

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências da Saúde

**Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do
Comportamento**

**Inibição Neonatal da Recaptação de Serotonina:
Repercussões Sobre o Desenvolvimento Morfológico
Neuromuscular do Esôfago em Ratos Nutridos ou Não**

Recife

2009

Kelli Nogueira Ferraz Pereira

**Inibição Neonatal da Recaptação de Serotonina: Repercussões
Sobre o Desenvolvimento Morfológico Neuromuscular do
Esôfago em Ratos Nutridos ou Não**

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como Parte dos Requisitos para Obtenção do Título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

Co-Orientador: Prof. Dr. Hilton Justino da Silva

Recife

2009

Pereira, Kelli Nogueira Ferraz

Inibição neonatal da recaptação de serotonina: repercussões sobre o desenvolvimento morfológico neuromuscular do esôfago em ratos nutridos ou não / Kelli Nogueira Ferraz Pereira. – Recife: O Autor, 2009.

93 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desenvolvimento neuromuscular do esôfago. 2. Desnutrição. 3. Sertralina. I. Título.

616.32
616.32

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-123

Kelli Nogueira Ferraz Pereira

**Inibição Neonatal da Recaptação de Serotonina: Repercussões
Sobre o Desenvolvimento Morfológico Neuromuscular do
Esôfago em Ratos Nutridos ou Não**

Dissertação aprovada em 26 de Fevereiro de 2009.

Prof. Dr. Hilton Justino da Silva

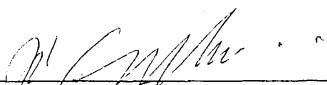
Profª. Drª. Sandra Lopes de Souza

Prof. Dr. José Eulálio Cabral Filho

APROVADA

APROVADA

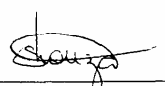
APROVADA



Prof. Dr. José Eulálio Cabral Filho
Presidente da Banca Examinadora



Prof. Dr. Hilton Justino da Silva



Profª. Drª. Sandra Lopes de Souza

Recife

2009

Dedico esta dissertação a minha avó Constância. Uma mulher forte e batalhadora, que sempre foi sinônimo para mim e minha família de amor, carinho e dedicação. Infelizmente, não está mais ao nosso lado, mas sempre estará em nossos corações e nas nossas lembranças.

Agradecimentos

*Gostaria de agradecer a **Deus** pelas conquistas da minha vida. Agradecer pela minha família, pelos amigos do passado e os conquistados, e pelas providências que toma nos momentos de maior desespero.*

*À minha mãe **Zeza**, uma mulher forte e de muita garra, que, apesar de todos os problemas e dificuldades, sempre está sorrindo, é uma lição de vida para mim. E, ao meu pai **Tadeu**, que, me apoiou e ajudou de todas as formas possíveis.*

*Aos meus irmãos, **Keilla** e **Pablo**, especialmente a minha irmã, que sempre esteve ao meu lado, me ajudando no que fosse possível, minha melhor amiga.*

*À **Tiago**, que foi essencial nesta fase da minha vida, sempre me dando força e apoio, suportando alguns momentos difíceis.*

*Às minhas tias, especialmente à **Silvana**, **Elba**, **Cleonice** e **Catarina**, que foram mais do que tias, e sim mães. Sempre me deram muito apoio e, no que pudessem ajudar, estavam disponíveis.*

*À **Dr. Edgar**, meu segundo pai, que me ajuda desde pequeninha. Sem ele, com certeza, isto não estaria acontecendo.*

*À **Ana Claudia**, minha ex-professora e agora uma amiga. Foi ela quem me incentivou à procurar por prof. Raul e tentar o mestrado em neurociências. Desde a faculdade, além de me passar muitos conhecimentos, sempre foi sinônimo para mim de simplicidade e luta.*

*A **prof. Raul**, que acreditou em mim desde o início e que me fez crescer muito, não só como pesquisadora, mas como pessoa. Com as nossas conversas, sempre procurei absover todos os seus conselhos e ensinamentos.*

À **Ana Elisa**, que desde o começo me ajudou muito, foi a minha segunda co-orientadora, na grande parte do tempo.

A **Hilton**, que também foi imprescindível para a realização deste trabalho. Me passou muito conhecimento.

À **Raquel**, uma amiga que fiz desde o início do mestrado e que foi de fundamental importância para o meu projeto, me ajudando, especialmente no início, quando eu estava um pouco perdida. Obrigada também pelos nossos almoços de muitas conversas e orientações.

Às minhas estagiárias, **Ísis** e **Patrícia**. Ísis comigo desde o início, com a sua calma na manipulação dos animais, além da sua disposição, eu podia contar com ela a qualquer hora e qualquer momento. E Patrícia, chegou quando nós já tínhamos começado, mas foi de extrema importância para a realização do nosso trabalho.

