (GRAEFF & GUIMARÃES, 1999).

A ansiedade é acompanhada por um conjunto característico de respostas comportamentais e fisiológicas, que incluem evasão, vigilância, excitação. Essas respostas relacionadas à ansiedade foram descritas em animais superiores e parecem fazer parte de um mecanismo universal pelo qual os organismos se adaptam às condições adversas (GROSS & HEN, 2004). Todavia, em níveis excessivos, a ansiedade pode comprometer a qualidade de vida de um indivíduo, podendo evoluir inclusive para quadros psicopatológicos com características relativamente bem definidas (LEITE & SIQUEIRA, 2006).

Segundo a 5ª edição Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais (DSM-V), os principais transtornos classificados como ansiedade patológica seriam: transtorno de ansiedade generalizada, fobia social, fobia específica, pânico, transtorno obsessivo compulsivo e transtorno de estresse pós-traumático. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 1/4 da população mundial já foi afetada ou será acometida por distúrbios de ansiedade (CRASKE et al., 2017). Dados publicados esse ano pela OMS indicam que o Brasil tem a maior taxa de prevalência de transtornos de ansiedade do mundo, afetando 18,5 milhões de pessoas (WHO, 2017).

O tratamento de transtornos de ansiedade envolve diferentes classes de fármacos, dentre os quais destacam-se: benzodiazepínicos, barbituratos, opioides e betabloqueadores. Destes, os benzodiazepínicos são os mais eficazes e, portanto, são amplamente utilizados para tratar a ansiedade fisiológica e patológica. Os benzodiazepínicos potencializam a neurotransmissão gabaérgica, modulando a função dos receptores GABAA (NEMEROFF, 2002). No entanto, nas últimas duas décadas, outra classe de fármacos, os ISRS, têm substituído os benzodiazepínicos no tratamento de eleição para a ansiedade, principalmente porque não possuem propriedades aditivas. Uma diferença importante entre os efeitos de ação dos benzodiazepínicos e dos ISRS é a sua cinética no cérebro. Os benzodiazepínicos atuam rapidamente, enquanto os ISRS atuam muito mais lentamente. Os efeitos terapêuticos dos ISRS só se tornam evidentes entre duas e quatro semanas após o início do tratamento (REINHOLD & RICKELS, 2015). Esse lento início terapêutico implica que o efeito ansiolítico dos ISRS depende da indução de mudanças graduais na estrutura ou função cerebral. Nos neurônios serotoninérgicos, a dessensibilização lenta dos auto-receptores contribui para um aumento

gradual da neurotransmissão 5-HT após tratamento com tais drogas (KAUFMAN et al., 2016).

Diversos fatores de risco podem predispor o desencadeamento de transtornos de ansiedade. Alguns desses fatores aumentam o risco de desenvolver qualquer transtorno de ansiedade, mas outros aumentam as chances de somente alguns tipos específicos de distúrbios (CRASKE et al., 2017). Os principais fatores de risco incluem: sexo e história familiar de ansiedade ou distúrbios depressivos (BEESDO-BAUM & KNAPPE, 2012). Por exemplo, mulheres têm o dobro de risco de desenvolverem transtornos de ansiedade (MCLEAN et al., 2011). Além disso, crianças cujos pais apresentam ansiedade ou depressão possuem mais riscos de desenvolverem transtorno de pânico e transtorno de ansiedade generalizada, o que reflete um componente hereditário (LIEB et al., 2002). No entanto, os mecanismos genéticos específicos e replicáveis ainda não foram bem elucidados (SHIMADA-SUGIMOTO et al., 2015).

Nesse contexto, vários estudos têm sido realizados a fim de descobrir a associação entre genética e ansiedade. Essa abordagem é importante para entender a fisiopatologia dos transtornos de ansiedade (HARIRI & HOLMES, 2015). A variante genética mais amplamente estudada é o polimorfismo do SLC6A4 (gene que codifica o SERT), que está associada com predisposição a transtornos de ansiedade (LESCH, Klaus-Peter et al, 1996; DUMAN & CANLI, 2015). Essas observações coincidem com ensaios pré-clínicos que demonstraram que a deleção desse gene em roedores aumenta a responsividade ao estresse e o comportamento semelhante à ansiedade (HOLMES et al., 2003). Todavia, esses resultados contrariam a eficácia terapêutica dos ISRS para o tratamento de transtornos de ansiedade tanto em animais quanto em pacientes adultos. Isso indica que a modulação da função serotoninérgica durante o desenvolvimento pode ter o efeito oposto durante a idade adulta no que tange à modulação dos comportamentos relacionados à ansiedade (GROOS & HEN, 2004).

Estudos em roedores e em humanos também têm sido usados para identificar regiões envolvidas na modulação de respostas evocadas pelo comportamento de ansiedade. Muitas das mesmas regiões que compõem os circuitos de medo também estão sobrepostos à ansiedade. Algumas dessas regiões incluem: o tálamo, amígdala e córtex cingulado. Especificamente, o tálamo integra as informações sensoriais oriundas de áreas corticais primárias e as envia para a amígdala. Essa última, por sua vez, junto com o córtex cingulado processam esses sinais aversivos e projetam fibras nervosas ao hipotálamo, núcleos da base e tronco encefálico para evocar respostas autonômicas e comportamentos defensivos. Regiões como a ínsula e o núcleo leito da estria terminal também estão envolvidos na ativação de respostas comportamentais referentes à ansiedade, como vigilância e apreensão. Já o hipocampo e córtex pré-frontal estão envolvidas com a modulação emocional da resposta de ansiedade (Figura 9) (DUVAL et al., 2015).

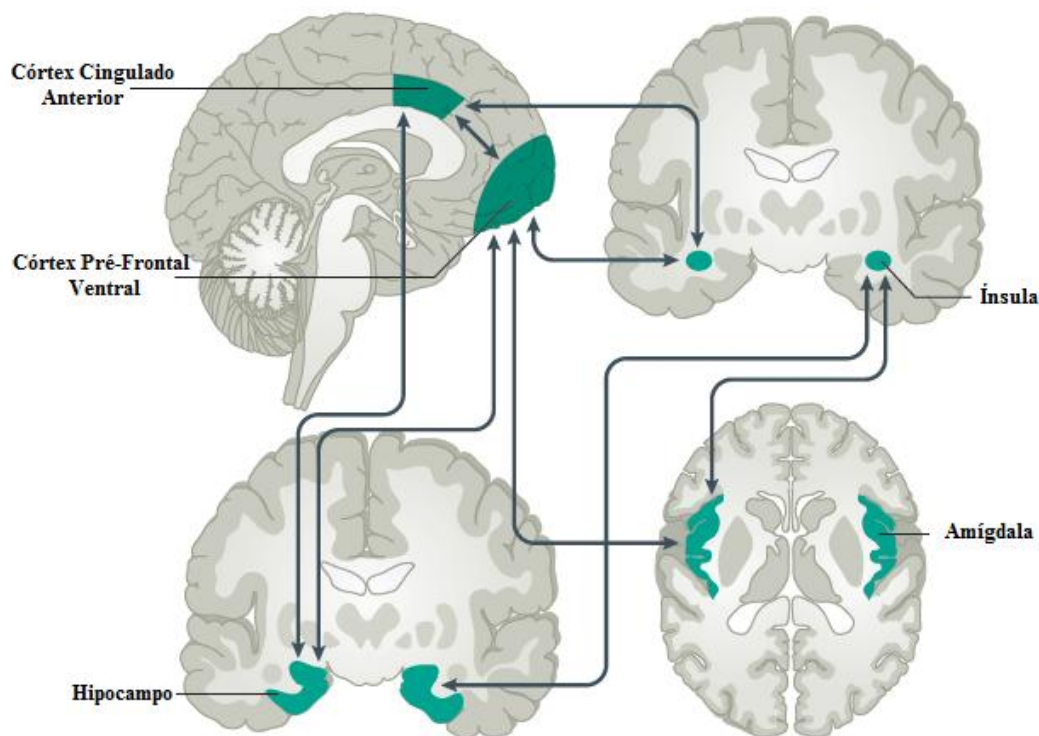


Figura 9: Principais regiões cerebrais envolvidas na regulação de emoções e detecção de ameaças. Nesse modelo, o medo e a ansiedade mediados pela amígdala são regulados através de conexões bidirecionais originadas do córtex pré-frontal ventromedial e do córtex cingulado anterior. A amígdala também integra informações mnemônicas do hipocampo e de consciência do córtex pré-frontal ventromedial. Regiões como a ínsula são inervadas reciprocamente pelo hipocampo e amígdala, sendo importante na ativação de respostas comportamentais referentes à ansiedade, como vigilância e apreensão. Modificado de CRASKE et al., 2016.

2.3. Depressão

Depressão é caracterizada por tristeza, bem como redução de interesse e prazer em diversas atividades. Ocorre naturalmente no ser humano e está associada às situações de perdas, derrotas, desapontamento, entre outros (DEL PORTO, 1999). No entanto, de acordo com a DSM-V, torna-se um distúrbio psicopatológico, quando esse estado emocional se exacerba e se prolonga por mais de duas semanas, sendo acompanhado por um dos seguintes sinais psicofisiológicos (distúrbios no sono e apetite, déficits cognitivos, auto-estima reduzida, pensamentos pessimistas, retardo psicomotor, ideações suicidas). Essa condição mórbida, capaz de comprometer o bem-estar do indivíduo, suas relações pessoais e o desempenho no trabalho, é conhecida como transtorno de depressão maior. (BELMAKER & AGAM, 2008).

Dados publicados esse ano pela OMS indicam que 322 milhões de pessoas pelo mundo sofrem de depressão, 18% a mais que há dez anos. O número representa 4,4% da população do planeta. No caso do Brasil, a OMS estima que 5,8% da população nacional é afetada pela depressão, o que coloca o país na quarta colocação com maior prevalência dessa psicopatologia. O ranking é liderado pela Ucrânia, com 6,3% da população com depressão. Estônia, Estados Unidos e Austrália estão na segunda posição, com 5,9%. (WHO, 2017).

O tratamento dessa psicopatologia é realizado através de psicoterapia, farmacoterapia ou a combinação de ambas estratégias dependendo da gravidade e progressão do caso. Em casos moderados à severos, a farmacoterapia é mais indicada. Esse tipo de tratamento tem como principal fundamento aumentar a biodisponibilidade de monoaminas na fenda sináptica (RUSH et al., 2006). No entanto, aproximadamente 30% dos pacientes não se recuperam, mesmo após várias tentativas de tratamento (THASE et al., 2007). Dentre os principais medicamentos utilizados atualmente, destacam-se: fármacos inibidores da recaptação de noradrenalina (reboxetina); inibidores da recaptação de 5-HT e noradrenalina (venlafaxina), antagonistas de receptores serotoninérgicos (mirtazapina, trazodona) e inibidores reversíveis da isoenzima MAO-A (moclobemida) (KAPCZINSKI et al., 2000).

Diversos fatores de risco podem predispor o desencadeamento de transtorno de depressão maior. Fatores ambientais (abuso sexual, físico ou emocional durante a infância; perda de entes queridos e problemas socioeconômicos) e a genética são importantes fatores de risco (OTTE et al., 2016). Nesse contexto, vários estudos têm sido realizados a fim de descobrir a associação entre genética e depressão. A importância do sistema serotoninérgico na depressão é destacada por estudos de farmacogenética. Cerca de 50% da população europeia e 21% dos asiáticos apresentam um polimorfismo na região promotora do gene do receptor 5-HT_{1A}, que tem sido associado a depressão maior (KATO et al., 2009). Polimorfismos na região promotora do gene SLC6A4 também constitui um fator de risco potencial, sobretudo na presença de adversidades ambientais (CASPI et al., 2003).

Apesar dos avanços na compreensão da neurobiologia da depressão maior, nenhum mecanismo estabelecido pode explicar todos os aspectos da doença. No entanto, vale ressaltar que essa psicopatologia cursa com redução da massa hipocampal, bem como em alterações na ativação e conectividade de circuitos neurais envolvidos com cognição e resiliência (ETKIN et al., 2015). Além disso, ocorrem alterações nos principais sistemas neurobiológicos que medeiam a resposta ao estresse, tais como: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o sistema nervoso autônomo e o sistema imunitário (Figura 10). As alterações sistêmicas nos níveis de cortisol e de mediadores pró-inflamatórios podem induzir sintomas depressivos, afetando a função cerebral, sobretudo em relação à neuroplasticidade (OTTE et al., 2016). Nesse sentido, níveis séricos mais baixos de BDNF foram encontrados em pacientes com depressão maior. Além disso, há uma redução nos níveis de RNAm para BDNF nos leucócitos de pacientes com depressão. Ainda, tais alterações são devidamente revertidas através de estratégias terapêuticas (MOLENDIJK et al., 2014).

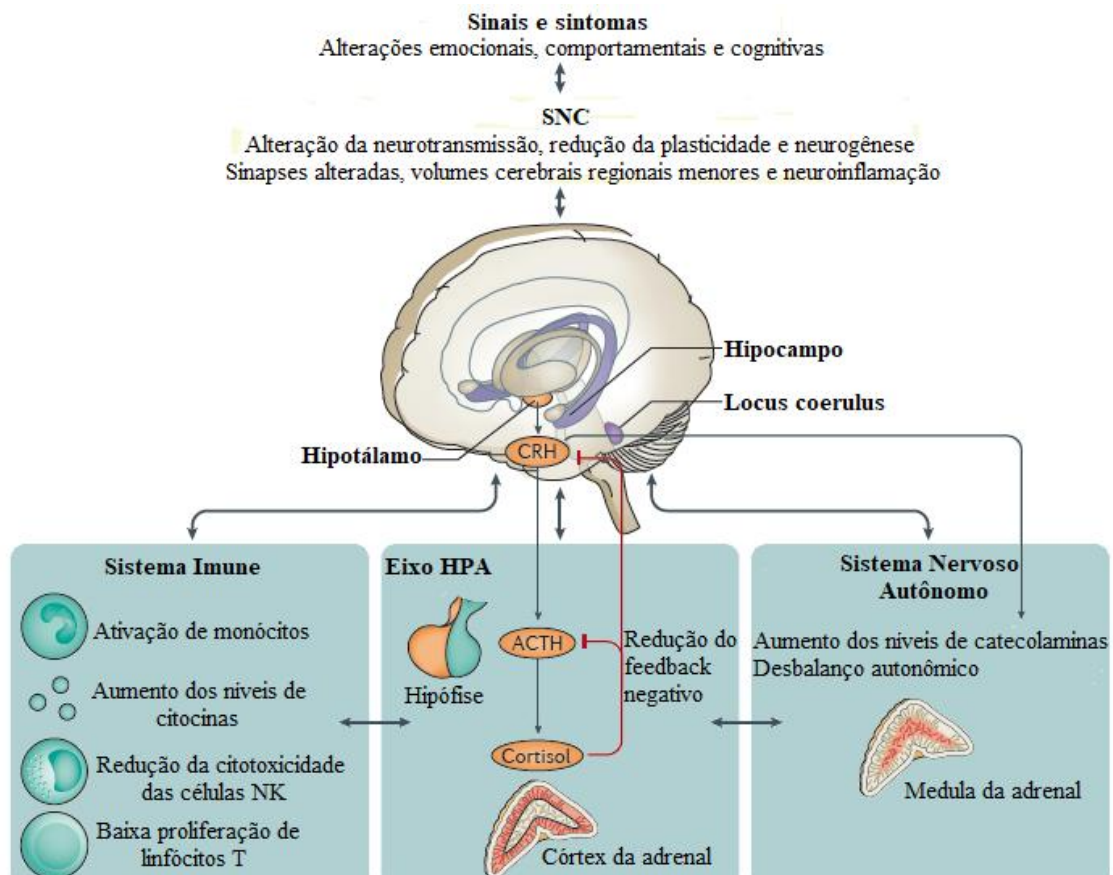


Figura 10: Sistemas biológicos envolvidos na fisiopatologia de transtornos depressivos. No sistema nervoso central, alterações na neurotransmissão e na neuroplasticidade são evidentes. Essas podem estar subjacentes às mudanças funcionais em circuitos cerebrais relevantes (cognição, afetividade e resiliência), bem como por redução dos volumes cerebrais regionais (hipocampo, por exemplo) e neuroinflamação. Também ocorrem alterações nos principais sistemas neurobiológicos que medeiam a resposta ao estresse, tais como: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (redução do feedback negativo), o sistema nervoso autônomo (desbalanço autonômico e aumento da produção de catecolaminas) e o sistema imunitário (aumento dos níveis de citocinas, redução da atividade de células NK, baixa proliferação de linfócitos T e ativação de monócitos) Modificado de OTTE et al., 2016.

2.4 Origem Fetal das Doenças

A teoria da origem fetal das doenças foi elaborada pelo epidemiologista inglês David Barker na década de 90. Também conhecida como Teoria de Barker, em homenagem a um dos seus principais proponentes. Esse princípio defende que fatores ambientais adversos, especialmente durante o desenvolvimento ainda no ambiente intrauterino podem resultar em alterações fisiológicas permanentes, aumentando potencialmente o riscos de doenças na idade adulta (Figura 11). Esse processo irreversível de adaptação morfofuncional é conhecido como programação fetal (SECO & MATIAS, 2009).



David Barker (1938-2013)

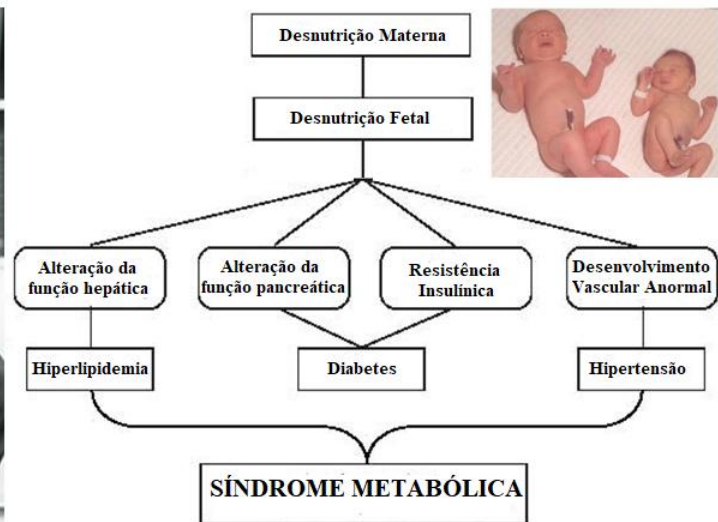
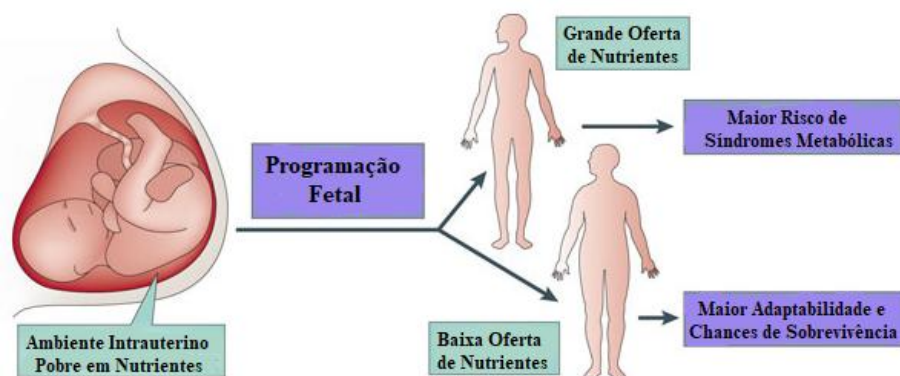


Figura 11: O epidemiologista inglês David Barker verificou que a desnutrição materna era capaz de causar alterações morfofuncionais no feto que poderia predispor o desenvolvimento de síndromes metabólicas na idade adulta, caracterizadas sobretudo por hiperlipidemia, diabetes e hipertensão.

A Teoria de Barker foi elaborada a partir das observações de que determinadas regiões da Inglaterra que apresentavam elevadas taxas de mortalidade infantil também tinham elevadas taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares. Como a causa mais comumente registrada de morte infantil era baixo peso ao nascer, essas observações convergiram à hipótese de que neonatos com baixo peso, mas que conseguiam sobreviver, poderiam ter mais riscos de desenvolver doença coronariana na idade adulta. Dois grandes estudos realizados na Inglaterra comprovaram essa hipótese. Em tais estudos, foi observado uma forte relação entre baixo peso neonatal, circunferência craniana, índice ponderal e mortes por doenças cardiovasculares (BARKER et al., 2007). Um pouco mais tarde, foi observado também um forte relação entre o baixo peso ao nascer e outras doenças que são fatores de risco conhecidos para doença cardíaca coronariana, tais como: hipertensão, diabetes mellitus tipo 2 e hiperlipidemia (OSMOND & BARKER, 2000).

Essas observações culminaram na elaboração da hipótese do fenótipo econômico (Figura 12). De acordo com essa hipótese, a plasticidade do fenótipo durante o desenvolvimento fetal promove uma oportunidade para que o organismo em desenvolvimento "se adapte" ao futuro ambiente adulto, o que proporcionaria uma vantagem de sobrevivência a longo prazo. No entanto, em situações em que o ambiente fetal não coincide com o ambiente adulto podem predispor ao desenvolvimento de síndromes metabólicas na fase adulta, incluindo a diabetes tipo II (WALKER & HO, 2012).



Hipótese do Fenótipo Econômico

Figura 12: A hipótese econômica do fenótipo. Para maiores informações, ler o texto acima. Adaptado de WALKER & HO, 2012.

Em relação às psicopatologias, existe uma relação entre crescimento fetal (razão entre peso ao nascer e idade gestacional) e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. O risco de desenvolver essa psicopatologia é significativamente maior em neonatos com peso inferior a 2,5 kg (BRESLAU & CHILCOAT, 2000; BANERJEE et al., 2007). Também existem associações entre baixo peso ao nascer e susceptibilidade a sintomas depressivos, psicose, esquizofrenia, adição, ansiedade. Entretanto, poucos estudos examinaram a relação entre morfologia encefálica e peso neonatal (O'DONNELL & MEANEY, 2016). É conhecido que essa variável está relacionada à área da superfície cortical, mas não à espessura, na idade adulta (RAZNAHAN et al., 2012). Também há correlação moderada entre o peso ao nascer e o volume do hipocampo em adultos, principalmente em mulheres (BUSS et al., 2007). Apesar da forte evidência de uma associação entre a variação no peso neonatal e psicopatologias, há uma escassez de estudos que abordam os potenciais mecanismos neurais (O'DONNELL & MEANEY, 2016).

