

EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM INIBIDOR SELETIVO DE RECAPTURA DA 5-HT SOBRE O DESENVOLVIMENTO ANATÔMICO CRÂNIO-ENCEFÁLICO

Carolina Peixoto Magalhães¹, Luciene Oliveira de Lima², Matilde Cesiana da Silva², Sônia Maria Oliveira Cavalcanti Marinho³, Elizabeth do Nascimento⁴, Cristiano Mendes da Silva⁵, Sandra Lopes de Souza⁵, Raul Manhães-de-Castro⁶

RESUMO - Pesquisadas repercussões neonatais do tratamento crônico com inibidores seletivos de recaptura da serotonina (ISRS) sobre crescimento somático, do encéfalo e crânio. Ratos machos foram divididos em grupos: controle (NaCl) e Cit (10 µL/Kg citalopram 10 mg). Durante 21 dias pós-natais, foram aferidos peso corporal, eixo látero-lateral, ântero-posterior e circunferência do crânio. Aos 8, 15 e 22 dias pós-natais, os animais foram sacrificados para retirada do encéfalo para avaliar as medidas citadas acima. A utilização de ISRS provocou déficit de crescimento corporal, diminuição das medidas craniais e do encéfalo. O retardo é possivelmente decorrência de alteração na magnitude da ação trófica da serotonina sobre morfogênese crânio-facial, reforçando a participação do sistema serotoninérgico sobre o crescimento somático e ontogênico. O possível efeito hipofágico dos ISRS não é descartado.

PALAVRAS-CHAVE: serotonina, ontogênese, sistema nervoso.

Neonatal treatment effect with selective inhibitor of 5-HT recapture over the cranium-encephalic anatomic development

ABSTRACT - Neonatal repercussion research of the serotonin selective recapture inhibitor (SSRI) chronic treatment about the somatic growth, of the encephalon and skull. Male rats were divided into groups: control (NaCl) and Cit (10 µL/Kg citalopram 10 mg). In 21 post birth days were measured body weight, side axle, front and rear and skull circle. At 8, 15, 22 days after birth, animals were sacrificed for the encephalon withdrawal to evaluate the measurements mentioned above. SSRI use caused body growth deficit, skull and encephalon reduction. The retard is possibly caused by the magnitude change of the trophic serotonin action over the skull-facial morphogenesis, reinforcing the serotoninergic system participation over the somatic and ontogenic growth. The SSRI possible hypophagic effects are not discarded.

KEY WORDS: serotonin, ontogenesis, nervous system.

A ontogênese do sistema nervoso (SN) nos mamíferos envolve, em geral, neurogênese, migração, diferenciação celular, mielinização, síntese e liberação de neurotransmissores (NT)^{1,2}. Os estudos experimentais ajudam a identificar, analisar e compreender os eventos do desenvolvimento que estão ocorrendo a nível celular e subcelular³. No rato, o período crítico do desenvolvimento neural inicia-se cerca de 21 dias pós-natais^{1,2}. No SN as monoaminas podem atuar como dispositivos de sinalização intercelular nos circuitos neuronais⁴. Essas

moléculas podem ser cruciais para a diferenciação, crescimento neural e estabelecimento de redes neurais no SN central (SNC) imaturo mudando para um papel mais modulatório no tráfico de transmissão do SNC maduro⁵. Agindo como NT, elas podem, durante o desenvolvimento, interferir na morfogênese⁶. Dentre as substâncias NT envolvidas no controle do desenvolvimento e crescimento, destaca-se a 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT).

A 5-HT é um NT envolvido numa variedade de funções: humor, apetite, ciclo claro-escuro^{7,8}. Altera-

¹Professora de Anatomia e Mestre em Morfologia pela Universidade Federal de Pernambuco, Recife PE Brasil (UFPE); ²Aluna do Mestrado em Nutrição da UFPE; ³Mestre em Nutrição da UFPE; ⁴Doutora em Nutrição e Professora do Departamento de Nutrição da UFPE; ⁵Doutor em Anatomia pela Universidade de São Paulo, Professor Adjunto do Departamento de Anatomia, UFPE; ⁶Doutor em Farmacologia Experimental e Clínica da Universidade de Paris VI, Professor Adjunto do Departamento de Nutrição, UFPE.

Recebido 19 Maio 2006, recebido na forma final 2 Agosto 2006. Aceito 14 Setembro 2006.