Ao **grupo de pesquisa NNI**, muito obrigada pela acolhida. É muito bom fazer parte de um grupo tão forte e dedicado, que procura crescer e trabalhar junto.

À **profª. Sônia**, que ao final do projeto foi imprescindível, me dando, sempre que nos encontrávamos, aulas de histologia.

À **Fátima** e **Silvânia**, que foram essenciais na preparação das lâminas. Aprendi muito com vocês.

A **Dr. França**, que sempre me ajudou muito com o animais, tirando as minhas dúvidas.

A **Seu Paulino**, pela elaboração da dieta.

À **Lúcia**, pelas dúvidas com a estatística e sua disponibilidade a qualquer momento.

À **profª. Sílvia Regina**, que no início foi imprescindível, me orientando e tirando todas as minhas dúvidas.

“Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.

Que proveito tem o trabalhador naquilo em que trabalha?

Tenho visto o trabalho que Deus deu aos filhos dos homens, para com ele os exercitar.

Tudo fez formoso em seu tempo; também pôs o mundo no coração do homem, sem que este possa descobrir a obra que Deus fez desde o princípio até ao fim.

Já tenho entendido que não há coisa melhor para eles do que alegrar-se e fazer bem na sua vida;

E também que todo o homem coma e beba, e goze do bem de todo o seu trabalho; isto é um dom de Deus.

Eu sei que tudo quanto Deus faz durará eternamente; nada se lhe deve acrescentar, e nada se lhe deve tirar; e isto faz Deus para que haja temor diante dele.

O que é, já foi; e o que há de ser, também já foi; e Deus pede conta do que passou.

Vi mais debaixo do sol que no lugar do juízo havia impiedade, e no lugar da justiça havia iniquidade.

Eu disse no meu coração: Deus julgará o justo e o ímpio; porque há um tempo para todo o propósito e para toda a obra.

Disse eu no meu coração, quanto a condição dos filhos dos homens, que Deus os provaria, para que assim pudessem ver que são em si mesmos como os animais.

Porque o que sucede aos filhos dos homens, isso mesmo também sucede aos animais, e lhes sucede a mesma coisa; como morre um, assim morre o outro; e todos têm o mesmo fôlego, e a vantagem dos homens sobre os animais não é nenhuma, porque todos são vaidade.

Todos vão para um lugar; todos foram feitos do pó, e todos voltarão ao pó.

Quem sabe que o fôlego do homem vai para cima, e que o fôlego dos animais vai para baixo da terra?

Assim que tenho visto que não há coisa melhor do que alegrar-se o homem nas suas obras, porque essa é a sua porção; pois quem o fará voltar para ver o que será depois dele?”

Resumo

Existem períodos críticos do desenvolvimento do sistema nervoso que são vulneráveis a agressões do ambiente. Nessa fase da vida em mamíferos, acontece também o desenvolvimento do trato gastrointestinal, ressaltam-se suas estruturas neurais responsáveis pelo controle motor do sistema digestório. Durante essas etapas, estímulos precoces ou insultos podem resultar em mudanças persistentes na estrutura e função do organismo. Esse fenômeno, conhecido como programação, pode ser responsável pelo estabelecimento de doenças na vida adulta. O objetivo do presente estudo foi investigar as possíveis repercussões da desnutrição e/ou da inibição neonatal da recaptação de serotonina no desenvolvimento estrutural neuromuscular do esôfago em ratos. A amostra consistiu de 97 ratos machos da linhagem Wistar. Os animais foram divididos em dois grupos: nutrido (n=39) e desnutrido (n=58). A manipulação farmacológica com inibidor seletivo de recaptação de serotonina foi realizada durante o período de lactação. Os animais de cada grupo foram divididos em dois subgrupos: 1º tratados com soro fisiológico (NS, n=21; DS, n=38); 2º, com sertralina (10 mg/Kg pc, s.c.) (NSert, n=18; DSert, n=20). Ratos de cada subgrupo foram pesados e sacrificados para retirada de esôfago e posterior análise dos parâmetros macroscópicos e microscópicos aos 22 ou 90 dias de idade. O esôfago de cada animal era removido e medido o comprimento total; em seguida, dividido por dissecação em duas porções de igual comprimento. Após aferição do peso da porção proximal, só essa era então utilizada, fixada, desidratada e seccionada para coloração. Inicialmente, foi utilizada a Hematoxilina/Eosina para localização dos neurônios do plexo mioentérico. Em seguida, para confirmação e eventuais medidas, foi empregado o método de impregnação neuronal por nitrato de prata. A desnutrição e/ou a ação neonatal da sertralina parecem ter sido responsáveis pela redução do peso corporal na fase de lactação. Nos desnutridos, houve redução ponderal que persistiu mesmo após o período de recuperação nutricional. A restrição protéica precoce e o uso neonatal de sertralina tiveram impactos relevantes no tamanho e no peso do esôfago nos animais com 22 dias de vida. A manipulação nutricional gerou mudanças persistentes, em ambas as idades estudadas, na área e no perímetro das fibras musculares longitudinais. Ambos os insultos (nutricional ou farmacológico) ocasionaram diminuição do número de neurônios mioentéricos. No entanto, esses efeitos só foram observados nos animais desnutridos no 22º dia de idade. Curiosamente, nos animais tratados com sertralina houve diminuição de neurônios, somente ao 90º dia de idade. Quanto à relação entre o número de neurônios do plexo mioentérico e a área das células musculares longitudinais, os animais desnutridos apresentaram maior proporção a curto e a longo prazo. Enquanto que na relação entre o número de neurônios e o perímetro das fibras, os efeitos dieta e droga demonstraram, respectivamente, maior e menor proporções a longo prazo. A desnutrição e o uso de inibidor seletivo de recaptação de serotonina parecem programar alterações neuromusculares na morfologia do esôfago. Essas observações indicam que as mudanças estruturais associadas com a programação estão relacionadas à função regulatória da serotonina no desenvolvimento neuromotor do trato gastrointestinal.