Nesse contexto, estudos buscam elucidar os mecanismos envolvidos na origem fetal das doenças. Atualmente, sabe-se que esse processo é mediado por fatores epigenéticos, dentre os quais destacam-se: a metilação do DNA, a modificação das histonas e a ação de microRNAs não codificantes (OSBORNE-MAJNIK et al., 2013). No entanto, a maneira pela qual a exposição a fatores ambientais adversos pode causar efeitos deletérios a longo prazo são altamente complexos e dependem do tipo e da gravidade da exposição, de uma janela de vulnerabilidade específica em um sistema alvo, o sexo do indivíduo e se há mudanças epigenéticas nas células germinativas (BALE, 2015).

Dessa forma, modelos animais têm sido usados na tentativa de mimetizar algumas condições descritas em estudos epidemiológicos. Todavia, especialmente em relação ao SNC, o desenvolvimento em roedores começa durante a prenhez, mas continua principalmente após o nascimento (BURROWS et al., 2011). Ao usar tais modelos, os pesquisadores conseguem avaliar como a exposição materna a diferentes fatores ambientais (estresse, carências nutricionais, processos infecciosos, dentre outros), seja durante a gestação ou até mesmo no período perinatal, podem modificar o fenótipo da prole (BALE, 2015). Esses estudos melhoram a compreensão da

comunidade científica sobre os mecanismos envolvidos na programação fetal. Além disso, é possível estudar como alguns genes são relevantes para a fisiopatologia de diferentes doenças, inclusive àquelas que cursam distúrbios psiquiátricos (BURROWS et al., 2011).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral:

Evidenciar possíveis alterações psicobiológicas em prole de camundongas Swiss Webster submetidas às manipulações farmacológicas do sistema serotoninérgico durante o período neonatal.

3.2 Objetivos Específicos:

- 1) Avaliar a expressão de *SERT*, *TPH2*, *5-HT1a*, *BDNF*, *Lmx1b* e *Pet1a* em amostras de hipocampo e mesencéfalo;
- 2) Avaliar a atividade locomotora espontânea;
- 3) Avaliar a expressão de comportamento semelhante à ansiedade;
- 4) Avaliar a expressão de comportamento semelhante à depressão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss Webster, com 60 dias de vida e peso aproximado de 30g, fornecidos pelo biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ. Os animais foram separados em casais em caixas de 30 x 19 x 13 cm (l x c x a) e mantidos em salas com ambiente climatizado (temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade a 60%) e com ciclo de claro-escuro 12h-12h. Durante esse período, os animais receberam água e ração (Purina®) *ad libitum*.

4.2. Desenho experimental

Foram utilizados 6 grupos ($n = 4$ cada, e $\sim 35\text{g}$) de camundongas prenhas. A prole obtida foi tratada com salina 0,9% ou com fármacos que atuam no sistema serotoninérgico do 5° ao 15° ou do 5° ao 20° dia pós-natal (DPN) por via subcutânea (Figura 13 e 14). Essas janelas de tratamento correspondem ao período em que há aumento gradual expressão dos receptores 5-HT1a (GROOSS et al., 2009) e ao terceiro trimestre de gestação em humanos. As doses utilizadas nos tratamentos foram escolhidas em conformidade com estudos já publicados na literatura científica. Na tabela 1, estão destacadas as drogas utilizadas no experimento, o efeito farmacológico de cada uma delas e a referência adotada para escolha da dose.

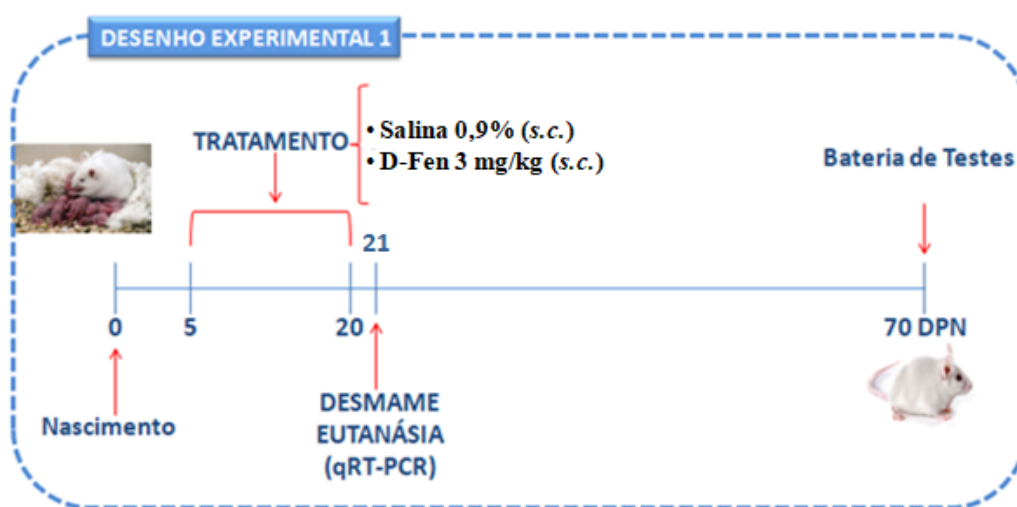


Figura 13: Desenho experimental da programação neonatal com d-fenfluramina. Os filhotes de camundongos foram tratados do 5° ao 20° DPN com salina 0,9% ou d-fenfluramina por via subcutânea. No 21° DPN, as fêmeas tratadas foram submetidas à eutanásia, sendo coletados hipocampo e mesencéfalo para avaliação da expressão gênica. Já os machos, foram desmamados e submetidos a uma bateria de testes comportamentais ao atingir a fase adulta.

No dia seguinte ao término do tratamento, parte dos filhotes foi submetida à eutanásia para coleta do hipocampo e mesencéfalo. Após a dissecação, tais tecidos foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Após o término da

eutanásia dos animais, os tecidos foram estocados a -80°C para posterior análise neurobiológica através da técnica de RT-qPCR.

O restante da prole, ao atingir 21 DPN, foi submetida ao desmame, sendo realocada em caixas polipropileno de 34 x 40 x 20 cm com no máximo dez animais. Ao atingirem a fase adulta, mais especificamente 70 DPN, esses animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais compostas pelos seguintes ensaios: teste do campo aberto, caixa claro-escuro, labirinto em cruz elevado, e suspensão pela cauda.

Com exceção dos filhotes de 16 DPN, todos os animais utilizados nos diferentes procedimentos metodológicos foram submetidos à eutanásia por sobrecarga anestésica (Tiopental 100mg/kg, *i.p.*). As carcaças foram armazenadas em congeladores horizontais e posteriormente recolhidas por firmas especializadas para posterior cremação.

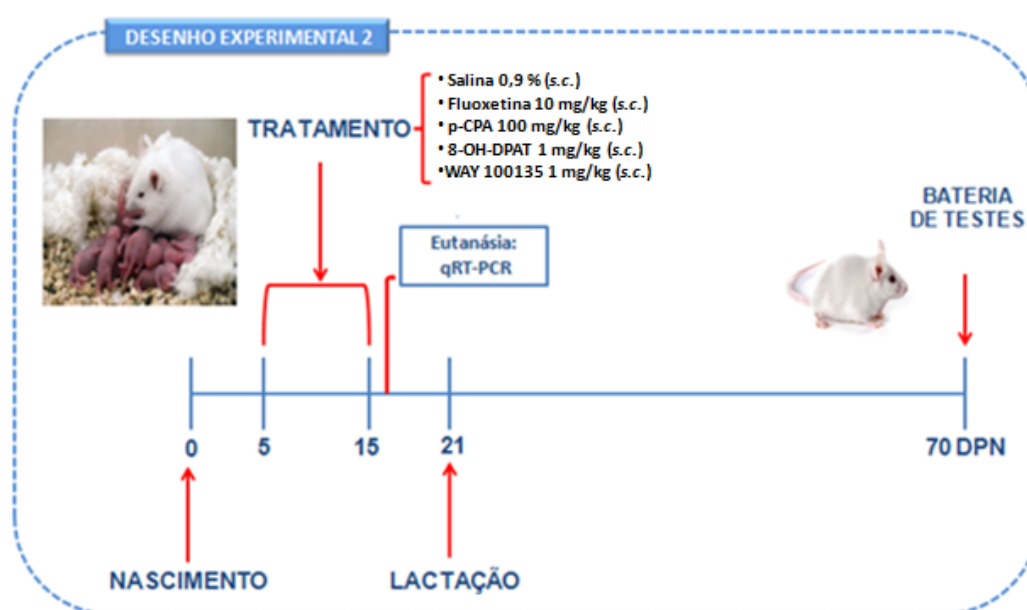


Figura 14: Desenho experimental da programação neonatal com fluoxetina, p-CPA, 8-OH-DPAT e WAY 100135. Os filhotes de camundongos foram tratados do 5º ao 15º DPN com salina 0,9% ou drogas que atuam no sistema serotoninérgico por via subcutânea. No 16º DPN, as fêmeas tratadas foram submetidas à eutanásia, sendo coletados hipocampo e mesencéfalo para avaliação da expressão gênica. Já os machos, foram desmamados e submetidos a uma bateria de testes comportamentais ao atingir a fase adulta.

Tabela 1. Fármacos, mecanismo de ação, doses e referências adotadas.

Fármaco	Mecanismo de ação	Dose	Referência
Fenfluramina	Extrusão de 5-HT das vesículas sinápticas	3 mg/kg	FERRO-CAVALCANTE et al., 2016
Fluoxetina	Inibidor Seletivo da SERT	10 mg/kg	GALINDO et al., 2015.
p-CPA	Inibidor irreversível da TPH2	100mg/kg	OGAWA et al., 1999.
8-OH-DPAT	Agonista 5HT1a	1 mg/kg	EGASHIRA et al., 2006
WAY 100135	Antagonista 5HT1a	1 mg/kg	VINKERS et al., 2010.

4.3. Aspectos éticos

Todos os procedimentos utilizados nesse estudo estão de acordo com as normas e princípios éticos preconizados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo 23083.012282/2017), que segue o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publicação Nº 85-23, revisado 1996) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (DBCA), do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, órgão do Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). Vale ressaltar que todos os esforços foram feitos para reduzir o número de animais utilizados, bem como oferecê-los as melhores condições sanitárias e de bem-estar.

4.4. Procedimentos experimentais.

4.4.1. qRT-PCR.

Foi utilizada a técnica semi-quantitativa de RT-PCR para determinar os níveis de RNAm para as seguintes proteínas provenientes de amostras de hipocampo e mesencéfalo: TPH2, 5HT1a, SERT, BDNF, Pet1a e Lmx1b.

A extração de RNA das amostras de hipocampo foi realizada através de um método padrão que utiliza 1ml de TRIZOL® (TRIzol Reagent; Life technologies, Invitrogen) para 50mg de tecido. O RNA total extraído foi armazenado em freezer a -20° C e, posteriormente, submetido à análise quantitativa através da análise da concentração (em µg/µl) e da pureza estabelecidas pela utilização de um nanofotômetro. Não obstante, depois da quantificação do RNA total extraído, uma alíquota de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2% em TAE 1X (0,04 M Trisacetato + 1 mM EDTA) para a verificação da integridade das amostras

Para a síntese de fitas simples de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total através do mecanismo de transcrição reversa, foi utilizado um kit da *Promega*, por meio do protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, foi realizada a amplificação do fragmento correspondente ao RNAm do gene desejado, utilizando-se um aparelho de PCR *Mastercycler ep Realplex* (Eppendorf, Germany), que possui um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação. Nesse aparelho, as amostras foram desnaturadas pela incubação a 50°C durante 2 min e a 95°C por 10 minutos. Logo após, as reações foram 40 vezes repetidas ciclicamente, usando as seguintes etapas para todos os genes estudados: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos (Machado et al, 2009). A fluorescência da reação de amplificação entre os primers e *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X* (Fermentas, USA) foi detectada no fim de cada ciclo para monitorar a quantidade de produto de PCR formado. Para tanto, foi feita a padronização por meio da análise de diluições seriadas de cDNA para os diferentes genes estudados a fim de calcular a eficiência de cada ensaio.

Os níveis relativos de RNAm foram determinados pela comparação de uma linha limiar que foi traçada na curva exponencial, formada a partir da amplificação de DNA. Essa curva foi usada para calcular o CT (do inglês *cycle threshold*) de cada amostra, ou seja, o ciclo do PCR no qual a fluorescência cruza a linha de base. O valor do CT é

inversamente proporcional à quantidade de amostra na reação, assim quanto maior a concentração do DNA de estudo, menor é o valor de CT.

Após a normalização das amostras, o grupo controle teve seu valor convertido para 1 e os outro grupo teve seus valores convertidos em relação a ele conforme o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Ademais, é importante ressaltar que cada amostra foi analisada em duplicata.

Os primers de interesse utilizados para a amplificação do cDNA foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies Inc. Como controle interno dos experimentos foi utilizado o gene β -actina, um gene constitutivo. Na tabela 2, são destacados a sequência de oligonucleotídeos presentes nos primers utilizados para avaliação quantitativa dos diferentes genes estudados.

Tabela 2: Lista dos primers utilizados para avaliação quantitativa dos genes estudados.

Gene	Proteína	Senso	Anti-Senso
NM_173391.3	TPH2	5'-AGTCTACATCCATCCCAACTGCTG-3'	5'-CATTCTCTCGCACAATTCCAGTCG-3'
NM_008308.4	5HT1a	5'- GTGAGAGGAAGACAGTGAAGAC -3'	5'-CCGTGAGAGGAAGACAGTGAAGAC-3'
NM_010484.2	SERT	5'- CTC ACC AGC AGG ACA GAA AG -3'	5'-CTCATCTTCACCATTATCTACTTCAG-3'
NM_001048139.1	BDNF	5'-AGCAGAGTCCATTCAGCAC-3'	5'-TGGCTTGACAGCGAGGAAAA-3'
NM_010725.2	Lmx1b	5'- CTGCCAGTGCTCTCGGACCTT -3'	5'- TCCTGATGCGAGTCAACGAGTC -3'
NM_153111.2	Pet1a	5'- CCAGGAGAACTGCCACAAC -3'	5'- AACATGTACCTGCCAGATCC -3'
NM_007393.5	β -actina	5'-CTGTCCCTGTATGCCTCTG -3'	5'-ATGTCACGCACGATTTC-3'

4.4.2. Avaliação psicobiológica.

Ao atingirem 70 DPN, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais composta dos seguintes protocolos: campo aberto, caixa claro-escuro, labirinto em cruz elevado, suspensão pela cauda. Em todos os testes, o número de animais utilizados foi de dez a doze indivíduos em cada grupo experimental.

Todos os testes foram realizados entre 7:00 e 10:00 horas. Durante cada teste, os experimentadores ficaram do lado de fora da sala de comportamento. No entanto, no intervalo entre os testes, os mesmos entravam na sala, retiravam os animais e higienizavam devidamente os aparatos com álcool 10%. Ademais, é importante salientar que todos os testes foram gravados e os parâmetros comportamentais foram analisados posteriormente por dois ou mais experientes pesquisadores.

4.4.2.1 Teste do campo aberto.

Este teste é um simples protocolo, cuja avaliação dos seus componentes têm sido amplamente utilizada para determinação de emocionalidade (ROTH & KATZ, 1980) e da atividade locomotora espontânea e exploratória em roedores (WALSH & CUMMINS, 1976). Além disso, este teste também é considerado um excelente modelo sensível a drogas com propriedades ansiolíticas (PRUT & BELZUNG, 2003).

Imediatamente antes do ensaio, cada animal foi inserido individualmente no centro de uma caixa circular, de acrílico (30 cm de diâmetro) dividida em 12 quadrantes distribuídos em duas diferentes zonas (central e periférica), onde os mesmos foram

permitidos a explorar o ambiente por 5 minutos (Figura 15). Nesse protocolo, foi avaliada número de quadrantes totais, número de quadrantes centrais, o número de rearings (levantamento das patas dianteiras pressionadas contra a parede da arena), tempo de grooming (autolimpeza), o tempo de permanência na zona central e razão central (relação entre número de quadrantes centrais e totais). No final do ensaio, o número de bolos fecais também foi avaliado. Nesse teste, a atividade locomotora/exploratória é indicada pela distância total percorrida e pelo número de rearings, enquanto o número de bolos fecais é utilizado para avaliar o grau de emocionalidade. Por fim, as respostas semelhantes à ansiedade estão ligadas ao tempo de permanência no centro e pela razão central (MCILWAIN et al., 2001).



Figura 15: Aparato para realização do teste do campo aberto.

4.4.2.2 Teste da caixa claro-escuro.

Esse teste é baseado na aversão inata dos roedores por locais fortemente iluminados e por ambientes novos (CRAWLEY & GOODWIN, 1980). Nesse protocolo, os animais foram alocados individualmente em uma caixa de acrílico (45cm x 27cm x 27cm) dividida de forma desigual em dois ambientes divididos por uma divisória dotada de uma pequena abertura, que permite a transição dos indivíduos no aparato. Dois terços do ambiente é fortemente iluminado (400 luxes), enquanto a outra porção é escura (10 luxes). Desse modo, os animais foram colocados no lado escuro, onde foram permitidos explorar o aparato por 5 minutos (Figura 16). Durante esse período, foram analisados o número de transições e o tempo de permanência no ambiente claro, bem como a latência de entrada no ambiente mais iluminado. Todos esses parâmetros são relacionados com o comportamento semelhante à ansiedade. Além disso, o comportamento de tomada de decisão foi avaliado pelo número de tentativas de transitar de um ambiente para o outro (SAP).



Figura 16: Aparato para realização do teste da caixa claro-escuro.

4.4.2.3 Teste do labirinto em cruz elevado.

O labirinto em cruz elevado reflete um conflito entre a preferência dos roedores por áreas protegidas e sua motivação natural de explorar novos ambientes (PELLOW et al, 1985). Dessa forma, este teste presta-se à avaliação de aspectos relacionados à ansiedade e medo (ARCHER, 1973). Além disso, durante este teste é possível avaliar aspectos que envolvem a tomada de decisão dos animais, que está diretamente relacionado à análise de risco e, consequentemente, com o status de ansiedade (MIKICS et al, 2005).

O aparato utilizado no teste do labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos (50 x 10 cm) cruzados por dois braços opostos fechados com as mesmas dimensões, situados a 40 cm de altura em uma sala com luz vermelha. Os braços são conectados por uma plataforma central (10 x 10 cm), cuja estrutura é semelhante a uma cruz grega. Desse modo, os camundongos foram inseridos individualmente na plataforma central da cruz com a cabeça voltada para um dos braços fechados, sendo permitida a exploração do aparato por 5 minutos (Figura 17).

Durante este período, foram registrados parâmetros relacionados ao comportamento semelhante à ansiedade tais como: o tempo cumulativo e a frequência de entradas nos braços abertos e fechados. No entanto, é importante frisar que somente foi contabilizado como entrada aquela tentativa em que os animais posicionavam todas as patas em um dos quatro braços. Após a avaliação dos parâmetros anteriores, a percentagem de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência na plataforma central foram calculados. Além disso, o comportamento de tomada de decisão foi avaliado pelo número de extensões das patas posteriores (SAP).

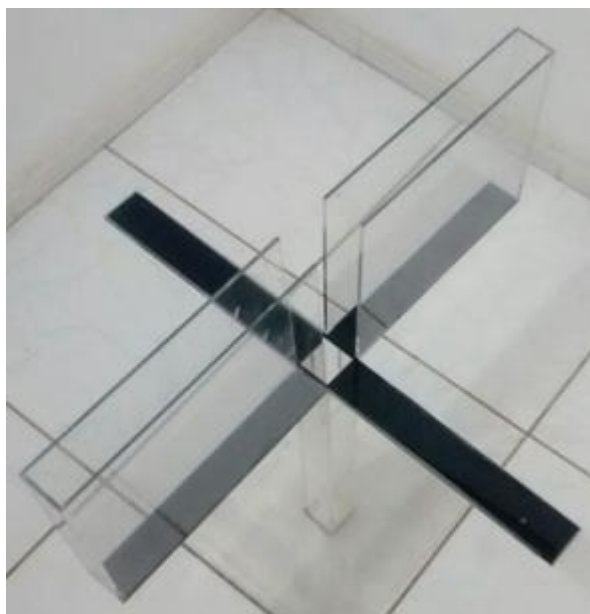


Figura 17: Aparato para realização do teste do labirinto em cruz elevado.

4.4.2.4 Teste da Suspensão pela Cauda

Este teste baseia-se na observação de que os roedores após a execução inicial de movimentos orientados de escape desenvolvem uma postura imóvel quando colocado numa situação estressante inevitável (PORSOLT et al., 1977). Nesse teste, a condição envolve o estresse hemodinâmico inescapável causado pelo fato dos animais estarem pendurados pela cauda. Para realização desse protocolo, os camundongos eram fixados em uma haste à 100 cm do chão com auxílio de uma fita adesiva (Figura 18). Durante o intervalo de 5 minutos, foram contabilizados os seguintes parâmetros: o tempo de imobilidade e a latência para o primeiro episódio de imobilidade. Sabe-se que a imobilidade pressupõe uma baixa capacidade de resiliência e, por conseguinte, um elevado status de comportamento semelhante à depressão (PORSOLT et al., 1977).



Figura 18: Aparato para realização do teste da suspensão pela cauda.