Dr. Raul Manhães-de-Castro - Rua Cons. Portela 109 / 1301 - 52020-30 Recife PE - Brasil. E-mail: rcastro@nutricao.ufpe.br

ções na neurotransmissão serotoninérgica têm sido implicada na etiologia de várias desordens como a ansiedade, depressão, esquizofrenia, Alzheimer⁹, hiperatividade e autismo¹⁰. Os eventos do crescimento e desenvolvimento podem ser modificados por fatores exógenos, como alterações nutricionais e manipulações farmacológicas dos sistemas de NT^{2,11}. Manipulações do sistema de NT, utilizando-se ferramentas farmacológicas, podem alterar os níveis dos receptores, e aumentar a disponibilidade sináptica da 5-HT¹². Entre os inibidores seletivos de recaptura da serotonina (ISRS), o citalopram utilizado por Deiró¹³ é o mais seletivo¹⁴⁻¹⁶.

No presente estudo foi realizada análise para avaliar o crescimento crânio-encefálico de ratos, durante os 21 dias de vida pós-natais para esclarecer o possível envolvimento do sistema serotoninérgico no crescimento crânio-encefálico.

MÉTODO

Animais e tratamento – Ratos Wistar foram mantidos em sala com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo de claro (6:00 às 18:00) e escuro (18:00 às 6:00), com livre acesso a água e comida, durante todo o experimento. Um dia após o nascimento dos filhotes, todos os neonatos foram pesados e escolhidos os filhotes machos com peso entre 6 e 8 gramas. Os animais neonatos foram separados em dois grupos: um grupo tratado com solução salina a 0,9% de NaCl (grupo GC), 10 $\mu\text{L/g}$, via subcutânea (sc), diariamente, do 1º ao 21º dia pós-natal; outro grupo tratado (grupo Gcit), diariamente, com citalopram 10 mg/Kg, 10 $\mu\text{L/g}$ sc, do 1º ao 21º dia pós-natal. Os grupos experimentais acima delineados foram objeto dos seguintes estudos:

Estudo dos indicadores murinométricos do desenvolvimento – As avaliações in vivo foram realizadas diariamente, em cada animal, durante os primeiros 21 dias pós-natais. E avaliados o peso corporal e as seguintes dimensões do crânio: eixo látero-lateral (ELLC), o eixo ântero-posterior (EAPC) e a circunferência do crânio (CC).

As avaliações *post mortem* foram realizadas em animais com 8, 15 e 22 dias de idade. Após craniotomia, o encéfalo foi retirado da caixa craniana. Do encéfalo, foram aferidos: peso (PE), o volume (VE), a circunferência (CE) e os eixos látero-lateral (ELLE) e ântero-posterior (EAPE) do encéfalo. As análises alométricas dos parâmetros do corpo, encéfalo e crânio foram as seguintes: relação peso do encéfalo/corpo, relação eixo látero-lateral do encéfalo/crânio, relação eixo ântero-posterior do encéfalo/crânio, relação circunferência do encéfalo/crânio e densidade do encéfalo. Para a análise estatística utilizou-se o teste t de Student. O nível de significância adotado para todos os testes estatísticos usados foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Indicadores murinométricos do desenvolvimento – As curvas do crescimento ponderal dos animais

controle e tratados com citalopram 10 mg diferiram ($p < 0,05$) a partir do 7º dia de vida, perdurando esta diferença até o 21º dia pós-natal. Entre os grupos Gcit e GC, houve diferenças no ELLC a partir do 6º dia de vida. Essa diferença permaneceu até os 21º dia pós-natal. Durante o período de aleitamento, os grupos avaliados diferiram do 8º ao 21º dia de vida, com relação às medidas do EAPC. As medidas da circunferência do crânio do grupo Gcit apresentaram redução ($p < 0,05$) quando comparadas as do GC, do 7º ao 21º dias pós-natais.

Na segunda etapa do experimento, as medidas relacionadas aos indicadores do desenvolvimento do encéfalo foram avaliadas *post mortem*, nos animais com 8, 15 e 22 dias. Os parâmetros avaliados foram: peso, eixo látero-lateral e ântero-posterior, volume e circunferência do encéfalo. Ao compararmos o Gcit ao GC, percebemos uma redução ($p < 0,05$) do peso do encéfalo dos animais. Porém, esta redução ocorreu nos animais sacrificados apenas aos 15 e 22 dias pós-natais. O ELLE dos animais do grupo Gcit apresentou redução ($p < 0,05$) dos ELLE, quando comparado ao GC. Tais diminuições ocorreram aos 15 dias. Comparados os grupos Gcit e GC, não houve diferença na medida do EAPE em nenhuma das idades estudadas. Quando comparado ao grupo Gcit e o GC, obteve-se uma redução ($p < 0,05$) da circunferência do encéfalo nos animais sacrificados aos 8 dias de vida pós-natal e aos 15 dias. Quanto ao volume do encéfalo, o grupo Gcit apresentou redução ($p < 0,05$), em todas as idades analisadas, quando comparado ao grupo GC. As análises alométricas dos parâmetros do corpo, do encéfalo e do crânio, durante o tratamento com ISRS revelaram alteração somente entre o peso do encéfalo e o peso do corpo (PE/PC). Assim, os animais do Gcit comparados aos do GC apresentaram aumento no PE/PC ($p = 0,0001$) nas idades estudadas. Os aumentos ocorreram aos 8, aos 15 e aos 22. As outras relações não apresentaram diferenças entre os grupos.