Palavras-chave: desnutrição; serotonina; sertralina; fibras musculares; plexo mioentérico; esôfago.

Abstract

There are critical periods of development of the nervous system that are vulnerable to environmental insults. At that stage of life in mammals, is also the development of the gastrointestinal tract, stress is neural structures responsible for motor control of the digestive system. During these stages, stimuli or insults early may result in persistent changes in the structure and function of the body. This phenomenon, known as programming, may be responsible for the establishment of disease in adulthood. The purpose of this study was to investigate the possible effects of malnutrition and/or neonatal inhibition of serotonin reuptake in neuromuscular structural development of the esophagus in rats. The sample consisted of 97 male rats of Wistar strain. The animals were divided into two groups: nourished (n=39) and malnourished (n=58). The pharmacological manipulation with serotonin selective reuptake inhibitor was performed during the period of lactation. The animals of each group were divided into two subgroups: 1st treated with saline (NS, n=21, DS, n=38); 2nd, with sertraline (10 mg / kg bw, sc) (NSert, n=18; DSert, n=20). Rats of each group were weighed and sacrificed for removal of the esophagus and subsequent analysis of the macroscopic and microscopic parameters to 22 or 90 days of age. The esophagus of each animal was removed and measured the total length, then divided by dissection into two portions of equal length. After measuring the weight of the proximal portion, but that was then used, fixed, dehydrated and sectioned for staining. Initially, we used the Hematoxylin/Eosin for location of neurons in the myenteric plexus. Then, for confirmation and possible measures, was used the method of neuronal impregnation by silver nitrate. Malnutrition and/or the action of neonatal sertraline appear to have been responsible for reducing body weight during the lactation. In malnourished, decreased weight that persisted even after the period of nutritional recovery. The early protein restriction and the neonatal use of sertraline had relevant impacts on the size and weight of the esophagus in animals with 22 days of life. The nutritional manipulation caused persistent changes in both age studied in the area and the perimeter of the longitudinal muscle fibers. Both insults (nutritional or pharmacological) caused decrease in the number of myenteric neurons. However, these effects were only observed in malnourished animals in the 22nd day of age. Interestingly, animals treated with sertraline decrease of neurons, only the 90th day of age. Concerning the relationship between the number of neurons in the myenteric plexus and longitudinal muscle cells of the area, the malnourished animals showed a higher proportion of short and long term. While the relationship between the number of neurons and the perimeter of the fiber, the diet and drug effects demonstrated, respectively, higher and lower proportions in the long term. Malnutrition and the use of serotonin selective reuptake inhibitor seem plan neuromuscular changes in the morphology of the esophagus. These observations indicate that the structural changes associated with the programming are related to the regulatory role of serotonin in the neuromotor development of the gastrointestinal tract.

Keywords: malnutrition; serotonin, sertraline, muscle fibers; myenteric plexus, esophagus.