4.5. Análise estatística.

Todos os resultados obtidos foram apresentados em valores de média $\pm$ erro padrão. A suposição da distribuição normal dos dados foi avaliada com o teste Shapiro-Wilk. Dessa forma, se os dados passassem no teste de normalidade, comparações paramétricas seriam realizadas. Nesse caso, para grupos submetidos à interferência de apenas um fator de variação, os dados foram analisados por T Student. Não obstante, foi usado o teste de Grubbs para detecção de valores aberrantes (Figura 19). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de $p < 0,05$. Vale destacar que o software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

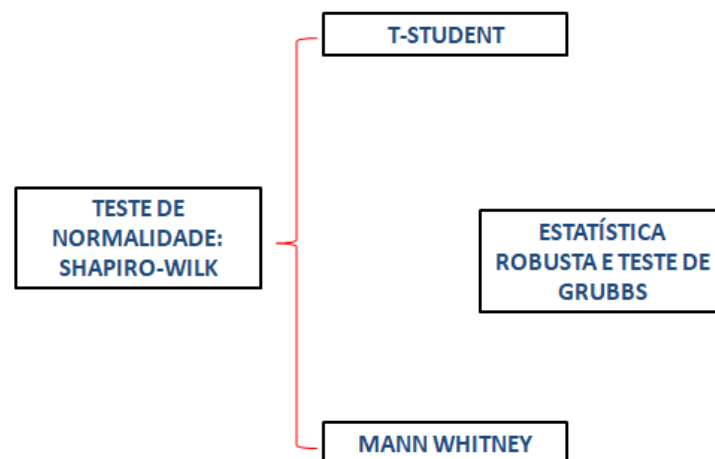


Figura 19: Representação esquemática dos procedimentos estatísticos adotados.

5. RESULTADOS

5.1 D-fenfluramina

5.1.1. Expressão Gênica Mesencefálica e Hipocampal

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, foi verificado que o tratamento neonatal com d-fenfluramina (D-Fen) 3 mg/kg causa redução significativa da expressão mesencefálica dos genes que codificam a SERT ($0,33 \pm 0,15$ vs. $2,58 \pm 0,81$, $p = 0,01$), 5HT1a ($0,11 \pm 0,05$ vs. $1,11 \pm 0,24$, $p = 0,001$), BDNF ($0,30 \pm 0,08$ vs. $1,05 \pm 0,16$, $p = 0,001$) e Pet1a ($0,14 \pm 0,05$ vs. $1,39 \pm 0,41$, $p = 0,009$). Também foi observada uma tendência à infra-regulação da TPH2 ($p = 0,09$). Curiosamente, não houve expressão de Lmx1b em nenhum dos grupos experimentais com 21 DPN (Figura 20).

Já no hipocampo, o tratamento neonatal com D-fen 3 mg/kg causou redução significativa da expressão apenas da TPH2 ($0,08 \pm 0,03$ vs. $0,65 \pm 0,14$, $p = 0,002$) e do BDNF ($0,73 \pm 0,21$ vs. $1,38 \pm 0,13$, $p = 0,04$). Assim como no mesencéfalo, não houve expressão de Lmx1b em nenhum dos grupos experimentais com 21 DPN (Figura 21).

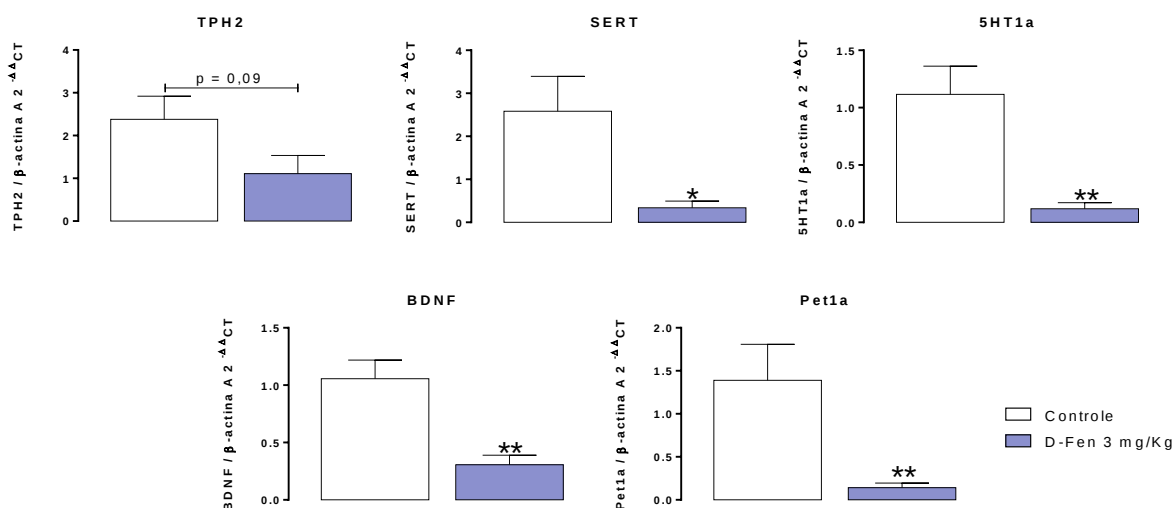


Figura 20: Expressão gênica mesencefálica de TPH2, SERT, 5HT1, BDNF e Pet1a em camundongos com 21 DPN tratados com salina 0,9% ou d-fenfluramina 3 mg/kg. * representa $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. N = 6-7.

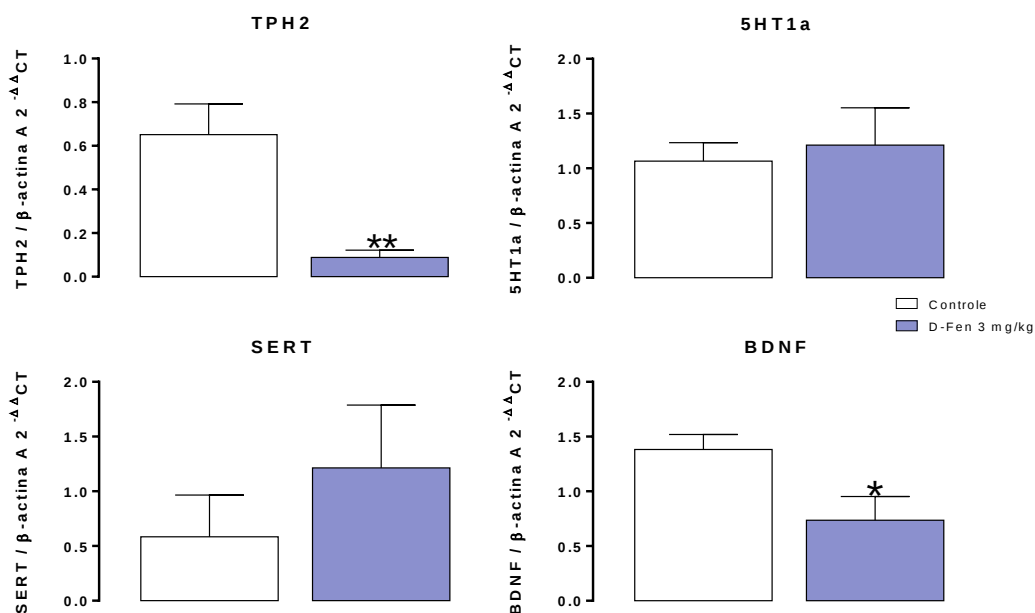


Figura 21: Expressão gênica hipocampal de TPH2, SERT, 5HT1 e BDNF em camundongos com 21 DPN tratados com salina 0,9% ou d-fenfluramina 3 mg/kg. * representa $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. N=6-7.

5.1.2 Avaliação comportamental

5.1.2.1 Teste do campo aberto

No teste do campo aberto, não foram verificadas diferenças significativas tanto nos parâmetros relacionados com exploração quanto naqueles associados com comportamento semelhantes à ansiedade (Figura 22).

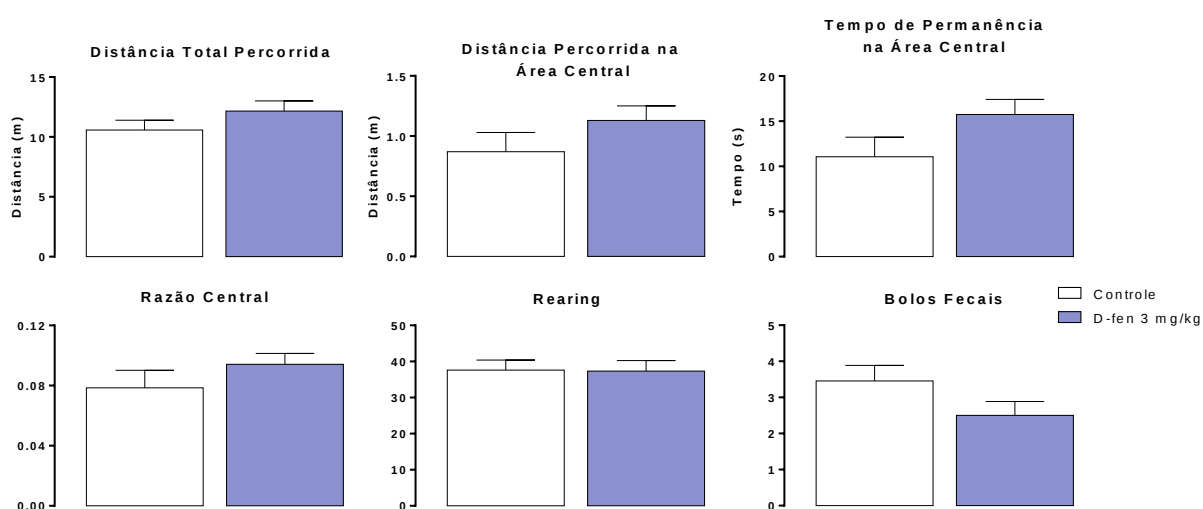


Figura 22: Efeito da administração neonatal de d-fenfluramina 3 mg/kg nos parâmetros comportamentais do teste do campo aberto. Nesse protocolo, não foram verificadas diferenças significativas. N=12-16.

5.1.2.2 Teste da caixa claro-escuro

Diferentemente do teste do campo aberto, foi verificado que o tratamento neonatal com D-Fen 3 mg/kg promoveu diferenças significativas nos seguintes parâmetros no teste da caixa claro-escuro: latência ($45,4 \pm 7,30$ s vs. $24,1 \pm 3,50$ s, $p = 0,01$), tempo de permanência no lado claro ($100,6 \pm 5,74$ s vs. $128,6 \pm 5,92$ s, $p = 0,002$), transições ($14,6 \pm 0,79$ vs. $20,7 \pm 1,65$, $p = 0,002$) e SAP ($16,4 \pm 0,98$ vs. $9,50 \pm 0,94$, $p < 0,001$). Tais alterações indicam que o referido tratamento promove um aumento do comportamento semelhante à ansiedade (Figura 23).

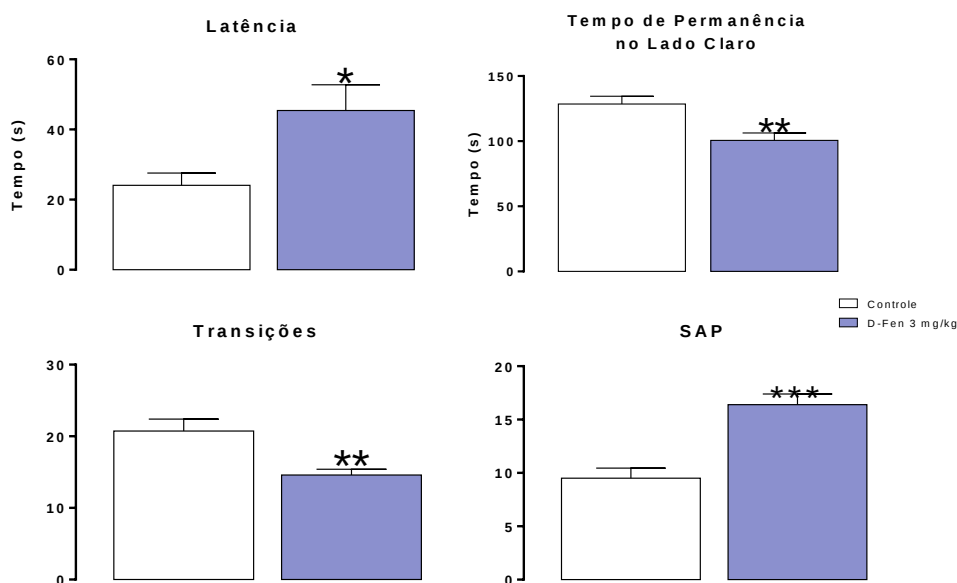


Figura 23: Efeito da administração neonatal de d-fenfluramina 3 mg/kg nos parâmetros comportamentais do teste da caixa claro-escuro. Nesse protocolo, foi demonstrada diferença nos parâmetros relacionados com comportamento semelhante à ansiedade. * representa $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. N=12-16.

5.1.2.3 Teste do labirinto em cruz elevado

No teste do labirinto em cruz elevado, foi demonstrado que o tratamento neonatal com D-Fen 3 mg/kg causou um aumento significativo do tempo de permanência na plataforma central ($116,3 \pm 5,81$ s vs. $70,8 \pm 10,6$ s, $p < 0,001$) e uma tendência estatística no número de SAP ($p = 0,05$). O aumento de tais parâmetros está relacionado com análise de risco, que está conceitualmente associado com comportamento análogo à ansiedade (Figura 24).

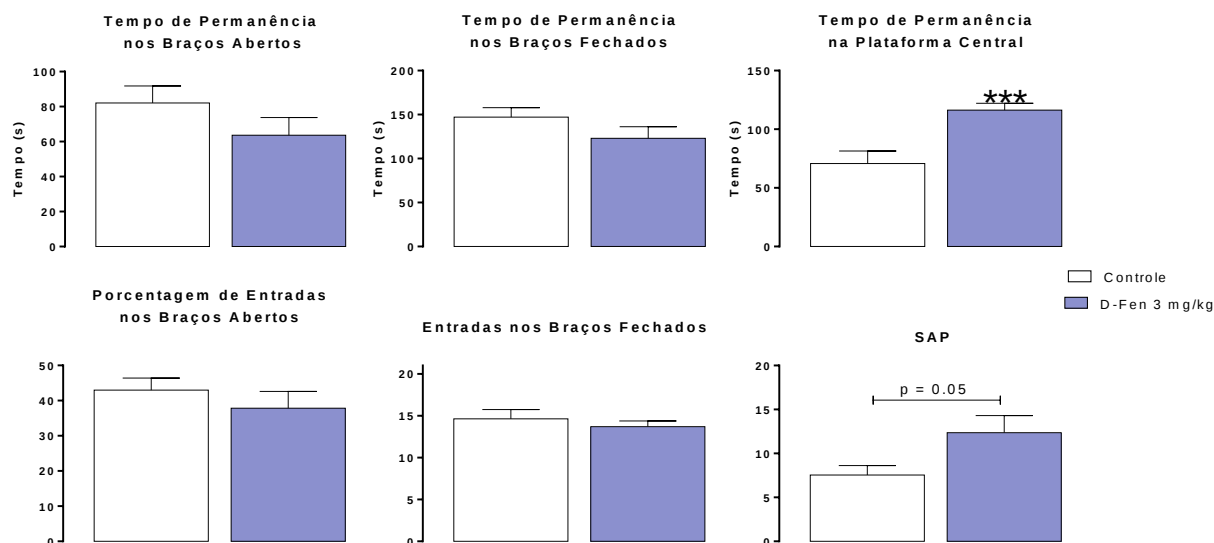


Figura 24: Efeito da administração neonatal de d-fenfluramina 3 mg/kg nos parâmetros comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado. Nesse protocolo, foi demonstrada diferença nos parâmetros associados com tomada de decisão. *** representa $p < 0,01$. N=12-16.

5.1.2.4 Teste da suspensão pela cauda

No teste da suspensão pela cauda (Figura 25), também foi verificado que o tratamento neonatal com D-fen 3 mg/kg promoveu redução do comportamento semelhante à depressão caracterizado por aumento da latência para o primeiro episódio de imobilidade ($20,8 \pm 4,29$ s vs. $79,3 \pm 9,15$ s, $p < 0,001$) e por redução do tempo de imobilidade ($64,8 \pm 6,07$ s vs. $127,8 \pm 8,49$ s, $p < 0,001$).

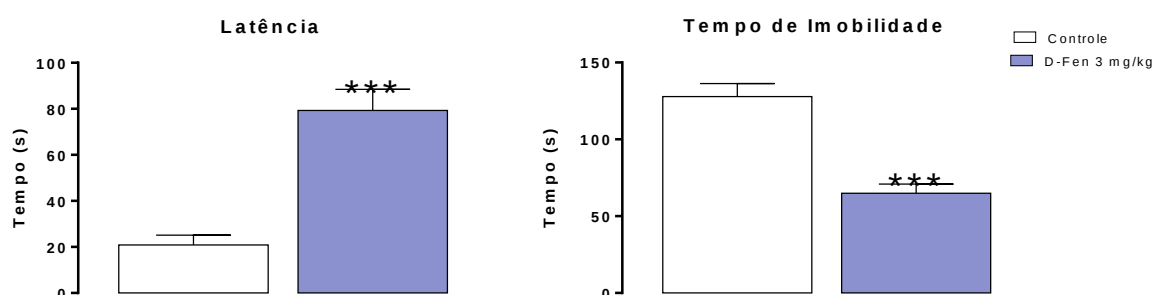


Figura 25: Efeito da administração neonatal de d-fenfluramina 3 mg/kg nos parâmetros comportamentais no teste da suspensão pela cauda. Nesse protocolo, foi demonstrada que o tratamento com essa droga causa comportamento antidepressivo. *** representa $p < 0,001$. N = 11-16.

5.2 Fluoxetina

5.2.1 Expressão Gênica Mesencefálica e Hipocampal

Diferentemente da programação neonatal com D-fen 3 mg/kg, o tratamento neonatal com fluoxetina (Flu) 10 mg/kg aumentou a expressão da TPH2 ($1,98 \pm 0,21$ vs. $1,02 \pm 0,11$, $p = 0,004$) no mesencéfalo. Em relação aos demais genes relacionados com o sistema serotoninérgico, todavia, não houve diferenças estatisticamente significativas. Além disso, houve detecção na expressão do Lmx1b (Figura 26).

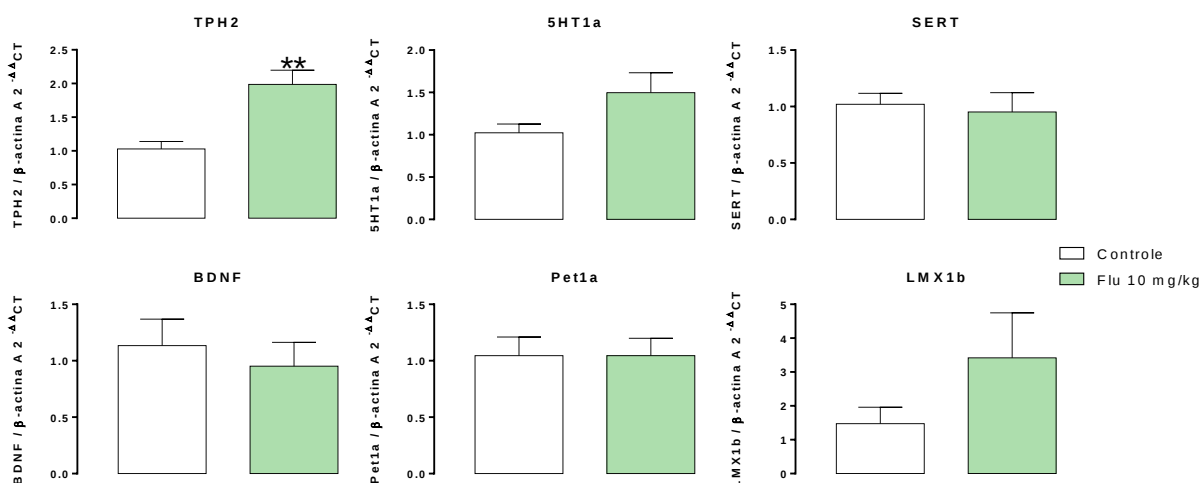


Figura 26: Expressão gênica mesencefálica de TPH2, SERT, 5HT1, BDNF, Pet1a e Lmx1b em camundongos com 16 DPN tratados com salina 0,9% ou fluoxetina 10 mg/kg. ** representa $p < 0,01$. N = 6.

Em relação ao hipocampo, os animais programados com Flu 10 mg/kg tiveram infra-regulação da TPH2 ($0,07 \pm 0,007$ vs. $1,07 \pm 0,19$, $p < 0,001$), 5HT1a ($0,08 \pm 0,007$ vs. $1,02 \pm 0,17$, $p < 0,001$), SERT ($0,35 \pm 0,08$ vs. $1,09 \pm 0,18$, $p = 0,004$), BDNF ($0,19 \pm 0,02$ vs. $1,07 \pm 0,19$, $p = 0,001$) e Lmx1b ($0,03 \pm 0,01$ vs. $1,12 \pm 0,25$, $p = 0,001$) (Figura 27).

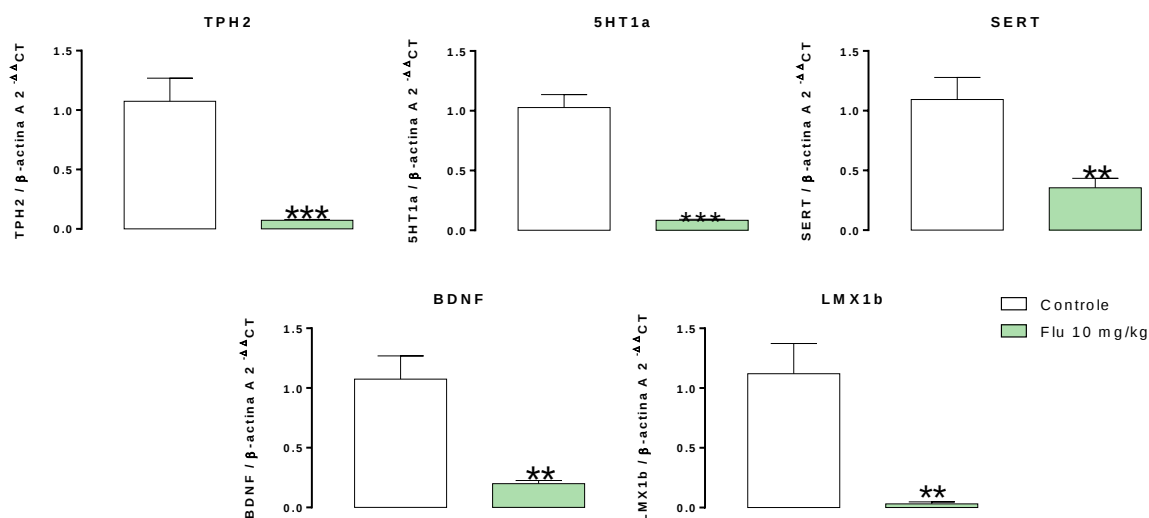


Figura 27: Expressão gênica hipocampal de TPH2, SERT, 5HT1, BDNF e Lmx1b em

camundongos com 16 DPN tratados com salina 0,9% ou fluoxetina 10 mg/kg. * representa $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. N = 6.