DISCUSSÃO

No presente estudo, a utilização de um ISRS durante o período crítico de desenvolvimento do SN, provocou déficit de crescimento corporal, diminuição das medidas craniais, além da redução do peso e das medidas do encéfalo, na fase pós-natal em ratos. Inúmeras pesquisas têm como foco de interesse os estudos sobre ontogênese; todavia, poucos utilizam, nesta abordagem, manipulações farmacológicas de sistemas específicos de NT. A utilização de fármaco que age sobre sistema de recaptura específico de um

NT permite *a priori* alterar sua presença nos locais alvos e assim sua conseqüente ação. Deste modo, a recaptura da 5-HT tem a importante função de cessar a estimulação dos receptores presentes à nível das sinapses¹⁷. Assim, em termos gerais, foram avaliadas as repercussões destas alterações específicas do sistema 5-HT no período neonatal sobre parâmetro anatômicos, tendo como uma das contribuições metodológicas deste trabalho, o estudo sistemático de relações entre as dimensões corpóreas, encefálicas e craniais através da alometria. Os métodos e modelos alométricos são utilizados para descrever modificações quantitativas, determinando estruturas e diferenciando ou estabelecendo similaridades entre as partes anatômicas homólogas ou análogas de indivíduos diferentes¹⁸.

Nesta pesquisa, a utilização de ISRS reduziu tanto o encéfalo como o corpo; todavia este último foi, proporcionalmente àquele, muito mais afetado. O possível aumento de serotonina causado pelo tratamento com citalopram^{19,20} afeta o desenvolvimento, sobretudo o somático. O encéfalo, como órgão nobre, parece ser preservado em relação ao corpo. O déficit de crescimento corporal dos neonatos tratados com ISRS observado no início da segunda semana de vida foi nítido, possivelmente refletindo um efeito hipofágico da droga. A manipulação farmacológica que aumenta a disponibilidade sináptica de 5-HT causa redução na ingesta alimentar de ratos²¹. A utilização do ISRS retardou o crescimento do crânio dos neonatos. As alterações sugerem que a utilização de ISRS, durante o período de vulnerabilidade neural, pode afetar o desenvolvimento de tecidos que compõem o arcabouço do crânio. Quando o embrião é cultivado na presença do inibidor de recaptura da 5-HT ocorre específica má-formação crânio-facial⁵. A serotonina possui efeito trófico tanto em tecidos neurais, quanto em não neurais²²⁻²⁴. No Laboratório de Fisiologia da Nutrição, Deiró¹³ e Barros²⁵, encontraram redução das medidas dos eixos do crânio de ratos, quando estes sofriam manipulações no sistema 5-HT, na fase neonatal. Estes resultados corroboram nossos achados, sugerindo a participação da 5-HT nos eventos relacionados ao crescimento do crânio na fase pós-natal.

A administração de ISRS acarretou uma redução persistente do encéfalo em neonatos. Estas alterações foram observadas a partir da segunda semana de vida, fase em que a densidade final e a localização dos

terminais 5-HT são estabelecidas^{26,27}. Esta evidência reforça a hipótese de que a 5-HT é um elemento chave no desenvolvimento de muitos tecidos, em particular o tecido nervoso²⁸. As alterações neonatais verificadas no eixo látero-lateral, no volume e na circunferência do encéfalo sugerem a participação da 5-HT nos eventos celulares relacionados ao crescimento, e demonstram que a manipulação do sistema 5-HT, em uma fase na qual o SNC está em desenvolvimento acarreta, de imediato, alterações e retardos ontogenéticos. As alterações anatômicas aqui observadas podem ser conseqüências tanto de insultos nutricionais como farmacológicos. Assim, os achados sugerem também, corroborando o estudo de Deiró¹³, que a manipulação do sistema 5-HT no período de aleitamento, pode causar alteração no mecanismo osmótico regulado pela serotonina^{29,30}, com conseqüentes reflexos no volume de água corporal e encefálico.