Sumário

1. Introdução	11
1.1. Apresentação	11
1.2. Objetivos	14
1.2.1. Objetivo Geral	14
1.2.2. Objetivos Específicos	14
1.2. Hipóteses	14
1.4. Revisão da Literatura (Artigo de Revisão)	15
2. Métodos	35
2.1. Animais	35
2.2. Manipulação Nutricional	35
2.3. Manipulação Farmacológica	37
2.4. Delineamento Experimental	38
2.4.1. Evolução Ponderal	38
2.4.2. Estudo do Desenvolvimento	38
3. Resultados (Artigo Original)	45
4. Considerações Finais	70
Referências Bibliográficas	71
ANEXO A	80
ANEXO B	85
ANEXO C	93

INTRODUÇÃO



1. Introdução

1.1. Apresentação

Há um dos períodos críticos do desenvolvimento do Sistema Nervoso (SN) do rato que corresponde às três primeiras semanas de vida pós-natal (período de aleitamento). Nessa fase, ocorre a evolução dos componentes neurais responsáveis pelo controle motor do sistema digestório, assim como das estruturas pertencentes ao trato gastrointestinal. Durante esses estágios críticos, o SN fica mais propenso a injúrias ambientais em razão dos processos implicados no seu desenvolvimento ocorrerem com muita rapidez.

Insultos em idades precoces do desenvolvimento a exemplo da desnutrição e da manipulação farmacológica com Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS) parecem aumentar os níveis de serotonina (5-HT) no cérebro. A 5-HT parece exercer papel programador em diferentes sistemas do organismo. Estudos experimentais sugerem a participação do sistema serotoninérgico na regulação do comportamento alimentar e do peso corporal, além do controle das funções sensório-motoras gastrointestinais. A restrição protéica e a manipulação farmacológica do sistema serotoninérgico em períodos críticos do desenvolvimento parecem suscitar mudanças persistentes nas estruturas e funções do organismo. A desnutrição e a administração de ISRS no período de aleitamento causam retardo do crescimento somático com déficit de crescimento corporal, diminuição das medidas craniais e redução do peso e das medidas do encéfalo; ademais, atraso na maturação de reflexos. Essas agressões parecem também afetar o desenvolvimento morfológico e fisiológico da musculatura lisa e dos plexos ganglionares do trato gastrointestinal.

Uma diversidade de estudos trata das manipulações nutricionais ou farmacológicas de neurotransmissores em fases críticas da vida (em especial o período de aleitamento), onde acontece o desenvolvimento de muitas estruturas do organismo, inclusive abordando questões concernentes ao trato gastrointestinal. Há, portanto, um grande interesse de discernir o papel da nutrição e de neurotransmissores, como a serotonina, no desenvolvimento de estruturas nervosas e musculares que regulam a função de sistemas, a exemplo do digestório.

São ainda pouco claros os efeitos precoces e tardios da desnutrição e/ou do aumento induzido de serotonina no desenvolvimento neuromuscular do trato gastrointestinal, em particular do esôfago. Esse órgão é extremamente importante no processo da deglutição. Essa função é sempre alvo de alterações em uma série importante de disfunções na primeira infância, e de doenças neurodegenerativas. Além disso, é importante a relação dos insultos nutricionais e/ou farmacológicos, incidentes no período neonatal do desenvolvimento, com a programação, sobretudo aqueles que podem atingir a morfogênese neuromuscular esofagiana. E por fim, mas não menos importante, o papel de controle da serotonina nesses eventos relacionados ao desenvolvimento. Diante desses eixos que fundamentam o interesse científico, o objetivo geral da presente dissertação foi estudar as eventuais repercussões da manipulação neonatal do sistema serotoninérgico, induzida por meio da desnutrição e/ou da administração de inibidores seletivos da recaptação de serotonina, sobre a maturação neuromotora do esôfago em ratos. A princípio, a pergunta de condução da pesquisa foi: Seria a manipulação do sistema serotoninérgico, durante o período de lactação, causa de alterações precoces e tardias no desenvolvimento morfológico das fibras musculares lisas e da população neuronal do plexo mioentérico no esôfago? Nossos resultados, como poderá ser verificado nesse trabalho nos deram respostas e nos trouxeram

outras questões. Esse conjunto de evidências e hipóteses provenientes do labor experimental permitiu a elaboração de um artigo de revisão, intitulado “Repercussões da desnutrição e/ou da inibição neonatal da recaptação de serotonina no desenvolvimento neuromuscular do trato gastrointestinal: revisão da literatura”, que foi submetido à revista *Neurobiologia* (ANEXO A); e um artigo original intitulado “Do serotonergic system manipulation program changes in the neuromuscular development of the esophagus?”, o qual foi submetido à revista indexada *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* (ANEXO B).

Para testar as hipóteses dessa pesquisa, foram utilizados métodos simples, mas elucidativos, de processamento histológico de rotina, como a coloração de Hematoxilina/Eosina para localização dos neurônios do plexo mioentérico. Em seguida, a fim de confirmar e evidenciar os mencionados neurônios, foi realizado o método de impregnação por nitrato de prata. Os métodos empregados permitiram avaliar a morfometria das fibras musculares longitudinais e da população neuronal do plexo mioentérico do esôfago.