5.2.2 Avaliação comportamental

5.2.2.1 Teste do campo aberto

No teste do campo aberto, foi verificada diferença significativa no tempo de grooming ($7,62 \pm 1,47$ s vs. $3,0 \pm 0,97$ s, $p = 0,01$). O aumento dessa variável experimental indica que os animais programados apresentam maior responsividade ao estresse decorrente da execução do protocolo (Figura 28).

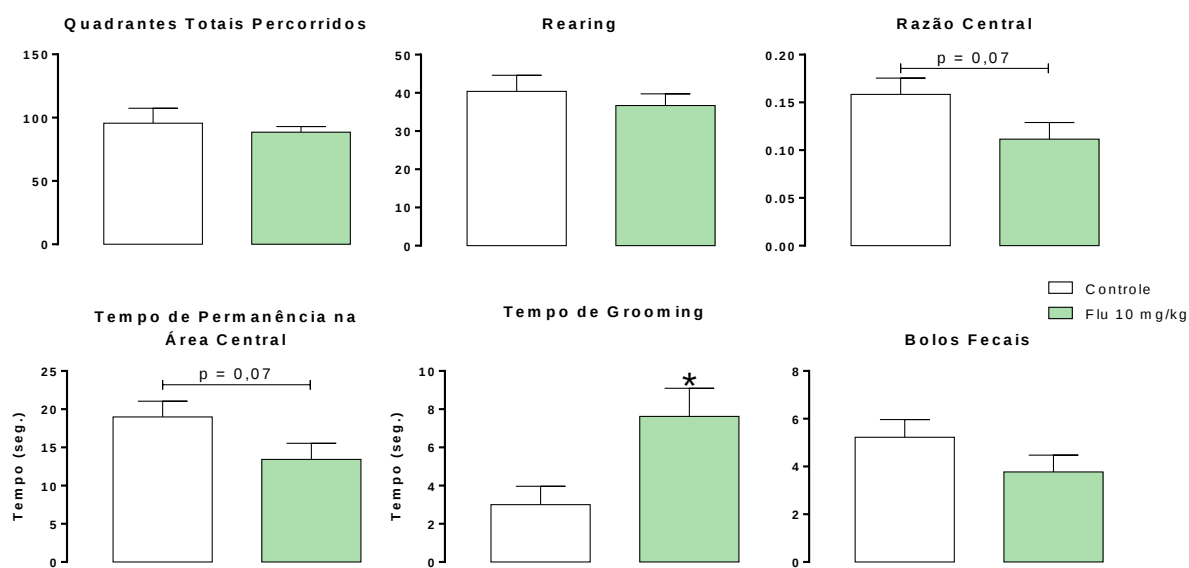


Figura 28: Efeito da administração neonatal de fluoxetina 10 mg/kg nos parâmetros comportamentais do teste do campo aberto. Nesse protocolo, foi demonstrada diferença no tempo de grooming. * representa $p < 0,05$. N = 12.

Também houve uma tendência estatística nos parâmetros razão central ($p = 0,07$) e tempo de permanência na área central ($p = 0,07$). A redução desses dois parâmetros indica que o tratamento supracitado tende a causar ansiogênese nesse paradigma experimental.

5.2.2.2 Teste da caixa claro-escuro

De maneira semelhante à programação neonatal com D-Fen, o tratamento neonatal com Flu 10 mg/kg promoveu diferenças significativas nos seguintes parâmetros no teste da caixa claro-escuro: latência ($147,5 \pm 36,7$ s vs. $17,5 \pm 1,83$ s, $p = 0,006$), tempo de permanência no lado claro ($36,6 \pm 10,40$ s vs. $75,7 \pm 6,57$ s, $p = 0,008$) e transições ($8,01 \pm 2,31$ vs. $17,5 \pm 1,41$, $p = 0,004$). No entanto, não houve diferença estatística no número de SAP ($p = 0,21$). Tais alterações indicam que o referido tratamento promove um aumento do comportamento semelhante à ansiedade (Figura 29).

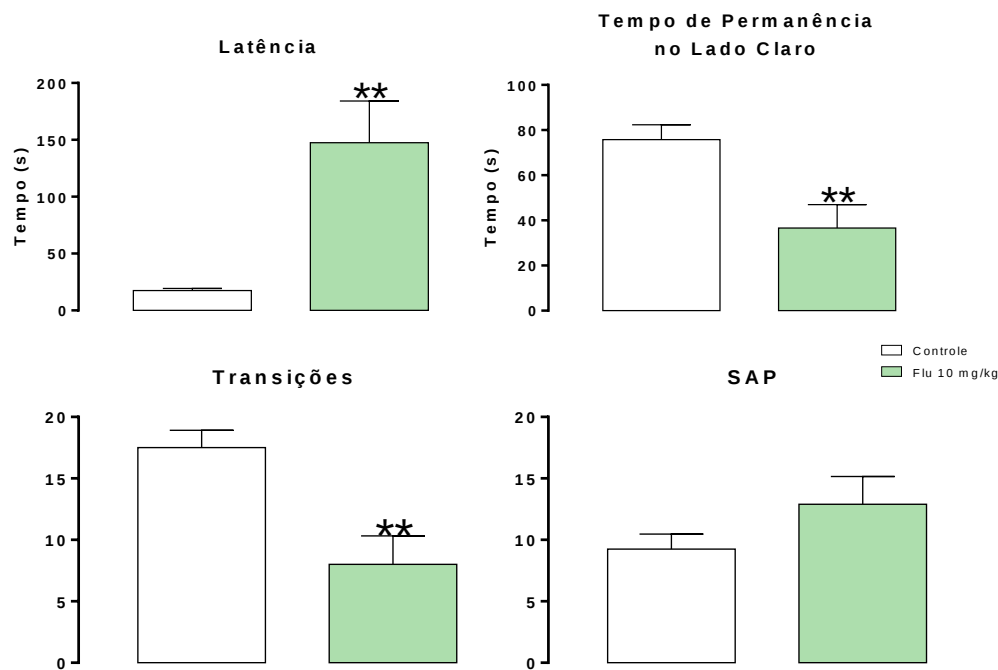


Figura 29: Efeito da administração neonatal de fluoxetina 10 mg/kg nos parâmetros comportamentais do teste da caixa claro-escuro. Nesse protocolo, foi demonstrada diferença nos parâmetros relacionados com comportamento semelhante à ansiedade. * representa $p < 0,05$. $N = 12$.

5.2.2.3 Teste do labirinto em cruz elevado

No teste do labirinto em cruz elevado, foi demonstrado que os animais tratados com Flu 10 mg/kg tiveram menor tempo de permanência na plataforma central) do que os animais do grupo controle ($40,8 \pm 4,03$ s vs. $71,4 \pm 7,47$ s, $p = 0,001$). A redução desse parâmetro está relacionada com menor análise de risco (Figura 30).

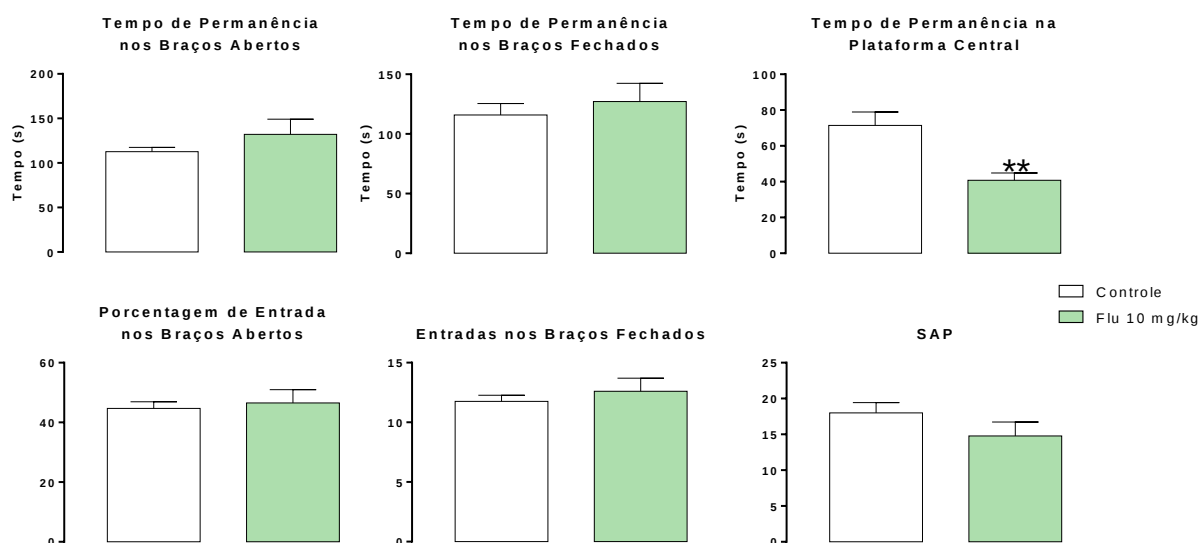


Figura 30: Efeito da administração neonatal de fluoxetina 10mg/kg nos parâmetros

comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado. Nesse protocolo, foi demonstrada diferença no tempo de permanência na plataforma central. ** representa $p < 0,01$, $n=12$.

5.2.2.4 Teste da suspensão pela cauda

No teste da suspensão pela cauda (Figura 31), também foi verificado que o tratamento neonatal com Flu 10 mg/kg promoveu redução do comportamento semelhante à depressão caracterizado por redução do tempo de imobilidade ($77,6 \pm 7,25$ s vs. $112,1 \pm 12,24$ s, $p = 0,02$).

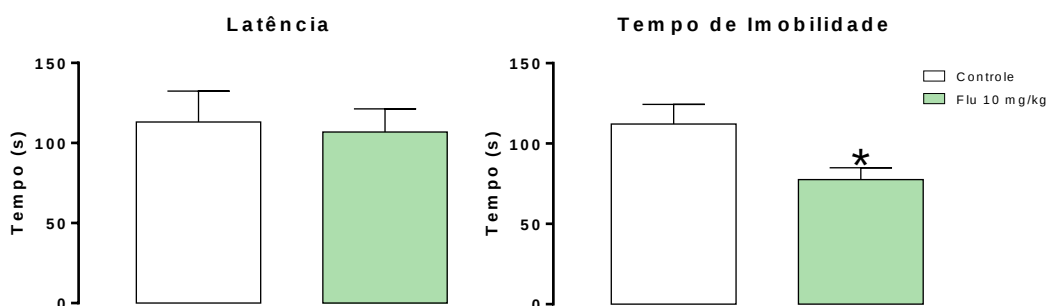


Figura 31: Efeito da administração neonatal de fluoxetina 10 mg/kg nos parâmetros comportamentais no teste da suspensão pela cauda. * representa $p < 0,05$. $N=12$.

5.3 p-CPA

5.3.1 Expressão Gênica Mesencefálica e Hipocampal

Nesse protocolo, o tratamento neonatal com p-CPA 100 mg/kg aumentou a expressão do 5HT1a ($1,35 \pm 0,05$ vs. $1,02 \pm 0,10$, $p = 0,004$) no mesencéfalo. Também houve uma tendência estatística no que tange à expressão da TPH2 ($p = 0,07$) (Figura 32).

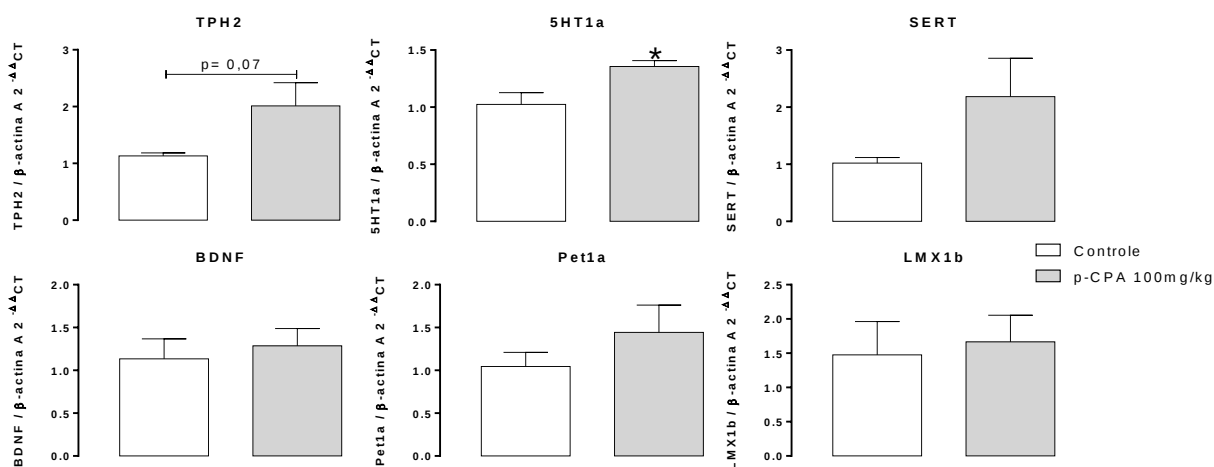


Figura 32: Expressão gênica mesencefálica de TPH2, SERT, 5HT1, BDNF, Pet1a e Lmx1b em camundongos com 16 DPN tratados com salina 0,9% ou p-CPA 100 mg/kg. * representa $p < 0,05$. $N = 5-6$.

Diferentemente dos tratamentos anteriores descritos, não houve diferenças significativas na expressão dos genes relacionados ao sistema serotoninérgico no hipocampo (Figura 33). Todavia, também houve uma tendência estatística representada por uma redução na expressão do SERT ($p = 0,06$).

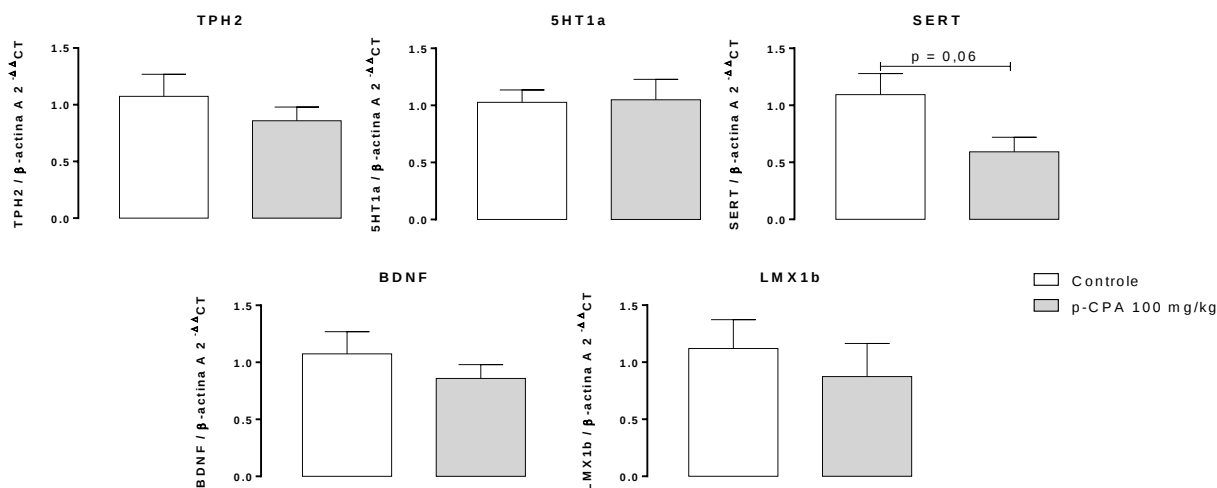


Figura 33: Expressão gênica hipocampal de TPH2, SERT, 5HT1, BDNF e Lmx1b em camundongos com 21 DPN tratados com salina 0,9% ou p-CPA 100 mg/kg. N = 5-6.

5.3.2 Avaliação comportamental

5.3.2.1 Teste do campo aberto

No teste do campo aberto, foi observado que os animais tratados com p-CPA 100 mg/kg durante o período neonatal tiveram menor razão central do que os controles ($0,22 \pm 0,03$ vs. $0,34 \pm 0,02$, $p = 0,01$). Esse parâmetro está associado com comportamento semelhante à ansiedade (Figura 34).

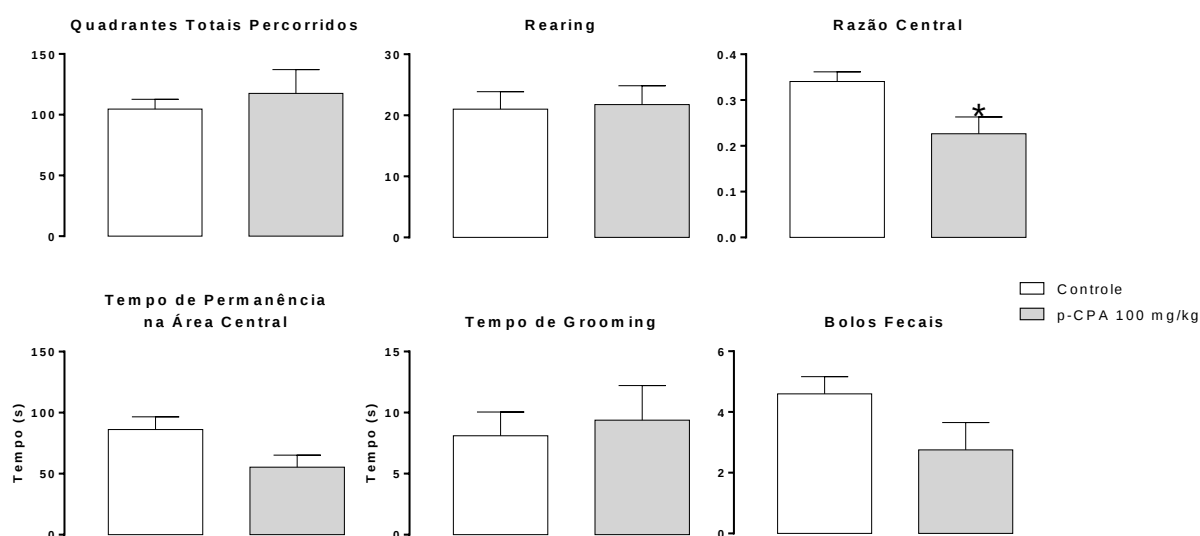


Figura 34: Efeito da administração neonatal de p-CPA 100 mg/kg nos parâmetros comportamentais do teste do campo aberto. Nesse protocolo, foi demonstrada diferença na razão central. * representa $p < 0,05$. N = 10-12.

5.3.2.2 Teste da caixa claro-escuro

Nesse protocolo, o tratamento neonatal com p-CPA 100 mg/kg promoveu diferenças significativas na latência ($147,5 \pm 36,7$ s vs. $17,5 \pm 1,83$ s, $p = 0,006$) e no número de SAP ($8,01 \pm 2,31$ vs. $17,5 \pm 1,41$, $p = 0,004$). Tais alterações indicam que o referido tratamento promove uma redução do comportamento semelhante à ansiedade (Figura 35).

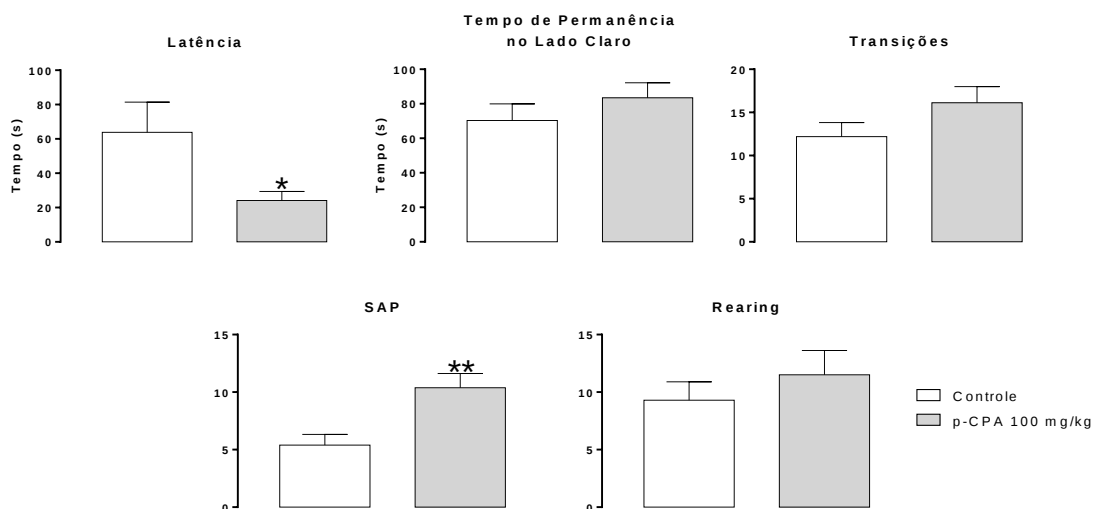


Figura 35: Efeito da administração neonatal de p-CPA 100 mg/kg nos parâmetros comportamentais do teste da caixa claro-escuro. Nesse protocolo, foi demonstrada diferença nos parâmetros relacionados com comportamento semelhante à ansiedade. * representa $p < 0,05$ e **, $p < 0,01$. $N = 12$.

5.3.2.3 Labirinto em cruz elevado

No teste do labirinto em cruz elevado, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 36). Todavia, houve uma tendência estatística de maior número de entradas nos braços fechados ($p = 0,05$).