Atualmente estão sendo usadas substâncias que agem sobre o sistema serotoninérgico, em indivíduos cada vez mais jovens, para o tratamento de distúrbios do humor e alimentar. A quais reais perigos e danos, está exposta esta população? Nos seres humanos, qual a idade adequada para o início do uso de ISRS? Os achados experimentais deste trabalho dão uma primeira idéia da dimensão do problema.

REFERÊNCIAS

1. Morgane M, Miller M, Kemper T, et al. The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. *Neuroscience* 1978;2: 137-230.
2. Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993;17: 91-128.
3. Dubovicky M, Ujházy E, Jezová D. Perinatal brain damage and neurobehavioural alterations in postnatal development. *Slovakofarma Rev* 1996;4:46-49.
4. Lauder JM, Liu J, Devaux L, Morrow AL. GABA as a trophic factor for developing monoamine neurons. *Perspect Dev Neurobiol* 1998;5: 247-259.
5. Herlenius E, Lagercrantz H. Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early Human Dev* 2001;65:21-37.
6. Levitt P, Harvey JA, Friedman E, Simansky K, Murphy EH. New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci* 1997;20:269-274.
7. Leibowitz SF, Alexandre JT. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol Psychiatry* 1998;44:851-864.
8. Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999;38:1083-1152.
9. Serrats J, Mengod G, Cortés R. Expression of serotonin 5-HT_{2C} in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei. *J Chem Neuroanat* 2005; 29:83-91.
10. Galineau L, Kudas E, Guilloteau D, Vilar Marie-Paule, Chalou S. Ontogeny of the dopamine and serotonin transporters in the rat brain: an autoradiographic study. *Neurosci Lett* 2004;363:266-271.
11. Winick M, Rosso P, Brasel JA. Malnutrition and cellular growth in the brain: existence of critical periods. In: *Lipids malnutrition and the development brain*. Amsterdam: CIBA Foundation Symposium 1972:199-212.
12. Simansky KJ. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behaviour* 1996;73:37-42.

13. Deiró TCBJ. Desenvolvimento somático e sensório-motor e padrão adulto do consumo alimentar, em ratos: efeito do tratamento neonatal com inibidor de recaptura da serotonina durante o período de crescimento rápido do encéfalo. 1998:1-107.
14. Hyttel J. Citalopram-pharmacological profile of a specific serotonin uptake inhibitor with antidepressant activity. *Biol Psychiatry* 1982;6: 277-295.
15. Hyttel J, Larsen JJ. Serotonin-selective antidepressants. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1985;1:146-153.
16. Baumann P. Pharmacology and pharmacokinetics of citalopram and other SSRIs. *Int Clin Psychopharmacol* 1996;11:5-11.
17. Manhães-de-Castro R. Etude de la participation des recepteurs centraux de la serotonine du type 5-HT 1B dans les reactions cerebrales au stress et dans le mecanisme d'action des antidepressants 1995:1-264.
18. Mandarin-de-Lacerda CA. Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: Ed. UERJ 1995.
19. Hyttel J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Int J Psychopharmacol* 1994;9(Suppl):S19-S26.
20. Hiemke C, Hartter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* 2000;85:11-28.
21. Garattini, S. Biological actions of drugs affecting serotonin and eating. *Obesity Research* 1995;3(Suppl 4):S463-S470.
22. Lauder JM. Hormonal and humoral influences on brain development. *Psychoneuroendocrinology* 1983;8:121-155.
23. Moiseiwitsch JRD, Lauder JM. Stimulation of murine tooth development in organotypic culture by the neurotransmitter serotonin. *Arch Oral Biol* 1996;41:161-165.
24. Lambert HW, Lauder JM. Serotonin receptor agonists that increase cyclic AMP positively regulate IGF-I in mouse mandibular. *Dev Neurosci Mesenchymal Cells* 1999;21:105-112.
25. Barros KMFT. Efeito da desnutrição neonatal e/ou do tratamento com agonista 5-HT1A sobre o desenvolvimento sensório-motor e atividade exploratória em ratos. Tese. Recife, 1999.
26. Lidov HGW, Molliver ME. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res* 1982;8:389-430.
27. Wallace JA, Lauder JM. Development of the serotonergic system in the rat embryo immunocytochemical study. *Brain Res Bull* 1983;10:459-479.
28. Turlejski K. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiol Exp* 1996;56:619-636.
29. Brandão ML. Comportamento alimentar. In: *As bases psicofisiológicas do comportamento*. São Paulo: EPU 1991:37-46.
30. Epstein S, Hamilton S. Cyproheptadine inhibition of stimulated plasma renin activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;18:289-296.