1.2.Objetivos:

1.2.1.Objetivo Geral:

Estudar, em ratos, as eventuais repercussões da manipulação neonatal do sistema serotoninérgico, induzida por meio da desnutrição e/ou da inibição da recaptação de serotonina, sobre a maturação neuromotora do esôfago.

1.2.2.Objetivos Específicos:

Avaliar, durante o período de aleitamento (do 1º ao 21º dias de vida pós-natal) e aos 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 dias de idade, a curva de peso corporal;

Analisar aos 22 ou 90 dias (*post mortem*) os parâmetros macroscópicos (tamanho e peso) e microscópicos (área e perímetro das fibras musculares longitudinais e número total de neurônios do plexo mioentérico) da porção superior do esôfago.

1.3.Hipóteses:

A manipulação neonatal do sistema serotoninérgico, durante o período crítico do desenvolvimento cerebral, causa:

Redução, a curto e a longo prazo, do tamanho e do peso da porção proximal do esôfago;

Diminuição, precoce e tardia, da área e do perímetro das fibras musculares longitudinais;

Redução, a curto e a longo prazo, do número total de neurônios dos plexos mioentéricos do esôfago.

1.4.Revisão da Literatura

Artigo de Revisão (Anexo 1)

Repercussões da desnutrição e/ou da inibição neonatal da recaptação de serotonina no desenvolvimento neuromuscular do trato gastrointestinal: revisão da literatura

Effects of malnutrition and/or neonatal inhibition of serotonin reuptake in neuromuscular development of the gastrointestinal tract: review of literature

Kelli Nogueira Ferraz Pereira – Mestranda do Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco.

Ísis Lorelly Serrano Vitoriano – Graduação em Fisioterapia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Maria Patrícia Pereira Melo – Graduanda em Fisioterapia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Raquel da Silva Aragão – Mestranda do Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco.

Ana Elisa Toscano – Doutorado em Nutrição pela Universidade Federal de Pernambuco com co-tutela em Universite de Technologie de Compiègne – França.

Hilton Justino da Silva – Doutorado em Nutrição pela Universidade Federal de Pernambuco.

Raul Manhães de Castro – Doutorado em Ciências da Vida pela Université de Paris VI (Pierre et Marie Curie).

Número total de páginas: 19.

Resumo

Há períodos críticos do desenvolvimento do sistema nervoso mais vulneráveis a insultos ambientais pelo fato dos eventos sucederem com muita rapidez. Nessa fase da vida, acontece também o desenvolvimento do trato gastrointestinal, salientam-se suas estruturas neurais responsáveis pelo controle motor do sistema digestório. Agressões ambientais precoces incidindo nos períodos críticos podem acarretar efeitos permanentes sobre estruturas e funções de sistemas orgânicos com repercussão na vida adulta. No presente estudo, foi investigado, por meio da revisão da literatura, as possíveis repercussões da desnutrição e/ou da inibição da recaptação de serotonina no desenvolvimento neuromuscular do trato gastrointestinal. Uma busca sistemática na literatura foi realizada no mês de outubro de 2008, nas bases de dados eletrônicas Pubmed e SciELO (Scientific Electronic Library Online), assim como no banco de teses da Capes. Esta busca priorizou estudos do ano de 1962 a 2008. Com base nos dados da literatura, sugere-se que a desnutrição e/ou o aumento da disponibilidade de serotonina, por meio do bloqueio da recaptação do mencionado neurotransmissor, durante o período crítico do sistema nervoso, promovem alterações histológicas no desenvolvimento das estruturas neuromusculares do trato gastrointestinal. Esses achados indicam que as mudanças morfológicas estão relacionadas à função regulatória da serotonina no controle motor do sistema digestório.

Palavras-chave: desnutrição; serotonina; fibras musculares; plexo mioentérico; trato gastrointestinal.

Abstract

There are critical periods of development of the nervous system more vulnerable to environmental insults because of the events was very fast. At that stage of life, is also the development of the gastrointestinal tract, highlight those neural structures responsible for motor control of the digestive system. Environmental insults focusing on early critical periods may have permanent effects on structure and function of organ systems with repercussions in adulthood. In this study, was investigated by means of literature review, the possible effects of malnutrition and/or inhibiting the reuptake of serotonin on neuromuscular development of the gastrointestinal tract. A systematic literature search was conducted in October 2008, in the electronic databases Pubmed and SciELO (Scientific Electronic Library Online) and in the bank views the Capes. This search focused studies of the year 1962 to 2008. Based on data from the literature, it is suggested that malnutrition and/or increase the availability of serotonin, by blocking the reuptake of the neurotransmitter mentioned, during the critical period of development of the nervous system, promote histological changes in the neuromuscular structures of the gastrointestinal tract. These findings indicate that the morphological changes are related to the regulatory role of serotonin in the digestive system of motor control.