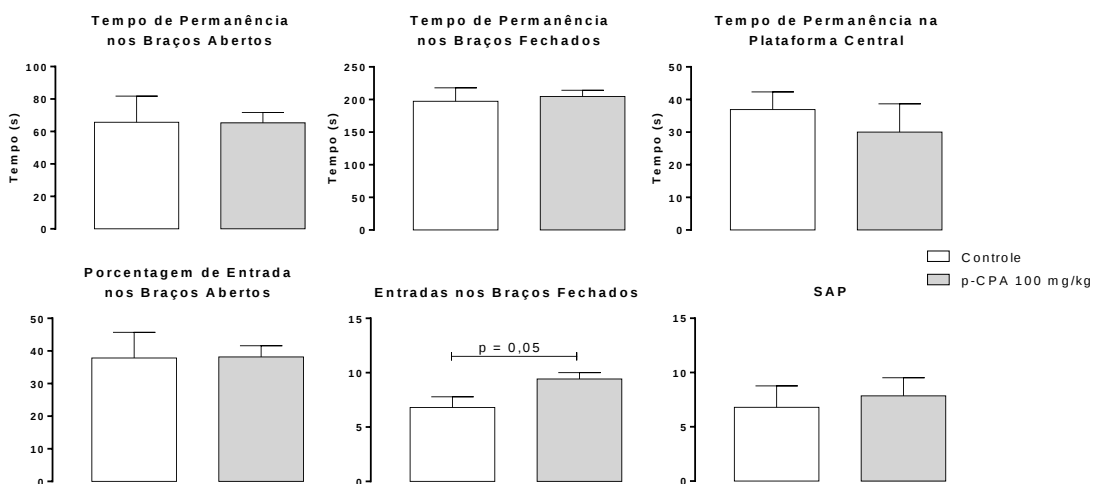


Figura 36: Efeito da administração neonatal de p-CPA 100 mg/kg nos parâmetros

comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado. Nesse protocolo, não foram observadas diferenças significativas. N = 12.

5.3.2.4 Teste da suspensão pela cauda

No teste da suspensão pela cauda (Figura 37), foi verificado que o tratamento neonatal com p-CPA 100 mg/kg promoveu aumento do comportamento semelhante à depressão caracterizado por redução da latência para o primeiro episódio de imobilidade ($29,8 \pm 6,79s$ vs. $51,7 \pm 6,72 s$, $p = 0,03$).

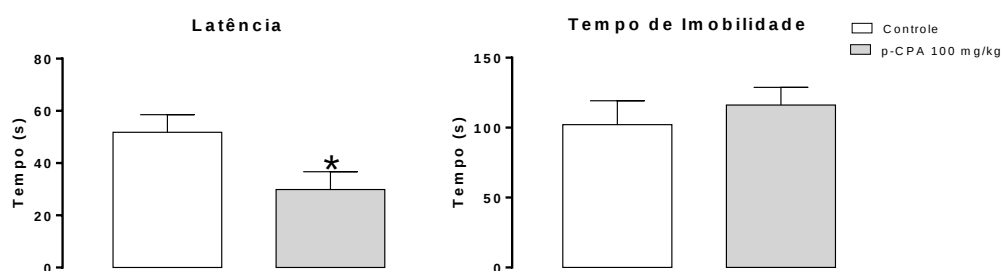


Figura 37: Efeito da administração neonatal de p-CPA 100 mg/kg nos parâmetros comportamentais no teste da suspensão pela cauda. Nesse protocolo, foi demonstrado que o referido tratamento promove comportamento semelhante à depressão; * representa $p < 0,05$. N=12.

5.4 8-OH-DPAT

5.4.1 Expressão Gênica Mesencefálica e Hipocampal

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, foi verificado que o tratamento neonatal com 8-OH-DPAT (DPAT) 1 mg/kg causa aumento significativo da expressão mesencefálica dos genes que codificam a TPH2 ($1,66 \pm 0,22$ vs. $1,02 \pm 0,11$, $p = 0,03$) e 5HT1a ($1,54 \pm 0,13$ vs. $1,02 \pm 0,10$, $p = 0,01$). Também foi observada uma tendência à infra-regulação do BDNF ($p = 0,05$) (Figura 38).

Já no hipocampo, semelhantemente ao que foi observado com a programação com Flu 10mg/kg, os filhotes tratados com DPAT 1 mg/kg também tiveram infra-regulação da TPH2 ($0,03 \pm 0,008$ vs. $1,07 \pm 0,19$, $p < 0,001$), 5HT1a ($0,72 \pm 0,06$ vs. $1,02 \pm 0,10$, $p = 0,03$), SERT ($0,29 \pm 0,01$ vs. $1,09 \pm 0,18$, $p = 0,004$), BDNF ($0,34 \pm 0,02$ vs. $1,07 \pm 0,19$, $p = 0,004$) e Lmx1b ($0,02 \pm 0,01$ vs. $1,12 \pm 0,25$, $p = 0,001$) (Figura 39).

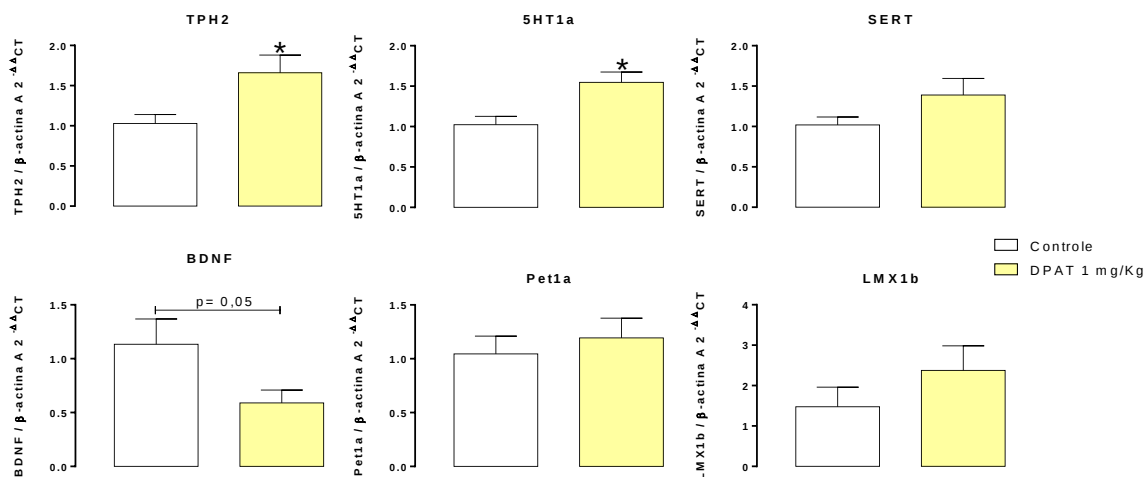


Figura 38: Expressão gênica mesencefálica de TPH2, SERT, 5HT1, BDNF, Pet1a e Lmx1b em camundongos com 16 DPN tratados com salina 0,9% ou 8-OH-DPAT 1 mg/kg. * representa $p < 0,05$. N = 6.

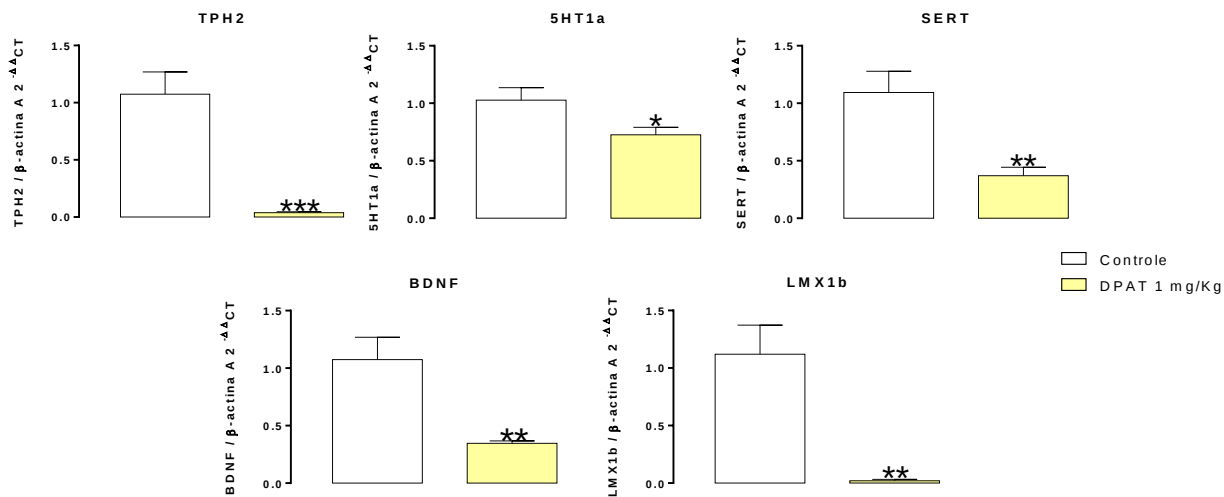


Figura 39: Expressão gênica hipocámpal de TPH2, SERT, 5HT1, BDNF e Lmx1b em camundongos com 16 DPN tratados com salina 0,9% ou 8-OH-DPAT 1 mg/kg. * representa $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. N = 6.

5.4.2 Avaliação comportamental

5.4.2.1 Teste do campo aberto

No teste do campo aberto, não foram observadas alterações significativas em quaisquer parâmetros analisados entre os grupos experimentais (Figura 40).

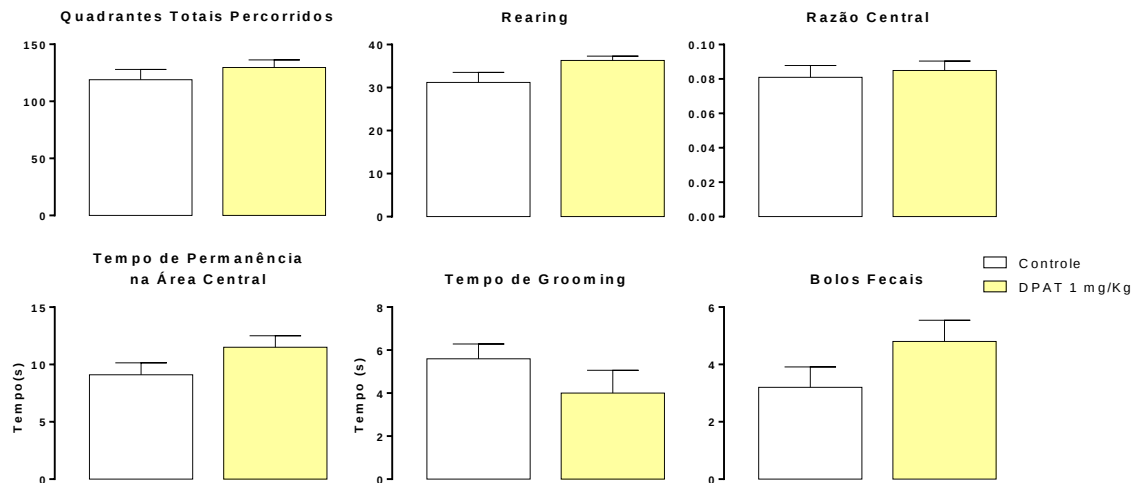


Figura 40: Efeito da administração neonatal de 8-OH-DPAT 1 mg/kg nos parâmetros comportamentais do teste do campo aberto. Nesse protocolo, não foram verificadas diferenças significativas. N = 10.

5.4.2.2 Teste da caixa claro-escuro

Assim como no teste do campo aberto, também não foram observadas alterações significativas em quaisquer parâmetros analisados entre os grupos experimentais (Figura 41).

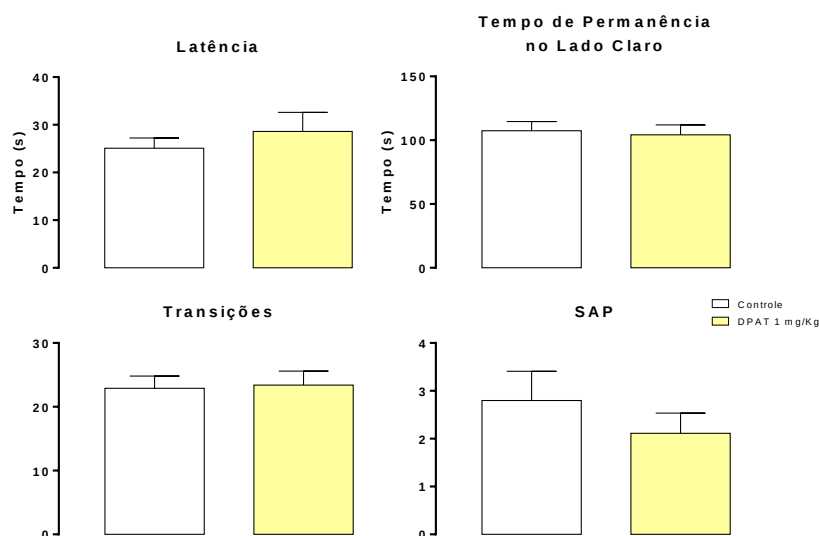


Figura 41: Efeito da administração neonatal de 8-OH-DPAT 1 mg/kg nos parâmetros comportamentais do teste da caixa claro-escuro. Nesse protocolo, não foram verificadas diferenças significativas. N = 10.

5.4.2.3 Teste do labirinto em cruz elevado

Nesse teste, foi demonstrado que o tratamento neonatal com DPAT 1 mg/kg promoveu efeitos ansiolíticos evidenciados pelo aumento no tempo de permanência nos braços abertos ($51,5 \pm 14,4$ vs. $13,4 \pm 4,64$, $p = 0,02$) e na porcentagem de entrada nos mesmos braços ($23,1 \pm 4,71$ vs. $9,62 \pm 3,21$, $p = 0,03$) (Figura 42).

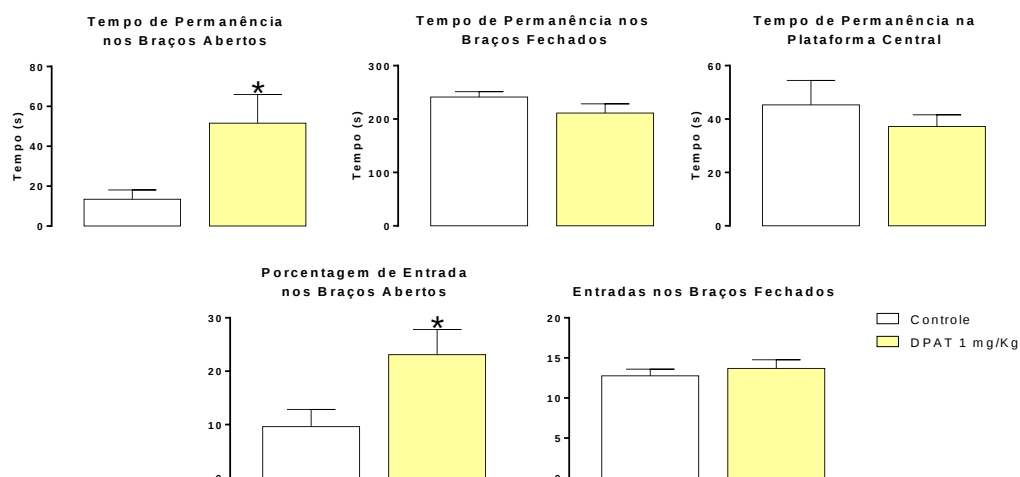


Figura 42: Efeito da administração neonatal de 8-OH-DPAT 1 mg/kg nos parâmetros comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado. Nesse protocolo, foi demonstrado que o tratamento promoveu efeitos ansiolíticos. * representa $p < 0,05$. N = 10.

5.4.2.4 Teste da suspensão pela cauda

No teste da suspensão pela cauda (Figura 43), foi verificado que o tratamento neonatal com DPAT 1 mg/kg promoveu redução do comportamento semelhante à depressão caracterizado por redução do tempo de imobilidade ($72,2 \pm 16,1$ s vs. $121,3 \pm 9,29$ s, $p = 0,01$).

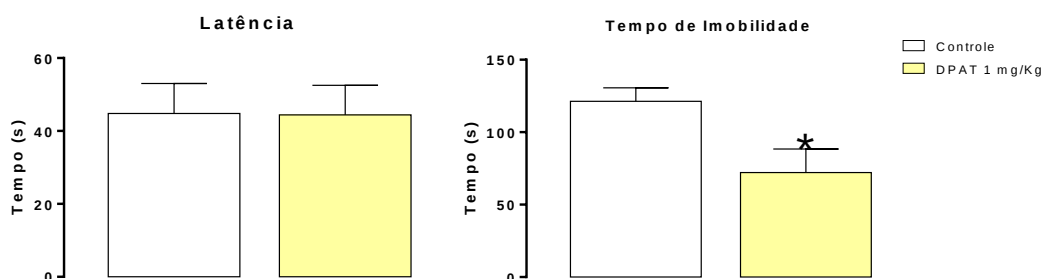


Figura 43: Efeito da administração neonatal de 8-OH-DPAT 1 mg/kg nos parâmetros comportamentais no teste da suspensão pela cauda. Nesse protocolo, foi demonstrado que o tratamento promoveu efeitos antidepressivos. * representa $p < 0,05$. N=10.

5.5 WAY 100135

5.5.1 Expressão Gênica Mesencefálica e Hipocampal

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, foi verificado que o tratamento neonatal com WAY 100135 (WAY) 1 mg/kg causa aumento significativo da expressão mesencefálica dos genes que codificam a TPH2 ($1,96 \pm 0,24$ vs. $1,02 \pm 0,11$, $p = 0,009$), 5HT1a ($1,78 \pm 0,06$ vs. $1,02 \pm 0,10$, $p < 0,001$) e SERT ($1,95 \pm 0,18$ vs. $1,02 \pm 0,09$, $p = 0,002$). Também foi observada uma tendência à infra-regulação do BDNF ($p = 0,08$) (Figura 44).

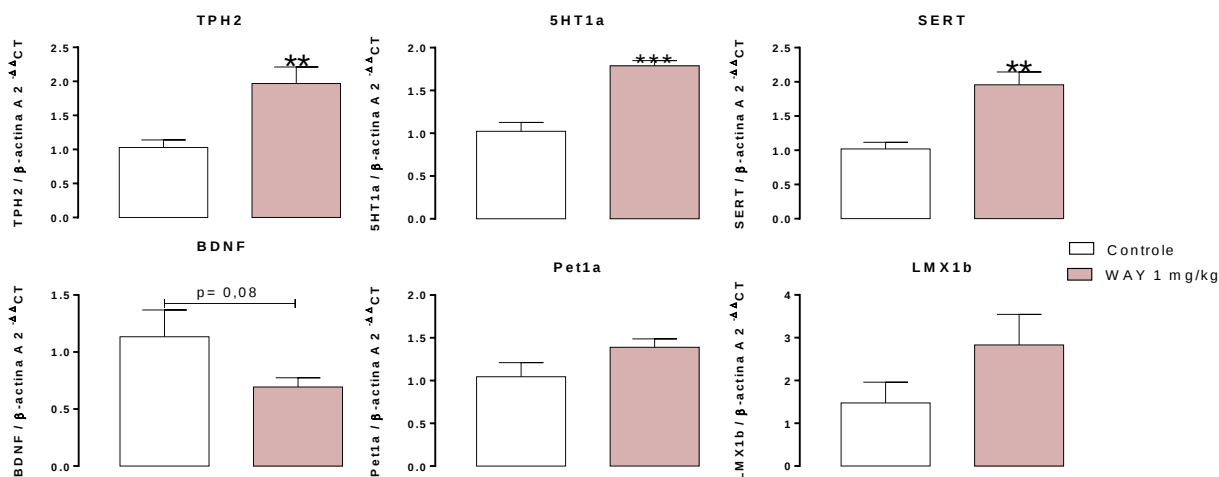


Figura 44: Expressão gênica mesencefálica de TPH2, SERT, 5HT1a, BDNF, Pet1a e Lmx1b em camundongos com 21 DPN tratados com salina 0,9% ou WAY 100135 1 mg/kg. * representa $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$, $N = 6$.

Já no hipocampo, semelhantemente ao que foi observado com a programação com DPAT 1 mg/kg, os filhotes tratados com WAY 1mg/kg também tiveram infra-regulação da TPH2 ($0,07 \pm 0,01$ vs. $1,07 \pm 0,19$, $p < 0,001$), 5HT1a ($0,53 \pm 0,09$ vs. $1,02 \pm 0,10$, $p = 0,01$), SERT ($0,45 \pm 0,10$ vs. $1,09 \pm 0,18$, $p = 0,01$), BDNF ($0,34 \pm 0,02$ vs. $1,07 \pm 0,19$, $p = 0,004$) e Lmx1b ($0,05 \pm 0,03$ vs. $1,12 \pm 0,25$, $p = 0,001$) (Figura 45).

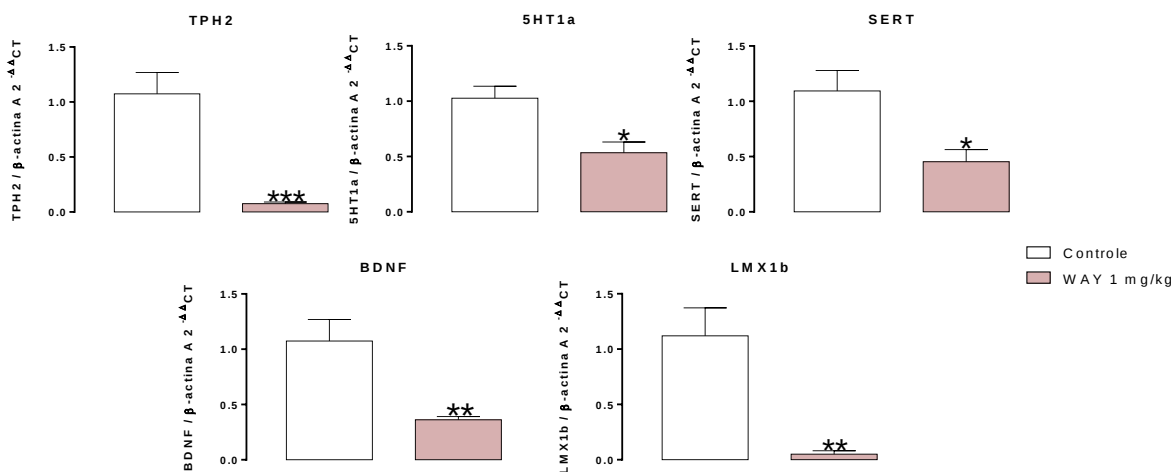


Figura 45: Expressão gênica hipocampal de TPH2, SERT, 5HT1a, BDNF e Lmx1b em

camundongos com 16 DPN tratados com salina 0,9% ou WAY 100135 1 mg/kg. * representa $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ e ***, $p < 0,001$. N = 6.

5.5.2 Avaliação comportamental

5.5.2.1 Teste do campo aberto

No teste do campo aberto, foi observado que os animais tratados com WAY 1 mg/kg durante o período neonatal tiveram menor razão central ($0,25 \pm 0,02$ vs. $0,34 \pm 0,02$, $p = 0,02$) e tempo de permanência na área central ($49,1 \pm 0,03$ s vs. $86,2 \pm 10,4$ s, $p = 0,01$) do que os do grupo controle. Ambos parâmetros estão associados com comportamento semelhante à ansiedade (Figura 46).

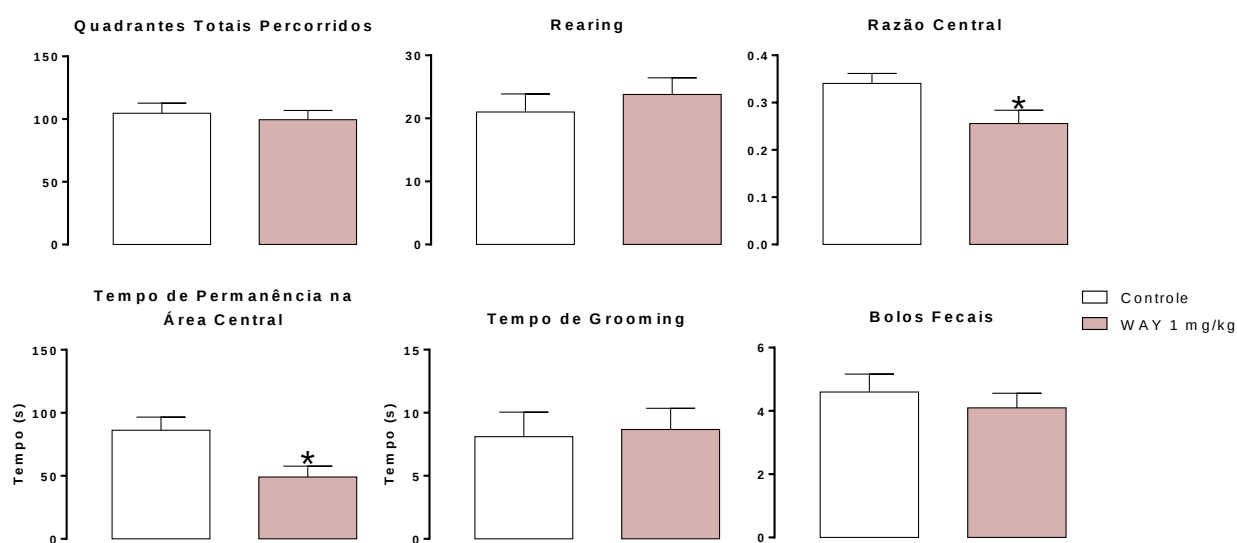


Figura 46: Efeito da administração neonatal de WAY 100135 nos parâmetros comportamentais do teste do campo aberto. Nesse protocolo, foi demonstrado que o grupo tratado teve maior comportamento semelhante à ansiedade. * representa $p < 0,05$. N=12.

5.5.2.2 Teste da caixa claro escuro

Assim como no tratamento com DPAT 1 mg/kg, também não foram observadas alterações significativas em quaisquer parâmetros analisados entre os grupos experimentais (Figura 47).

5.5.2.3 Teste do labirinto em cruz elevado

Nesse protocolo, foi demonstrado que o tratamento neonatal com WAY 1 mg/kg promoveu efeitos ansiogênicos evidenciados pela redução no tempo de permanência nos braços abertos ($40,1 \pm 7,85$ vs. $70,1 \pm 9,63$, $p = 0,02$) e na porcentagem de entrada nos mesmos braços ($24,2 \pm 3,62$ vs. $38,2 \pm 4,24$, $p = 0,01$), bem como maior tempo de permanência nos braços fechados ($216,9 \pm 11,1$ vs. $181,6 \pm 12,6$, $p = 0,04$) (Figura 48).

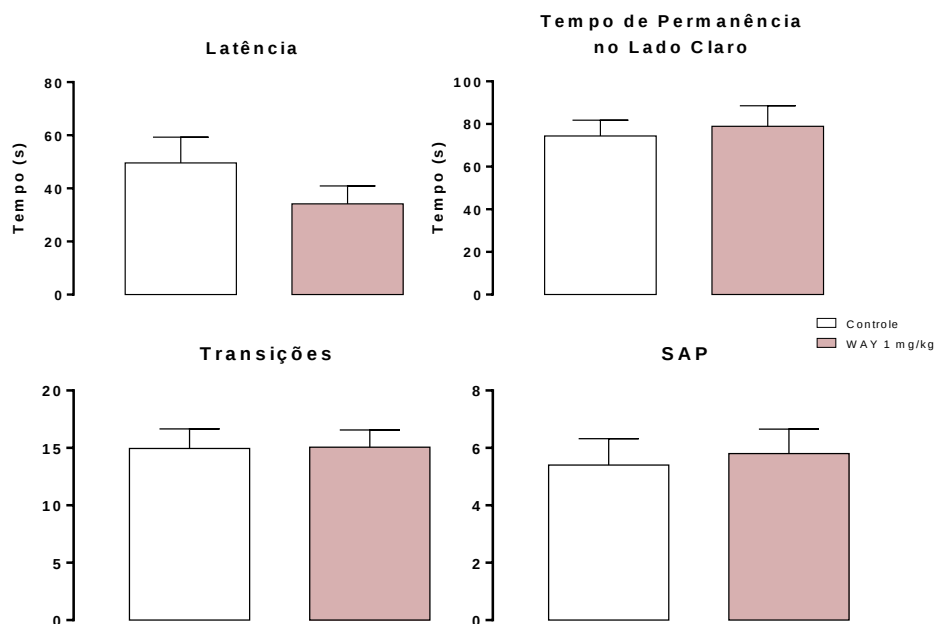


Figura 47: Efeito da administração neonatal de WAY 100135 1 mg/kg nos parâmetros comportamentais do teste da caixa claro-escuro. Nesse protocolo, não houve diferenças significativas. N = 12.

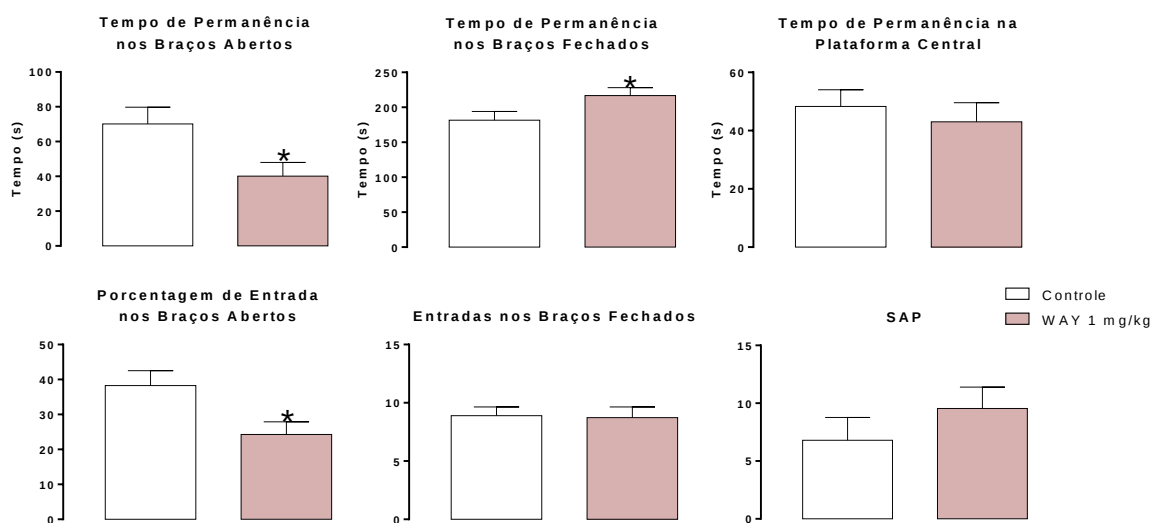


Figura 48: Efeito da administração neonatal de WAY 100135 1 mg/kg nos parâmetros comportamentais no teste do labirinto em cruz elevado. Nesse protocolo, foi demonstrado aumento de comportamento semelhante à ansiedade. * representa $p < 0,05$. N=12.

5.5.2.4 Teste da suspensão pela cauda

No teste da suspensão pela cauda (Figura 49), foi verificado que o tratamento neonatal com WAY 1 mg/kg promoveu aumento do comportamento semelhante à depressão caracterizado pela redução da latência para o primeiro episódio de imobilidade ($72,2 \pm 16,1$ s vs. $121,3 \pm 9,29$ s, $p = 0,01$). Também houve uma tendência estatística associada a um maior tempo de imobilidade ($p = 0,07$).

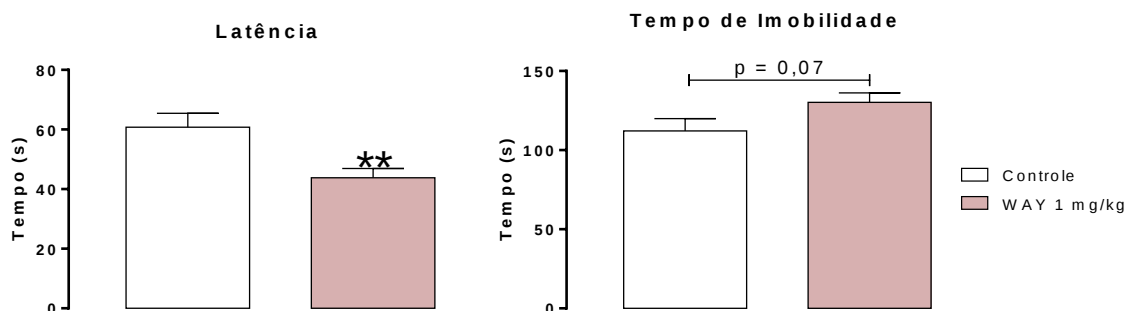


Figura 49: Efeito da administração neonatal de WAY 1 mg/kg nos parâmetros comportamentais no teste da suspensão pela cauda. Nesse protocolo, foi demonstrado que o referido tratamento proporciona aumento de comportamento semelhante à depressão. ** representa $p < 0,01$. N = 12.

Para fins didáticos, serão colocados dois quadros que resumem o efeito das diferentes manipulações farmacológicas do sistema serotoninérgica em relação a expressão gênica mesencefálica e hipocampal (Quadro 2), bem como as consequências psicobiológicas observadas na fase adulta (Quadro 3).

Quadro 2: Quadro resumitivo dos resultados obtidos para expressão gênica.

Gene	Região	Fármacos				
		D-Fen	Flu	p-CPA	DPAT	WAY
TPH2	Mesencéfalo	Tendência a diminuir	Aumenta	Tendência a aumentar	Aumenta	Aumenta
	Hipocampo	Diminui	Diminui	NS	Diminui	Diminui
5HT1a	Mesencéfalo	Diminui	NS	Aumenta	Aumenta	Aumenta
	Hipocampo	NS	Diminui	NS	Diminui	Diminui
SERT	Mesencéfalo	Diminui	NS	NS	NS	Aumenta
	Hipocampo	NS	Diminui	Tendência a diminuir	Diminui	Diminui
BDNF	Mesencéfalo	Diminui	NS	NS	Tendência a diminuir	Tendência a diminuir
	Hipocampo	Diminui	Diminui	NS	Diminui	Diminui
Pet1a	Mesencéfalo	Diminui	NS	NS	NS	NS
Lmx1b	Mesencéfalo	SL	NS	NS	NS	NS
	Hipocampo	SL	Diminui	NS	Diminui	Diminui

SL, sem leitura; NS, não significativo.

Quadro 3: Quadro resumo dos resultados comportamentais observados na fase adulta.

Teste	Fundamento	Fármacos				
		D-Fen	Fluoxetina	p-CPA	DPAT	WAY
Campo Aberto	Atividade Exploratória	NS	NS	NS	NS	NS
	Ansiedade	NS	Tendência a Aumentar	Aumenta	NS	Aumenta
	Estresse	NS	Aumenta	NS	NS	NS
Caixa Claro-Escuro	Ansiedade	Aumenta	Aumenta	Diminui	NS	NS
Labirinto em Cruz Elevado	Ansiedade	Aumenta	NS	NS	Diminui	Aumenta
Suspensão pela Cauda	Depressão	Diminui	Diminui	Aumenta	Diminui	Aumenta

NS, não significativo.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, verificamos que diferentes manipulações do sistema serotoninérgico durante o período neonatal promovem alterações importantes em diferentes genes associados com esse sistema, especialmente no hipocampo. Não obstante, também verificamos que essas manipulações farmacológicas causam uma programação psicobiológica da prole caracterizada por alterações no comportamento semelhante à ansiedade e à depressão na fase adulta. Em geral, fármacos que cursam com aumento da atividade do sistema serotoninérgico promovem comportamento ansiogênico e antidepressivo. Todavia, manipulações diretas e específicas aos receptores 5HT1a parecem ser mais complexas e não refletem completamente as alterações comportamentais visualizadas no tratamento com os demais fármacos.

6.1 Expressão Gênica.

Estudos de biologia molecular em animais geneticamente modificados identificaram vários fatores de transcrição importantes para a especificação e aquisição do fenótipo neuronal serotoninérgico (GASPAR et al., 2003). Nos neurônios serotoninérgicos pós-mitóticos, foi evidenciado que os fatores Pet1, Gata-3 e Lmx1b regulam a diferenciação e a sobrevivência dos neurônios serotoninérgicos (SPENCER & DENERIS, 2017).

Em relação ao Pet-1, este gene possui um padrão de expressão restrito aos neurônios serotoninérgicos em roedores, sobretudo àqueles localizados nos núcleos da rafe (SPENCER & DENERIS, 2017). Todavia, em humanos, Kriegebaum e colaboradores verificaram a expressão deste fator transcrição em várias regiões cerebrais não serotoninérgicas, como locus coeruleus, núcleo caudado e putamen. Nessas últimas regiões, a expressão desse gene é maior que na ponte e no bulbo, que contêm núcleos de rafe. Níveis de expressão baixos também foram detectados no córtex frontal, hipocampo, núcleo subtalâmico e substância negra (KRIEGBAUM et al, 2010).

Camundongos nocaute para Pet1 exibem uma perda de 70% de neurônios serotoninérgicos e uma redução de cerca de 85% na concentração de 5-HT em várias

regiões cerebrais. Além disso, nos neurônios serotoninérgicos que ainda se mantêm viáveis, ocorre redução bem significativas na expressão de TPH2, SERT e VMAT. Esses camundongos apresentam maior agressividade, bem como aumento do comportamento semelhante à ansiedade no campo aberto e labirinto em cruz elevado (HENDRICKS et al., 2003).

Um outro elegante trabalho publicado por Liu e colaboradores verificou que o silenciamento do *Pet1a* ainda no período pré-natal, após a formação dos neurônios serotoninérgicos, é imprescindível para maturação desses neurônios, afetando aspectos morfológicos e eletrofisiológicos. O silenciamento do *Pet1a* na fase adulta também apresenta importantes consequências neurobiológicas. Os animais submetidos a esse paradigma experimental apresentam maior comportamento semelhante à ansiedade no teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro. Além disso, ocorre redução dos níveis de 5-HT em regiões prosencefálicas, acompanhado de infra-regulação de importante de genes associados com a função serotoninérgica, como TPH2 e SERT (LIU et al., 2010). Mais recentemente, foi verificado que além da expressão da TPH2 e SERT, o *Pet1a* também modula a expressão de um grande número de genes associados com expressão de fatores de transcrição, receptores acoplados a proteína G, canais iônicos, transportadores, peptídeos, proteínas de adesão, migração celular e transmissão sináptica (WYLER et al., 2016).

Várias observações indicam que a 5-HT, através da sua ligação aos receptores 5-HT_{1A}, modula a expressão do *Pet1a*. Por sua vez, o próprio *Pet1a* é capaz de regular e manter em níveis apropriados a expressão gênica do receptor 5-HT_{1A} em neurônios serotoninérgicos, caracterizando uma espécie de alça de retroalimentação negativa. Algumas observações reforçam essa ideia. Primeiro, em camundongos com deleção da TPH2 ou do receptor 5-HT_{1a}, a expressão de *Pet1a* é significativamente reduzida nos núcleos de rafe rostral. Segundo, o tratamento com 5-HT reverte a descrita infra-regulação desse fator de transcrição somente em camundongos com deleção da TPH2, mas não naqueles animais com deleção para 5-HT_{1a} (KIM et al., 2014). Em terceiro lugar, estudos prévios identificaram pelo menos um sítio de ligação do *Pet1a* nas regiões reguladoras do gene que codifica o receptor 5-HT_{1a} tanto humano quanto murino (FYODOROV et al., 1998; HENDRICKS et al., 1999). Esses dados podem indicar que *Pet1a* participa anteriormente ao 5HT_{1a} em uma sinalização intracelular ainda não descrita.

Em nosso trabalho, foi verificado que o tratamento neonatal com D-Fen 3mg/kg causa uma significativa redução da expressão mesencefálica do fator de transcrição *Pet1a*, que é acompanhada por concomitante infra-regulação dos genes responsáveis pela codificação do SERT, do receptor 5-HT_{1a} e do BDNF. Também houve uma tendência à redução da expressão gênica da TPH2. No hipocampo, também houve infra-regulação da TPH2 e do BDNF, mas não do 5-HT_{1a}. Esse resultado, em especial, pode ser explicado por um trabalho publicado Massey e seus colegas, que demonstraram que a deleção do fator *Pet1a* afeta a expressão dos autorreceptores 5-HT_{1a}, mas não dos heterorreceptores (MASSEY et al., 2013). Além disso, assim como em animais com deleção de *Pet1a*, os camundongos programados com D-Fen 3mg/kg também apresentam aumento do comportamento semelhante à ansiedade no teste da caixa claro-escuro e labirinto em cruz elevado.

No que tange às ações referentes ao fator de transcrição LMX1b, sabe-se que esse gene também é crucial para o desenvolvimento não somente do sistema

serotonérgico, mas também do dopaminérgico. Ademais, também está envolvido na embriogênese de outros tipos de tecidos, sobretudo rins e sistema esquelético (DING et al., 2003). Deleções ou mutações desse gene cursam com osteo-onicodisplasia hereditária, glaucoma de ângulo aberto e displasia renal (DAI et al., 2009). Já em camundongos, a deleção desse gene afeta todos os neurônios serotonérgicos e outros tipos de células. Em geral, esses animais não sobrevivem ao período perinatal (ZHAO et al., 2006).

Diante desse fato, uma alternativa brilhante colocada em prática por Song e colaboradores foi a utilização de um modelo animal com deleção condicional de LMX1b somente em neurônios serotonérgicos que expressam Pet1a. Quando esses animais são tratados com tamoxifeno na fase adulta, ocorre o silenciamento da expressão do LMX1b. Nessa condição, há redução dos níveis de 5-HT quando comparados ao grupo controle. Além disso, também ocorre infra-regulação da expressão de TPH2, SERT e VMAT2 no DRN. Por outro lado, não há alterações os níveis de dopamina e norepinefrina, bem como da expressão AADC e Pet1 (SONG et al., 2011). Do ponto de vista comportamental, a inativação condicional do fator Lmx1b especificamente em neurônios serotonérgicos resulta em aumento da memória aversiva no teste de medo condicionado ao contexto (DAI et al., 2008).

Como dito anteriormente, o fator Pet1 regula a expressão tanto da TPH2 quanto do SERT. Mas no trabalho supracitado, a expressão desses genes não reflete necessariamente a de Pet1. Esse fato sugere que, pelo menos após o período fetal, a expressão do SERT e da TPH2 é mais sensível aos níveis de Lmx1b do que de Pet1a. Se analisarmos o padrão de expressão verificado em nossos protocolos experimentais, especialmente no hipocampo, é possível fortemente conjecturar que o fator Lmx1b possa regular diretamente não somente a expressão da TPH2 e SERT, mas também dos genes responsáveis pela codificação do receptor 5-HT1a e de BDNF.

O BDNF é uma proteína conhecida por modular a plasticidade neuronal, desempenhando um papel importante na regulação da neurotransmissão, na regeneração e sobrevivência neuronal. Embora BDNF e 5-HT pareçam fazer parte de sistemas de sinalização aparentemente distintos, essas duas substâncias interagem entre si para regular a neurogênese e plasticidade sináptica, sobretudo de circuitos neurais envolvidos em transtornos de humor, como depressão e ansiedade (MARTINOWICH & LU, 2008).