Keywords: malnutrition; serotonin; muscle fibers; myenteric plexus, gastrointestinal tract.

Introdução

Existem períodos críticos do desenvolvimento do sistema nervoso que ocorrem a evolução dos componentes neurais responsáveis pelo controle motor do sistema digestório¹, assim como das estruturas pertencentes ao trato gastrointestinal^{31,32,33,61}. Durante esses estágios críticos, o SN fica mais propenso a injúrias ambientais em razão dos processos implicados no seu desenvolvimento ocorrerem com muita rapidez^{52,74}.

Insultos a exemplo da desnutrição perinatal⁶³ e da manipulação farmacológica com Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRS)^{35,75} são capazes de aumentar os níveis de serotonina na fenda sináptica. A serotonina atua na regulação do comportamento alimentar e no peso corporal^{15,45,50,66} além de controlar as funções sensório-motoras gastrointestinais¹³. A restrição protéica e a manipulação farmacológica do sistema serotoninérgico na vida precoce parecem gerar mudanças permanentes nas estruturas e funções do organismo^{28,40,43,44}. Essas agressões parecem afetar também o desenvolvimento morfológico e fisiológico da musculatura lisa e dos plexos ganglionares do trato gastrointestinal^{7,9,26,37,46}.

Uma variedade de estudos trata das manipulações nutricionais ou farmacológicas de neurotransmissores em etapas críticas da vida, onde acontece o desenvolvimento de muitas estruturas do organismo, inclusive expondo questões concernentes ao trato gastrointestinal^{7,9,26,37,46,62}. Há, portanto, um grande interesse de discernir o papel da nutrição e de neurotransmissores, como a serotonina, no desenvolvimento de estruturas nervosas e musculares que regulam a função de sistemas, a exemplo do digestório.

São ainda pouco claros os efeitos precoces e tardios da manipulação do sistema serotoninérgico, por meio da desnutrição e da inibição neonatal da recaptação da referida bioamina, no desenvolvimento neuromuscular do trato gastrointestinal. Além disso, é

importante a relação dos insultos nutricionais incidentes no período neonatal do desenvolvimento com a programação. E por fim, mas não menos importante, o papel de controle da serotonina nesses eventos sobretudo relacionados ao desenvolvimento. Diante desses eixos, o objetivo do presente artigo foi investigar, por meio da revisão da literatura, as eventuais repercussões da desnutrição e/ou da manipulação farmacológica do sistema serotoninérgica, ocorridas no período crítico do desenvolvimento cerebral, sobre a maturação muscular e neuronal do trato gastrointestinal em ratos.

Desenvolvimento neuromuscular do trato gastrointestinal e programação

No rato, o período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso inicia na embriogênese até o desmame (cerca de 21 dias de vida pós-natal)⁵¹. Nesse momento, o SN é mais vulnerável às agressões do ambiente porque as etapas implicadas no seu desenvolvimento ocorrem com muita rapidez^{52,74}.

Em humanos, os períodos pré e pós-natal são críticos também para o desenvolvimento do trato gastrointestinal, iniciado na embriogênese e finalizado nos primeiros dois a quatro anos de vida pós-natal^{31,32,33,61}. A função do esôfago começa por volta do 4º mês de gestação, por meio da ingestão de fluido amniótico⁶¹. Depois do nascimento, as características anatômicas e fisiológicas começam a se diferenciar^{31,33}. Com um mês de idade, a velocidade das ondas peristálticas e a pressão esofagiana mudam ligeiramente³², acrescido pela maturação do controle motor e da função esfintérica³¹.

Durante esse período, danos na musculatura lisa esofagiana contribuem para mudanças na função motora do esôfago⁶⁷. Em razão disso, pode-se concluir que as características ativas do esôfago (distensão longitudinal e circunferencial) dependem da sua morfologia e das suas propriedades passivas (comprimento circunferencial interno e

externo, espessura e área das camadas mucosa e muscular)²⁷. Ademais, também são influenciadas pelo desenvolvimento do SNE que possui sua fase de maior crescimento e desenvolvimento nessa etapa da vida²⁵.

Estudos epidemiológicos e em animais têm mostrado consequências deletérias na vida adulta como resultado de agressões ambientais durante os períodos fetal, neonatal ou infância^{28,40,53,57}. Essas alterações incidindo em período crítico do desenvolvimento podem assim ter efeitos permanentes na estrutura e na função dos órgãos⁴¹. O mecanismo associado com esses eventos é chamado de programação⁴¹.