Tanto em modelos animais quanto em polimorfismos humanos, que estão associados com aumento da concentração extracelular de 5-HT, ocorre redução da expressão do RNAm que codifica precursores do BDNF (HOMBERG, et al., 2014). Em nosso trabalho, verificamos redução dos níveis de BDNF no hipocampo em todos os protocolos relacionados com aumento da neurotransmissão serotonérgica. Embora esses dados sejam opostos aos resultados obtidos com o tratamento crônico com ISRS na fase adulta, não podemos deixar de considerar que a modulação recíproca entre essas duas moléculas envolve diferentes fatores de transcrição durante a fase de desenvolvimento, tais como: Arnt2, CaRF, CREB, NFkB e, especialmente, o Npas4 (GUIDOTTI et al., 2012; LUONI et al., 2013). Em modelos animais com deleção de SERT, a expressão de Npas4 se encontra reduzida, o que pode representar um dos mecanismos através dos quais o aumento da neurotransmissão serotonérgica promove transcrição deficiente de BDNF (GUIDOTTI et al., 2012). Por outro lado, apesar do tratamento neonatal com p-CPA em nosso trabalho não ter afetado a expressão de BDNF, foi demonstrado recentemente que a depleção constitutiva de 5-HT através da inativação gênica da Tph2

está associada às anormalidades na formação de circuitos serotoninérgicos no hipocampo ventral, caracterizada por supra-regulação gênica do BDNF a partir de 10 DPN (MIGLIARINI et al., 2013).

Considerando que os efeitos do 5-HT dependem da sua interação com seus diferentes receptores, a investigação de animais com anormalidades genéticas dos receptores seletivos para 5-HT pode ser uma útil ferramenta para estabelecer como essa amina biogênica modula a ação do BDNF. Indubitavelmente, os receptores da família 5-HT1 são um dos mais importantes nessa modulação. Vale destacar que camundongos com deleção do receptor 5-HT1a apresentam redução da expressão proteica de BDNF na parte ventral do hipocampo, bem como uma menor fosforilação do receptor TrKB. (WU et al., 2012). Efeitos semelhantes, embora menos acentuados, foram observados em animais com deleção do receptor 5-HT1b (SIBILLE et al., 2007). Não obstante, em cultivo de neurônios serotoninérgicos da rafe mesencefálica, a suplementação do meio com 5-HT aumenta a expressão gênica do BDNF e do número de células que expressam marcadores serotoninérgicos de uma maneira dose-dependente. Esse efeito foi farmacologicamente comprovado ser mediado pelo receptor 5-HT1a e pela ativação do receptor TRKB (GALTER & UNSICKER, 2000). Também *in vitro*, foi verificado que 18 horas de exposição do meio ao BDNF foi suficiente para quase dobrar o número de neurônios serotoninérgicos e o crescimento axonal. Esse efeito marcante foi associado com aumento da expressão dos genes que codificam TPH2, SERT e os receptores 5-HT1a (RUMAJOGEE et al., 2002).

Levando em consideração esses estudos citados anteriormente, podemos sugerir a existência de uma alça de modulação autócrina ou parácrina para caracterização do fenótipo serotoninérgico, também mediado pelo BDNF. Nesse caso, a ativação dos receptores 5-HT1a pela 5-HT promoveria o aumento da síntese de BDNF e, por conseguinte, a ativação do TRKB, o que por sua vez, possibilitaria a maturação do fenótipo serotoninérgico. Essa hipótese, juntamente com a infra-regulação do Pet1a e Lmx1b, poderia ajudar a entender as diferenças transcricionais observadas em nosso estudo.

Os dados expostos aqui também levantam algumas questões relevantes a respeito dos mecanismos pelos quais flutuações dos níveis de 5-HT são capazes de modular *per se* a expressão dos genes relacionados com o funcionamento da sua própria neurotransmissão. Além disso, não sabemos porque, pelo menos durante o período perinatal, esses mecanismos parecem ser mais preponderantes nos terminais sinápticos do que na região somatodendrítica. Muito provavelmente, essa diferença pode estar relacionada à diferença de distribuição celular e anatômica de auto e heterorreceptores 5-HT1a, bem como pela ação da 5-HT em outros tipos de subfamílias de receptores.

Um outro ponto relevante é a semelhança do perfil transcricional entre agonistas e antagonistas 5-HT1a. Conjecturamos fortemente que o tratamento crônico com 8-OH-DPAT promova dessensibilização dos receptores 5-HT1a. Assim, esse efeito exacerbaria a neurotransmissão serotoninérgica de forma bem semelhante ao observado com o bloqueio farmacológico desses receptores ou com a administração de ISRS.

6.2 Avaliação Psicobiológica.

Há relativamente poucos trabalhos que abordam os efeitos de manipulações farmacológicas do sistema serotoninérgico no período pós-natal. Devido a relevância clínica e translacional, a maioria dos dados contidos na literatura estão basicamente relacionadas com abordagens ainda no período pré-natal através do tratamento materno. Embora esse período seja importante morfológicamente, acreditamos que a janela de tratamento pós-natal tenha maior relevância fisiológica, sobretudo do ponto de vista neurocomportamental.

Durante as primeiras duas semanas após o parto, o cérebro apresenta elevada plasticidade. Partindo dessa premissa, alterações na biodisponibilidade de neurotransmissores podem promover comprometimento no desenvolvimento do SNC e, por conseguinte, predispor mudanças comportamentais na idade adulta (KEPSEK & HOMBERG, 2015). O período entre o DPN 0 e 14 representa o estágio inicial do terceiro trimestre de gestação em humanos. Durante esse intervalo, o sistema somatossensorial começa a se desenvolver. Por essa razão, as manipulações farmacológicas nessa fase causam deficiências sensoriais severas, caracterizadas por déficits da sensibilidade tátil e dolorosa, além de redução da coordenação motora (BHANJA & MOHANAKUMAR, 2010; MICELI et al., 2013). Já o período entre DPN 7 e 20 em roedores corresponde aproximadamente aos estágios tardios do desenvolvimento do fetal e aos primeiros dois a três anos de vida em humanos. Nessa fase, ocorre crescimento da massa cerebral, bem como na maturação da neurotransmissão monoaminérgica. Além disso, ocorre o processo normal de diferenciação sexual (MACIAG & COPPINGER, 2006; HANSSON et al., 1998).

Em geral, os fármacos mais utilizados em manipulações do sistema serotoninérgico durante o período pós-natal são os ISRS. De acordo com Sarkar e colaboradores, o tratamento com fluoxetina do 2º ao 21º DPN promove comportamento ansiogênico no teste do campo aberto e no labirinto em cruz elevado, bem como aumento do comportamento semelhante à depressão no teste da natação forçada. Todavia, tais alterações foram totalmente revertidas com ketanserina, um antagonista seletivo do receptor 5-HT_{2a} (SARKAR et al., 2014). De maneira semelhante, Ansorge e colegas trataram filhotes de camundongos com citalopram, clomipramina e fluoxetina do DPN 4 ao 21. Eles observaram que esses animais também tiveram aumento do comportamento semelhante à ansiedade em diferentes paradigmas experimentais na fase adulta (ANSORGE et al., 2008). No entanto, Karpova e colaboradores obtiveram resultados distintos dos demais autores supracitados. Além de não verificarem diferenças quanto ao comportamento de ansiedade, esse grupo ainda demonstrou que o tratamento neonatal com fluoxetina causou efeito antidepressivo em camundongos adultos, sendo que esse padrão comportamental foi revertido pelo próprio tratamento com fluoxetina na fase adulta (KARPOVA et al., 2009). Nesse nosso trabalho, tanto na programação com fluoxetina quanto na com d-fenfluramina, observamos efeitos ansiogênico e antidepressivo na fase adulta, o que converge parcialmente com os dados relatados em outros trabalhos. Ambos os protocolos cursam com aumento da neurotransmissão serotoninérgica, o que indica que o excesso de 5-HT nesse período, é prejudicial, pois pode afetar circuitos neurais envolvidos com comportamentos afetivos.

Naturalmente, essas observações levantaram uma simples dúvida sobre quais seriam os efeitos da depleção serotoninérgica durante o período perinatal na expressão dos comportamentos afetivos na fase adulta. De acordo com os nossos resultados, o

tratamento com p-CPA apresentam alterações no comportamento de ansiedade, caracterizados por redução na caixa claro-escuro e aumento no campo aberto. Além disso, foi observado um maior comportamento análogo à depressão no teste de suspensão pela cauda. Dessa forma, pelo menos em relação à depressão, a inibição enzimática da TPH2 apresenta efeitos opostos aos observados nos tratamentos que acentuam a neurotransmissão serotoninérgica. Em relação a outros trabalhos presentes na literatura, o mais semelhante com a nossa abordagem foi realizado por Bortolato e sua equipe. Eles mostraram que o tratamento de camundongos do DPN 1 ao7 com p-CPA 300 mg/kg não somente reduziu pela metade os níveis de 5-HT no encéfalo, mas também a causa de neofobia e aumento de agressividade. No entanto, não foram verificadas diferenças significativas no teste do campo aberto e labirinto em cruz elevado (BORTOLATO et al., 2013). Levando em consideração esses resultados e os do nosso estudo, nos questionamos se o tratamento com p-CPA é o melhor modelo para estudar depleção serotoninérgica. Talvez, a associação desse tratamento com a restrição dietética de triptofano seja uma estratégia ainda mais eficiente e de maior relevância translacional.

Em relação às manipulações farmacológicas dos receptores 5-HT_{1a} durante o período neonatal, verificamos que o tratamento com WAY 100135 e 8-OH-DPAT nesse período promovem alterações no comportamento de ansiedade e depressão. Embora o padrão de expressão gênica nos dois tratamentos seja bem semelhante, o perfil comportamental foi bem distinto.

Nossos dados apresentam forte consonância com o estudo de Vinkers e colaboradores. Nesse trabalho, também foi verificado que o bloqueio farmacológico dos receptores 5-HT_{1a} durante o período pós-natal promove efeitos ansiogênicos duradouros. Esse perfil comportamental é bem semelhante aos observados em animais com deleção desse receptor (VINKERS et al., 2010). Não obstante, um outro elegante trabalho publicado por Gross e sua equipe evidencia o papel dos receptores 5-HT_{1a} na expressão de comportamentos afetivos. Esse grupo provou que o silenciamento desse receptor no período perinatal promove aumento da ansiedade na fase adulta, também de forma muito semelhante ao observado em animais com deleção gênica para o receptor 5-HT_{1a}. Curiosamente, a mesma técnica de silenciamento realizado na fase adulta não foi capaz de alterar o perfil comportamental dos animais quando comparados ao grupo controle (GROSS et al., 2002).

A fim de explicar as alterações comportamentais obtidas em nosso trabalho, temos duas hipóteses não mutuamente excludentes. Enquanto a primeira envolve a modulação da 5-HT no sistema gabaérgico, a segunda está relacionada com o papel dessa amina biogênica no desenvolvimento de circuitos neurais responsáveis pelos comportamentos afetivos.

Para explicar o primeiro ponto, devemos ressaltar novamente que animais com deleção para SERT apresentam infra-regulação tanto para BDNF quanto para o fator de transcrição Npas (GUIDOTTI et al., 2012). Ambas moléculas estão envolvidas no desenvolvimento e maturação do sistema gabaérgico em regiões hipocampusais e no córtex pré-frontal (LIN et al., 2008; SAKATA et al., 2009). Partindo de tais premissas, animais com deleção para SERT também apresentam alterações importantes do sistema gabaérgico, caracterizadas pela redução da expressão de importantes genes relacionados com esse sistema, tais como: Vgat, Gad 67, subunidades $\gamma 2$ do receptor GABAA, bem como de proteínas de ligação ao cálcio específicas de subgrupos de neurônios

gabérgicos (GUIDOTTI et al., 2012). O bloqueio do receptor 5-HT_{1a} durante o período perinatal aumenta a expressão das subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ do receptor GABAA sobretudo no córtex pré-frontal (VINKERS et al., 2010). Nesse sentido, alterações do sistema gabaérgico em regiões límbicas e corticais em animais com disfunções da neurotransmissão serotoninérgica poderiam contribuir para a expressão do perfil comportamental observado nesses modelos.

Quanto a nossa segunda hipótese, é bem conhecido que uma grande parte dos efeitos da 5-HT no desenvolvimento ocorrem durante períodos críticos da vida pós-natal, em que os mecanismos dependentes da atividade serotoninérgica modelam os circuitos neurais. Isto foi demonstrado pela primeira vez em circuitos somatossensoriais. Entretanto, mais recentemente, esse conceito foi ampliado aos circuitos de serotoninérgicos na rafe e em regiões corticais (TEISSIER et al., 2017). Vale ressaltar que os heterorreceptores 5-HT_{1a} são abundantemente expressos nessa região em pelo menos duas populações neuronais antagônicas: neurônios piramidais excitatórios e interneurônios inibitórios (SANTANA et al., 2004). Partindo desse pressuposto, alguns modelos de circuitos que destacam tais grupamentos neuronais são propostos para explicar os efeitos ansiogênicos e antidepressivos causados pela exacerbação da neurotransmissão serotoninérgica. Segundo Albert e colaboradores, modelos animais em que os níveis de 5-HT encontram-se aumentados, a inibição mediada pelo receptor 5-HT_{1A} é mais intensa nos interneurônios do que nos neurônios piramidais. Por conseguinte, ocorre uma hiperativação da atividade neuronal piramidal, resultando em ativação excessiva dos circuitos envolvidos com a resposta de ansiedade (Holmes, 2008). Por outro lado, a ativação desses neurônios piramidais está relacionada com efeitos antidepressivos. Além disso, em situações em que há níveis elevados de 5-HT, outros receptores são recrutados, como o 5-HT_{2a}, para ativar os neurônios piramidais e inativar a sinalização inibitória evocada pelo receptor 5-HT_{1a} (ALBERT et al., 2014). Dessa forma, acreditamos que alterações na transmissão serotoninérgica durante o período perinatal podem alterar os circuitos de ansiedade e depressão modulado por esses dois grupos neuronais, que também se encontram no hipocampo e amígdala. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos regulatórios envolvidos.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

- A extrusão de 5-HT durante o período neonatal através do tratamento com d-fenfluramina reduz a expressão mesencefálica dos genes 5-HT1a, SERT, BDNF e Pet1a, bem como a expressão de TPH2 e BDNF no hipocampo. Dessa forma, acreditamos que esse tratamento afeta o desenvolvimento ontogênico de sistemas cerebrais envolvidos com respostas afetivas, promovendo ansiogênese e comportamento antidepressivo na fase adulta.
- A inibição da recaptação de 5-HT durante o período neonatal através do tratamento com fluoxetina aumenta a expressão gênica de TPH2 no mesencéfalo, mas diminui a expressão de TPH2, 5HT1a, SERT, BDNF e Lmx1b no hipocampo. Dessa forma, acreditamos que esse tratamento afeta o desenvolvimento ontogênico de sistemas cerebrais envolvidos com respostas afetivas, promovendo ansiogênese e comportamento antidepressivo na fase adulta.
- A inibição irreversível da TPH2 durante o período neonatal através do tratamento com p-CPA aumenta a expressão gênica de 5-HT1a no mesencéfalo. Dessa forma, acreditamos que esse tratamento afeta o desenvolvimento ontogênico de sistemas cerebrais envolvidos com respostas afetivas, promovendo ansiólise e aumento do comportamento semelhante à depressão na fase adulta.
- A ativação dos receptores 5-HT1a durante o período neonatal através do tratamento com 8-OH-DPAT aumenta a expressão gênica da TPH2 e do próprio receptor 5-HT1a no mesencéfalo, mas reduz a expressão hipocampal de TPH2, 5HT1a, SERT, BDNF e Lmx1b. Dessa forma, acreditamos que esse tratamento afeta o desenvolvimento ontogênico de sistemas cerebrais envolvidos com respostas afetivas, promovendo ansiólise e comportamento antidepressivo na fase adulta.
- O bloqueio dos receptores 5-HT1a durante o período neonatal através do tratamento com WAY 100135 aumenta a expressão mesencefálica de TPH2, do próprio receptor 5-HT1a e do SERT, mas reduz a expressão gênica de TPH2, 5HT1a, SERT, BDNF e Lmx1b no hipocampo. Dessa forma, acreditamos que esse tratamento afeta o desenvolvimento ontogênico de sistemas cerebrais envolvidos com respostas afetivas, promovendo ansiogênese e aumento do comportamento semelhante à depressão na fase adulta.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAJANIAN, G. K.; KUHAR, M. J.; ROTH, R. H. Serotonin-containing neuronal perikarya and terminals: differential effects of p-chlorophenylalanine. **Brain Research**, v. 54, p. 85-101, 1973.

ALBERT, Paul R.; VAHID-ANSARI, Faranak; LUCKHART, Christine. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, 2014.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION et al. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)**. American Psychiatric Pub, 2013.

ANSORGE, Mark S.; MORELLI, Emanuela; GINGRICH, Jay A. Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 199-207, 2008.

ARCHER, John. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ASEGAWA, H.; NAKAMURA, K. Tryptophan Hydroxylase and Serotonin Synthesis Regulation. v. 21, p. 183-202. In: MULLER, C. P.; JACOBS, B. (Ed.). **Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin**. Burlington, MA: Academic Press, 2010.

AZMITIA, Efrain C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain research bulletin**, v. 56, n. 5, p. 413-424, 2001.

AZMITIA, Efrain C.; MCEWEN, Bruce S. Adrenalcortical influence on rat brain tryptophan hydroxylase activity. **Brain research**, v. 78, n. 2, p. 291-302, 1974.

BALE, Tracy L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 332-344, 2015.

BANERJEE, Tania Das; MIDDLETON, Frank; FARAONE, Stephen V. Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. **Acta paediatrica**, v. 96, n. 9, p. 1269-1274, 2007.

BARKER, David JP. The origins of the developmental origins theory. **Journal of internal medicine**, v. 261, n. 5, p. 412-417, 2007.

BAYLISS, L. E.; OGDEN, E. " Vasotonins" and the Pump-Oxygenator-Kidney Preparation. **J. Physiol**, v. 77, p. 34, 1932.

BECK, Sheryl G. et al. Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. **Journal of Neurophysiology**, v. 91, n. 2, p. 994-1005, 2004.

BEESDO-BAUM, Katja; KNAPPE, Susanne. Developmental epidemiology of anxiety disorders. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics**, v. 21, n. 3, p. 457-478, 2012.

BELMAKER, R. H.; AGAM, Galila. Major depressive disorder. **N Engl j Med**, v. 2008, n. 358, p. 55-68, 2008.

BHANJA, Shravani; MOHANAKUMAR, Kochupurackal P. Early-life treatment of antiserotonin antibodies alters sensitivity to serotonin receptors, nociceptive stimulus and serotonin metabolism in adult rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 4, p. 317-324, 2010.

BOCKAERT, Joël et al. Classification and Signaling Characteristics of 5-HT Receptors. **Handbook of Behavioral Neuroscience**, v. 21, p. 103-121, 2010.

BORTOLATO, M.; CHEN, K.; SHIH, J. C. The Degradation of Serotonin: Role of MAO. v. 21, p. 203-218. MULLER, C. P.; JACOBS, B. (Ed.). **Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin**. Burlington, MA: Academic Press, 2010.

BORTOLATO, Marco et al. Early postnatal inhibition of serotonin synthesis results in long-term reductions of perseverative behaviors, but not aggression, in MAO A-deficient mice. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 223-232, 2013.

BORTOLATO, Marco; SHIH, Jean C. Behavioral outcomes of monoamine oxidase deficiency: preclinical and clinical evidence. **International review of neurobiology**, v. 100, p. 13, 2011.

BRANCHEREAU, Pascal; CHAPRON, Jacqueline; MEYRAND, Pierre. Descending 5-hydroxytryptamine raphe inputs repress the expression of serotonergic neurons and slow the maturation of inhibitory systems in mouse embryonic spinal cord. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 2598-2606, 2002.

BRESLAU, Naomi; CHILCOAT, Howard D. Psychiatric sequelae of low birth weight at 11 years of age. **Biological psychiatry**, v. 47, n. 11, p. 1005-1011, 2000.

BRISCOE, J. et al. Homeobox gene Nkx2. 2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. **Nature**, v. 398, n. 6728, p. 622, 1999.

BURROWS, Emma L.; MCOMISH, Caitlin E.; HANNAN, Anthony J. Gene–environment interactions and construct validity in preclinical models of psychiatric disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1376-1382, 2011.

BUSS, Claudia et al. Maternal care modulates the relationship between prenatal risk and hippocampal volume in women but not in men. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 10, p. 2592-2595, 2007.

CANSEV, M.; WURTMAN, R. Aromatic amino acids in the brain. v. 4, p. 59-97. Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology. LAJTHA, Abel; SARANSAARI, Pirjo; SCHOUSBOE, Arne (Ed.). **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Amino Acids and Peptides in the Nervous System**. Springer Science & Business Media, 2007.

CASPI, Avshalom et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 386-389, 2003.

CAVALCANTE, Taisy Cinthia Ferro et al. Effects of perinatal protein malnutrition and fenfluramine action on food intake and neuronal activation in the hypothalamus and raphe nuclei of neonate rats. **Physiology & behavior**, v. 165, p. 35-42, 2016.

CRASKE, Michelle et al. Anxiety disorders. **Nature Reviews Disease Primers**, v.3, n. 17024, p. 1-18, 2017.

CRAWLEY, Jacqueline; GOODWIN, Frederick K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167-170, 1980.

DAHLSTRÖM, Annica; FUXE, Kjell. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum**, p. SUPPL 232: 1-55, 1963.

DAI, Jin-Xia et al. Enhanced contextual fear memory in central serotonin-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 33, p. 11981-11986, 2008.

DAI, Jin-Xia; JOHNSON, Randy L.; DING, Yu-Qiang. Manifold functions of the Nail-Patella Syndrome gene *Lmx1b* in vertebrate development. **Development, growth & differentiation**, v. 51, n. 3, p. 241-250, 2009.

DAWS, Lynette C. Unfaithful neurotransmitter transporters: focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 121, n. 1, p. 89-99, 2009.

DE VITRY, F. et al. Serotonin initiates and autoamplifies its own synthesis during mouse central nervous system development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 22, p. 8629-8633, 1986.

DEL PORTO, José Alberto. Conceito e diagnóstico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 06-11, 1999.

DUMAN, Elif A.; CANLI, Turhan. Influence of life stress, 5-HTTLPR genotype, and SLC6A4 methylation on gene expression and stress response in healthy Caucasian males. **Biology of mood & anxiety disorders**, v. 5, n. 1, p. 2, 2015.

DUVAL, Elizabeth R.; JAVANBAKHT, Arash; LIBERZON, Israel. Neural circuits in anxiety and stress disorders: a focused review. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 11, p. 115, 2015.