A fim de explicar os processos intrínsecos à programação, varias hipóteses de trabalho e estudos foram elaborados^{28,36,54}, destacando-se a hipótese do fenótipo protetor de Hales, Baker (1992)²⁸. Segundo esses autores, uma condição nutricional pobre na vida precoce programa um fenótipo na vida adulta, de maneira que é benéfica para sobreviver sobre condições nutricionais pobres, em contrapartida, é prejudicial, quando a nutrição é abundante²⁸. Três décadas anteriormente Neel (1962)⁵⁴ defendia a hipótese do genótipo protetor, e sugeria ocorrer mudanças genéticas benignas para sobrevivência sobre condições de fome. No entanto, no caso de situação nutricional favorável, essas mudanças genéticas se tornam maléficas⁵⁴. Reforçando as idéias de Hales e Barker²⁸, em 2005, Lee et al.³⁶ sugeriram um mecanismo epigenético, conhecido como imprinting genômico, para explicar o efeito a longo-prazo da desnutrição precoce.

Insultos incidentes nas fases críticas da vida, como a desnutrição e a administração de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), podem levar a danos permanentes na morfologia e fisiologia dos órgãos e tecidos do sistema nervoso central^{28,40,43,44} e do sistema nervoso entérico^{37,46}. Tais repercussões no SNE são capazes de comprometer o funcionamento das estruturas pertencentes ao trato gastrointestinal,

interferindo no transporte do bolo alimentar ou líquidos, essenciais no mecanismo de absorção e digestão de nutrientes¹⁷.

Desnutrição e/ou inibição neonatal da recaptação de serotonina: repercussões no desenvolvimento neuromuscular do sistema digestório

Nas etapas críticas do desenvolvimento do sistema nervoso, a nutrição atua como importante fator de programação ambiental⁴³, com capacidade de gerar consequências significativas na vida adulta⁴². Portanto, a desnutrição perinatal acarreta retardo no desenvolvimento crânio-facial e induz atrofia muscular^{1,6}. Ademais, no sistema muscular, a desnutrição neonatal danifica irreversivelmente a estrutura do músculo⁵ e reduz a multiplicação celular, diminuindo o número das fibras e dos núcleos musculares nos descendentes^{3,5,58}. São verificadas também mudanças nas proporções dos tipos de fibras musculares após desnutrição precoce⁶⁵. Por conseguinte, as propriedades biomecânicas contráteis e elásticas musculares são comprometidas⁶⁵.

No sistema digestório, a escassez de proteína nos períodos críticos da vida ocasiona um atraso no desenvolvimento dos tecidos e neurônios mioentéricos de ratos jovens^{7,9,26,37}. No entanto, as características morfológicas e morfométricas dos neurônios entéricos restabelecem-se após a recuperação nutricional^{9,26,47,49}. Esses possíveis efeitos da desnutrição protéica nas estruturas neurais do plexo mioentérico são indicativos de que o controle motor da motilidade gastrointestinal será afetado de forma negativa⁴⁹.

A desnutrição durante os períodos pré e pós-natal afeta sistemas de neurotransmissores, dentre eles o sistema serotoninérgico²⁹. Dados experimentais mostram que a desnutrição pós-natal promove aumento nas concentrações de serotonina no cérebro do rato²⁹. Essas repercussões causadas pela desnutrição podem se estender por longos

períodos mesmo após a recuperação nutricional¹¹.

Substâncias conhecidas como Inibidoras Seletivas da Recaptação de Serotonina (ISRS) agem como bloqueadoras da inativação da serotonina, o que se dá no âmbito da molécula transportadora de 5-HT (SERT)⁷⁵. A inibição do SERT gera o aumento da concentração sináptica da serotonina, permitindo uma maior disponibilidade para a ligação desse neurotransmissor com os seus receptores³⁵. Dessa forma, o uso de ISRS pode causar efeitos no funcionamento do cérebro⁷⁵ e do trato gastrointestinal^{23,71} devido a modificações na função dos receptores 5-HT⁶⁹.

A administração crônica dos ISRS no início da vida ocasiona retardamento da ontogênese somática do crescimento, bem como atraso na maturação de alguns reflexos¹⁴. Além disso, podem provocar déficit de crescimento corporal, diminuição das medidas craniais e redução do peso e das medidas do encéfalo, na fase pós-natal em ratos^{14,44}.

A manipulação do sistema serotoninérgico por meio dos Inibidores seletivos da recaptação de serotonina, no período neonatal, interfere no desenvolvimento morfológico e fisiológico do esôfago⁶², assim como ocasiona redução no número de neurônios e menor tamanho das células nervosas mioentéricas no segmento do intestino delgado distal, ao desmame e na adolescência⁴⁶. Efeitos gastrintestinais são verificados em cerca de 20±30% dos pacientes tratados com fluoxetina⁴⁸. Essas repercussões se justificam pelo acúmulo endógeno de 5-HT aos receptores localizados no TGI, gerando mudanças no funcionamento dos presentes receptores⁶⁹. Estudos mostram que os ISRS possuem a capacidade de antagonizar os receptores 5-HT₄, o que pode interferir na motilidade gastrintestinal^{68,69}.