EGASHIRA, Nobuaki et al. Investigation of mechanisms mediating 8-OH-DPAT-induced impairment of spatial memory: involvement of 5-HT 1A receptors in the dorsal hippocampus in rats. **Brain research**, v. 1069, n. 1, p. 54-62, 2006.

ERSPAMER, Vittorio; ASERO, Biagio. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. **Nature**, v. 169, n. 4306, p. 800-801, 1952.

ETKIN, Amit; BÜCHEL, Christian; GROSS, James J. The neural bases of emotion regulation. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 693, 2015.

FYODOROV, Dmitry; NELSON, Tom; DENNERIS, Evan. Pet-1, a novel ETS domain factor that can activate neuronal nAChR gene transcription. **Journal of neurobiology**, v. 34, n. 2, p. 151-163, 1998.

GALINDO, Lgia Cristina Monteiro et al. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 46, p. 76-81, 2015.

GALTER, Dagmar; UNSICKER, Klaus. Sequential activation of the 5-HT1 A serotonin receptor and TrkB induces the serotonergic neuronal phenotype. **Molecular and cellular neuroscience**, v. 15, n. 5, p. 446-455, 2000.

GASPAR, Patricia; CASES, Olivier; MAROTEAUX, Luc. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 12, p. 1002, 2003.

GORIDIS, Christo; ROHRER, Hermann. Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 7, p. 531, 2002.

GRAEFF, Frederico Guilherme; GUIMARÃES, Francisco Silveira. **Fundamentos de psicofarmacologia**. Atheneu, 2000.

GREEN, A. Richard; GRAHAME-SMITH, David G. 5-Hydroxytryptamine and other indoles in the central nervous system. v.3, p. 169-245. In: **Biochemistry of Biogenic Amines**. Springer US, 2013.

GROSS, Cornelius et al. Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. **Nature**, v. 416, n. 6879, p. 396-400, 2002.

GROSS, Cornelius; HEN, Rene. The developmental origins of anxiety. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 545, 2004.

GUIDOTTI, Gianluigi et al. Developmental influence of the serotonin transporter on the expression of npas4 and GABAergic markers: modulation by antidepressant treatment. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 3, p. 746, 2012.

HANSSON, S. R.; MEZEY, E.; HOFFMAN, B. J. Serotonin transporter messenger RNA in the developing rat brain: early expression in serotonergic neurons and transient expression in non-serotonergic neurons. **Neuroscience**, v. 83, n. 4, p. 1185-1201, 1998.

HARIRI, Ahmad R.; HOLMES, Andrew. Finding translation in stress research. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1347-1352, 2015.

HARSING, L. G. The pharmacology of the neurochemical transmission in the midbrain raphe nuclei of the rat. **Current neuropharmacology**, v. 4, n. 4, p. 313-339, 2006.

HARTVIG, P. et al. Pyridoxine effect on synthesis rate of serotonin in the monkey brain measured with positron emission tomography. **Journal of neural transmission**, v. 102, n. 2, p. 91-97, 1995.

HASEGAWA, Hiroyuki; ICHIYAMA, Arata. Distinctive iron requirement of tryptophan 5-monooxygenase: TPH1 requires dissociable ferrous iron. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 338, n. 1, p. 277-284, 2005.

HENDRICKS, Timothy et al. The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central serotonin neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 23, p. 10348-10356, 1999.

HENDRICKS, Timothy J. et al. Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. **Neuron**, v. 37, n. 2, p. 233-247, 2003.

HENSLER, J. G; . Serotonin, p. 227-248, 2006. In: Siegal, G. J; Albers, R. W.; Brady, S. T. et al. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (7th ed.). Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 2006.

HENSLER, Julie G. .5-Serotonin in Mood and Emotion. v. 21, p. 367-378. In: MULLER, C. P.; JACOBS, B. (Ed.). **Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin**. Burlington, MA: Academic Press, 2010.

HOLMES, Andrew; MURPHY, Dennis L.; CRAWLEY, Jacqueline N. Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression. **Biological psychiatry**, v. 54, n. 10, p. 953-959, 2003.

HOMBERG, Judith Regina et al. The serotonin–BDNF duo: developmental implications for the vulnerability to psychopathology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 43, p. 35-47, 2014.

HORNUNG, Jean-Pierre. The human raphe nuclei and the serotonergic system. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 26, n. 4, p. 331-343, 2003.

ISSARI, Yasmin et al. Early onset of response with selective serotonin reuptake inhibitors in obsessive-compulsive disorder: a meta-analysis. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 77, n. 5, p. e605-11, 2016.

JACOBS, Barry L.; AZMITIA, Efrain C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiological reviews**, v. 72, n. 1, p. 165-229, 1992..

JANEWAY, Theodore C.; PARK, Edwards A. The question of epinephrin in the circulation and its relation to blood pressure. **Journal of Experimental Medicine**, v. 16, n. 4, p. 541-557, 1912.

KAPCZINSKI, Flávio et al. Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos. **2ª Edição. Editota Artmed. São Paulo**, 2000.

KARPOVA, Nina N. et al. Long-lasting behavioural and molecular alterations induced by early postnatal fluoxetine exposure are restored by chronic fluoxetine treatment in adult mice. **European neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 2, p. 97-108, 2009.

KATO, Masaki et al. Effect of 5-HT1A gene polymorphisms on antidepressant response in major depressive disorder. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 150, n. 1, p. 115-123, 2009.

KAUFMAN, Joshua et al. The 5-HT 1A receptor in major depressive disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 397-410, 2016.

KEPPEL HESSELINK, J. M.: The history of serotonin, part 1. In *Serotonin 1A receptors in depression and anxiety*. Edited by SM Stahl, Raven Press, New York, 1992; 25–29.

KEPSEK, Lara-Jane; HOMBERG, Judith R. The neurodevelopmental effects of serotonin: a behavioural perspective. **Behavioural brain research**, v. 277, p. 3-13, 2015.

KIM, Ji-Young et al. Postnatal maintenance of the 5-Ht1a-Pet1 autoregulatory loop by serotonin in the raphe nuclei of the brainstem. **Molecular brain**, v. 7, n. 1, p. 48, 2014.

KRIEGEBAUM, Claudia B. et al. The expression of the transcription factor FEV in adult human brain and its association with affective disorders. **Journal of neural transmission**, v. 117, n. 7, p. 831-836, 2010.

KUHN, Donald M. et al. Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase 2: identification of serine-19 as the substrate site for calcium, calmodulin-dependent protein kinase II. **Journal of neurochemistry**, v. 103, n. 4, p. 1567-1573, 2007.

KUHN, Donald M.; ARTHUR, Robert E. Inactivation of tryptophan hydroxylase by nitric oxide: enhancement by tetrahydrobiopterin. **Journal of neurochemistry**, v. 68, n. 4, p. 1495-1502, 1997.

KUHN, Donald M.; ARTHUR, Robert; STATES, J. Christopher. Phosphorylation and Activation of Brain Tryptophan Hydroxylase: Identification of Serine-58 as a Substrate Site for Protein Kinase A. **Journal of neurochemistry**, v. 68, n. 5, p. 2220-2223, 1997.

LAWAL, Hakeem O.; KRANTZ, David E. SLC18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 2, p. 360-372, 2013.

LEITE, J. R.; SIQUEIRA, J. S. Métodos para avaliar drogas ansiolíticas. In: ALMEIDA, Reinaldo Nóbrega de. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p. 154-160, 2006.

LESCH, Klaus-Peter et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. **Science**, v. 274, n. 5292, p. 1527-1531, 1996.

LEVITT, Pat; RAKIC, Pasko. The time of genesis, embryonic origin and differentiation of the brain stem monoamine neurons in the rhesus monkey. **Developmental Brain Research**, v. 4, n. 1, p. 35-57, 1982.

LIDOV, Hart GW; MOLLIVER, Mark E. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. **Brain research bulletin**, v. 8, n. 4, p. 389-430, 1982.

LIEB, Roselind et al. Parental major depression and the risk of depression and other mental disorders in offspring: a prospective-longitudinal community study. **Archives of general psychiatry**, v. 59, n. 4, p. 365-374, 2002.

LIN, Yingxi et al. Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4. **Nature**, v. 455, n. 7217, p. 1198, 2008.

LIU, Chen et al. Pet-1 is required across different stages of life to regulate serotonergic function. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1190-1198, 2010.

- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LUCAS, Guillaume; DEBONNEL, Guy. 5-HT₄ receptors exert a frequency-related facilitatory control on dorsal raphe nucleus 5-HT neuronal activity. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 817-822, 2002.
- LUDWIG, C.; SCHMIDT, A. Arb. ad physiolog. **Anstalt z. Leipzig**, v. 3, n. 1, 1868.
- LUONI, Alessia et al. Behavioural and neuroplastic properties of chronic lurasidone treatment in serotonin transporter knockout rats. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 6, p. 1319-1330, 2013.
- MACIAG, Dorota; COPPINGER, David; PAUL, Ian A. Evidence that the deficit in sexual behavior in adult rats neonatally exposed to citalopram is a consequence of 5-HT₁ receptor stimulation during development. **Brain research**, v. 1125, n. 1, p. 171-175, 2006.
- MAEJIMA, Takashi et al. Modulation of firing and synaptic transmission of serotonergic neurons by intrinsic G protein-coupled receptors and ion channels. **Frontiers in integrative neuroscience**, v. 7, 2013.
- MALAGIÉ, Isabelle et al. Effects of acute fluoxetine on extracellular serotonin levels in the raphe: an in vivo microdialysis study. **European journal of pharmacology**, v. 286, n. 2, p. 213-217, 1995.
- MARRAZZI, Amedeo S.; HART, E. Ross. Relationship of hallucinogens to adrenergic cerebral neurohumors. **Science**, v. 121, n. 3141, p. 365-367, 1955.
- MARTINOWICH, Keri; LU, Bai. Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 73, 2008.
- MASSEY, Caitlin A. et al. Development of brainstem 5-HT_{1A} receptor-binding sites in serotonin-deficient mice. **Journal of neurochemistry**, v. 126, n. 6, p. 749-757, 2013.
- MAXIMINO, Caio. Serotonin in the nervous system of vertebrate. v.1, p. 15-36. In: **Serotonin and Anxiety**. Springer New York, 2012.
- MAYER, L. E.; WALSH, B. Timothy. The use of selective serotonin reuptake inhibitors in eating disorders. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 59, p. 28-34, 1997.
- MCDEVITT, Ross A.; NEUMAIER, John F. Regulation of dorsal raphe nucleus function by serotonin autoreceptors: a behavioral perspective. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 41, n. 4, p. 234-246, 2011.
- MCILWAIN, Kellie L. et al. The use of behavioral test batteries: effects of training history. **Physiology & behavior**, v. 73, n. 5, p. 705-717, 2001.
- MCLEAN, Carmen P. et al. Gender differences in anxiety disorders: prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. **Journal of psychiatric research**, v. 45, n. 8, p. 1027-1035, 2011.

MICELI, Stéphanie et al. High serotonin levels during brain development alter the structural input-output connectivity of neural networks in the rat somatosensory layer IV. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, 2013.

MIGLIARINI, S. et al. Lack of brain serotonin affects postnatal development and serotonergic neuronal circuitry formation. **Molecular psychiatry**, v. 18, n. 10, p. 1106, 2013.

MIKICS, Éva et al. Behavioral specificity of non-genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Hormones and behavior**, v. 48, n. 2, p. 152-162, 2005.

MILLER, J.R. AND EDMONDSON, D.E. Influence of flavin analogue structure on the catalytic activities and flavinylation reactions of recombinant human liver monoamine oxidases A and B. *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 23515 – 23525, 1999.

MIWA, Soichi; WATANABE, Yasuyoshi; HAYAISHI, Osamu. 6R-L-erythro-5, 6, 7, 8-tetrahydrobiopterin as a regulator of dopamine and serotonin biosynthesis in the rat brain. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 239, n. 1, p. 234-241, 1985.

MOLENDIJK, M. L. et al. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N= 9484). **Molecular psychiatry**, v. 19, n. 7, p. 791, 2014.

NAGATSU, Toshiharu. Progress in monoamine oxidase (MAO) research in relation to genetic engineering. **Neurotoxicology**, v. 25, n. 1, p. 11-20, 2004.

NEMEROFF, Charles B. Anxiolytics: past, present, and future agents. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 64, p. 3-6, 2002.

O'DONNELL, Kieran J.; MEANEY, Michael J. Fetal origins of mental health: The developmental origins of health and disease hypothesis. **American Journal of Psychiatry**, v. 174, n. 4, p. 319-328, 2016.

O'CONNOR, J. M. Über den adrenalinhalt des Blutes. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 195-232, 1912.

OGAWA, Tetsuo et al. para-Chlorophenylalanine induces lenticular opacities by prenatal, neonatal, and juvenile treatments, but not by adult treatment, in rats. **Neurotoxicology and teratology**, v. 21, n. 4, p. 473-477, 1999.

OSBORNE-MAJNIK, Amber; FU, Qi; LANE, Robert H. Epigenetic mechanisms in fetal origins of health and disease. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 56, n. 3, p. 622, 2013.

OSMOND, Clive; BARKER, D. J. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. **Environmental health perspectives**, v. 108, n. Suppl 3, p. 545, 2000.

OTTE, Christian et al. Major depressive disorder. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, p. 16065-16065, 2016.

- PARDRIDGE, W. Mo. Kinetics of Competitive Inhibition of Neutral Amino Acid Transport Across the Blood-Brain Barrier. **Journal of neurochemistry**, v. 28, n. 1, p. 103-108, 1977.
- PELLOW, Sharon et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.
- PORSOLT, R.D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, 1977.
- PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1, p. 3-33, 2003.
- PYTIAK, Marek et al. Serotonin receptors-from molecular biology to clinical applications. **Physiological Research**, v. 60, n. 1, p. 15, 2011.
- RAHMAN, Mohammed Khalilur; TOSHIHARU, Nagatsu; TAKESHI, Kato. Aromatic L-amino acid decarboxylase activity in central and peripheral tissues and serum of rats with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates. **Biochemical pharmacology**, v. 30, n. 6, p. 645-649, 1981.
- RANG, Rang et al. **Rang & Dale Farmacologia**. Elsevier Brasil, 2015.
- RAPPORT, M.M.; GREEN, A.A; PAGE, I. H. Crystalline serotonin. **Science**, v. 108, n. 2804, p. 329-330, 1948.
- RAZNAHAN, Armin et al. Prenatal growth in humans and postnatal brain maturation into late adolescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 28, p. 11366-11371, 2012.
- REINHOLD, Jennifer A.; RICKELS, Karl. Pharmacological treatment for generalized anxiety disorder in adults: an update. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 16, n. 11, p. 1669-1681, 2015.
- ROTH, Kevin A.; KATZ, Richard J. Stress, behavioral arousal, and open field activity—a reexamination of emotionality in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 3, n. 4, p. 247-263, 1980.
- RUDNICK, G. Structure/function relationships in serotonin transporter: new insights from the structure of a bacterial transporter. p. 59-73. In: **Neurotransmitter transporters**. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- RUMAJOGEE, Prakasham et al. Up-regulation of the neuronal serotonergic phenotype in vitro: BDNF and cAMP share Trk B-dependent mechanisms. **Journal of neurochemistry**, v. 83, n. 6, p. 1525-1528, 2002.
- RUSH, A. John et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR* D report. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 11, p. 1905-1917, 2006.

SAKATA, Kazuko et al. Critical role of promoter IV-driven BDNF transcription in GABAergic transmission and synaptic plasticity in the prefrontal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 14, p. 5942-5947, 2009.

SANCHEZ, Connie; REINES, Elin H.; MONTGOMERY, Stuart A. A comparative review of escitalopram, paroxetine, and sertraline: are they all alike?. **International clinical psychopharmacology**, v. 29, n. 4, p. 185, 2014.

SANDERS-BUSH, E.; BUSHING, J. A.; SULSER, F. Long-term effects of p-chloroamphetamine on tryptophan hydroxylase activity and on the levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindole acetic acid in brain. **European journal of pharmacology**, v. 20, n. 3, p. 385-388, 1972.

SANTANA, Noemí et al. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. **Cerebral cortex**, v. 14, n. 10, p. 1100-1109, 2004.

SARKAR, Ambalika; CHACHRA, Parul; VAIDYA, Vidita A. Postnatal Fluoxetine-Evoked Anxiety Is Prevented by Concomitant 5-HT 2A/C Receptor Blockade and Mimicked by Postnatal 5-HT 2A/C Receptor Stimulation. **Biological psychiatry**, v. 76, n. 11, p. 858-868, 2014.

SECO, Sandra; MATIAS, Alexandra. Origem fetal das doenças do adulto: revisitando a teoria de barker Fetal origins of adult disease: revisiting barkers theory. **Acta Obstet ginecol Port**, v. 3, n. 3, p. 158-168, 2009.

SHAW, E.; WOOLLEY, D. W. Pharmacological properties of some antimetabolites of serotonin having unusually high activity on isolated tissues. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 111, n. 1, p. 43-53, 1954.

SHIMADA-SUGIMOTO, Mihoko; OTOWA, Takeshi; HETTEMA, John M. Genetics of anxiety disorders: genetic epidemiological and molecular studies in humans. **Psychiatry and clinical neurosciences**, v. 69, n. 7, p. 388-401, 2015.

SIBILLE, E. et al. Lack of serotonin1B receptor expression leads to age-related motor dysfunction, early onset of brain molecular aging and reduced longevity. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 11, p. 1042, 2007.

SJOERDSMA, Albert; PALFREYMAN, Michael G. History of serotonin and serotonin disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 600, n. 1, p. 1-8, 1990.

SONG, Ning-Ning et al. Adult raphe-specific deletion of Lmx1b leads to central serotonin deficiency. **PLoS One**, v. 6, n. 1, p. e15998, 2011.

SPENCER, William C.; DENERIS, Evan S. Regulatory Mechanisms Controlling Maturation of Serotonin Neuron Identity and Function. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 11, 2017.

STEWART, G. N.; ZUCKER, T. F. A Comparison of the action of plasma and serum on certain objects used in biological tests for epinephrin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 17, n. 2, p. 152-173, 1913.

SUMI-ICHINOSE, Chiho et al. Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assignment of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase, the enzyme for

catecholamine and serotonin biosynthesis. **Biochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2229-2238, 1992.

TAMIR, Hadassah; GERSHON, Michael D. Serotonin-Storing Secretory Vesicles. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 600, n. 1, p. 53-67, 1990.

TAMIR, Hadassah; KLEIN, Athalia; RAPPORT, Maurice M. Serotonin binding protein: enhancement of binding by Fe²⁺ and inhibition of binding by drugs. *Journal of neurochemistry*, v. 26, n. 5, p. 871-878, 1976.

TEISSIER, Anne; SOIZA-REILLY, Mariano; GASPARD, Patricia. Refining the role of 5-HT in postnatal development of brain circuits. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, 2017.

THASE, Michael E. et al. Cognitive therapy versus medication in augmentation and switch strategies as second-step treatments: a STAR* D report. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, n. 5, p. 739-752, 2007.

TÖRK, Istvan. Anatomy of the serotonergic system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 600, n. 1, p. 9-34, 1990.

TURNER, Justin H. et al. 5-HT receptor signal transduction pathways. p. 143-206. In: ROTH, Bryan L. (Ed.). **The serotonin receptors: from molecular pharmacology to human therapeutics**. Springer Science & Business Media, 2008.

TWAROG, Betty M.; PAGE, Irvine H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. **American Journal of Physiology--Legacy Content**, v. 175, n. 1, p. 157-161, 1953.

VAN DER WEES, Jacqueline et al. GATA-3 is involved in the development of serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 12, p. 1-8, 1999.

VASWANI, Meera; LINDA, Farzana Kadar; RAMESH, Subramanyam. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. **Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 85-102, 2003.

VINKERS, Christiaan H. et al. Early-life blockade of 5-HT 1A receptors alters adult anxiety behavior and benzodiazepine sensitivity. **Biological psychiatry**, v. 67, n. 4, p. 309-316, 2010.

WALKER, Cheryl Lyn; HO, Shuk-mei. Developmental reprogramming of cancer susceptibility. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 7, 2012.

WALSH, Roger N.; CUMMINS, Robert A. The open-field test: A critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482, 1976.

WATERHOUSE, Barry D. et al. Topographical distribution of dorsal and median raphe neurons projecting to motor, sensorimotor, and visual cortical areas in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 249, n. 4, p. 460-476, 1986.

WHITAKER-AZMITIA, Patricia Mack. The discovery of serotonin and its role in neuroscience. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 2S-8S, 1999.

WOOLLEY, Dilworth W.; SHAW, E. A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 40, n. 4, p. 228-231, 1954.

World Health Organization. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/news/en/> (2017)..

Wu, H.F.; Chen, K.; Shih, J.C. Site-directed mutagenesis of monoamine oxidase A and B: role of cysteines. **Mol Pharmacol**, v. 43, p. 888–893, 1993.

WU, YeeWen Candace et al. Sex-specific and region-specific changes in BDNF–TrkB signalling in the hippocampus of 5-HT1A receptor and BDNF single and double mutant mice. **Brain research**, v. 1452, p. 10-17, 2012.

WYLER, Steven C. et al. Pet-1 switches transcriptional targets postnatally to regulate maturation of serotonin neuron excitability. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 5, p. 1758-1774, 2016.

YOUNG, Simon N. How to increase serotonin in the human brain without drugs. **Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN**, v. 32, n. 6, p. 394, 2007.

YU-QIANG, Ding et al. Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 933, 2003.

ZAHNISER, N. R., & DOOLEN, S.. Chronic and acute regulation of Na⁺/Cl⁻dependent neurotransmitter transporters: Drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. **Pharmacol Therapeutics**, v. 92, p. 21–55, 2001.

ZHAO, Zhong-Qiu et al. Lmx1b is required for maintenance of central serotonergic neurons and mice lacking central serotonergic system exhibit normal locomotor activity. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 49, p. 12781-12788, 2006.

ZHOU, Feng C. et al. Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. **Brain research**, v. 805, n. 1, p. 241-254, 1998.