Papel da serotonina no trato gastrintestinal

A atividade neuromuscular do trato gastrintestinal requer o desenvolvimento coordenado dos neurônios entéricos e células da glia, das camadas musculares lisa e das células intersticiais de cajal⁷². Os nervos do sistema nervoso entérico (SNE) efetuam o controle motor das fibras musculares lisas do sistema digestório⁵⁶. Qualquer interferência nesse mecanismo neuromuscular pode afetar o processo de transporte do bolo alimentar, que é imprescindível para a sobrevivência e o crescimento dos mamíferos¹⁷.

O SNE corresponde a uma rede neuronal complexa, que exerce forte influência na homeostase, agindo, dessa forma, no controle da tonicidade dos vasos sanguíneos do tubo digestório; na motilidade e no transporte de líquidos; e na secreção das células endócrinas intrínsecas⁷⁰. O referido sistema é formado por plexos ganglionares que se estendem do esfíncter esofágico superior ao esfíncter anal interno¹⁹. Os plexos ganglionares do SNE, plexos mioentérico e submucoso, contêm componentes neurais reflexos (neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios motores), responsáveis pelo controle do sistema motor gastrintestinal^{18,39}. O plexo mioentérico (Auerbach) é uma rede neuronal disposta entre as camadas musculares longitudinal e circular do trato gastrintestinal³⁹. Sua função primordial é a iniciação e o controle dos movimentos peristálticos, realizados pela contração das fibras musculares lisas do sistema digestório⁵⁹. Enquanto que o plexo submucoso (Meissner) é encontrado na submucosa, entre a camada muscular lisa circular e a mucosa, atuando na coordenação dos reflexos de secreção e absorção, bem como no controle motor da musculatura lisa^{39,59}.

Como no sistema nervoso central, diversos neurotransmissores e neuropeptídeos são encontrados no SNE, dentre eles a serotonina (5-HT)^{20,21}. O mencionado neurotransmissor é uma bioamina que possui ações fisiológicas variadas em diferentes sistemas do

organismo¹⁰. No desenvolvimento do SN, a serotonina influencia o final da divisão celular, bem como a diferenciação de tecidos-alvo das projeções serotoninérgicas^{8,34}. A mediação da 5-HT sobre esses eventos celulares ocorre tanto em tecidos neurais^{38,73} quanto em outros tecidos, a exemplo da musculatura lisa da artéria aorta⁵⁵ e do trato gastrointestinal²².

A serotonina possui cerca de 95% dos corpos serotoninérgicos distribuídos ao longo do TGI¹⁶. Desse percentual, aproximadamente 90% encontram-se nas células enterocromafins e 10% nos neurônios entéricos¹⁶. O 5-HT age como um neurotransmissor das funções sensório-motoras gastrintestinais¹³.

A serotonina é sintetizada no TGI pela ação de duas enzimas: a triptofano hidroxilase 1 e a triptofano hidroxilase 2³⁰. Já a inativação desse mensageiro molecular se dá por meio do mecanismo de recaptção exercido pelo transportador de serotonina (SERT)³⁰. O SERT é uma proteína da membrana plasmática que inativa e degrada a serotonina, sendo responsável pela remoção dessa amina biogênica do espaço intersticial²⁴. Esse ciclo de liberação e recaptção da serotonina deve permanecer intacto pela sua influência no controle dos reflexos motores, sensoriais e secretórios¹³. Com isso, sugere-se que modificações na sinalização de 5-HT, que afetam a disponibilidade desse neurotransmissor, podem contribuir para distúrbios na função gastrintestinal^{10,12}.

As funções exercidas pelo 5-HT no sistema digestório dependerão de uma diversidade de tipos de receptores encontrados nos neurônios entéricos, nas células enterocromafins e na musculatura lisa gastrintestinal⁶⁴. Dentre os tipos e subtipos de receptores pode-se citar os receptores 5-HT1, inibidor da liberação da acetilcolina (ACh) no TGI; o 5-HT2, situado nas células musculares lisa, efetua a contração do músculo liso; 5-HT3, responsável pela contração mediada pela estimulação dos neurônios colinérgicos⁶⁴; e o receptor 5-HT4, que exerce várias funções, dependendo da espécie e da região

anatômica⁶⁴. No esôfago de ratos, o 5-HT₄ está localizado nas células musculares lisas longitudinais, levando ao relaxamento da musculatura lisa esofágica^{2,60}.

Propõe-se que as modificações na sinalização de 5-HT resultantes das manipulações nutricionais e farmacológicas, que afetam a disponibilidade da serotonina, contribuem para a ocorrência de distúrbios na função gastrointestinal^{10,12}. No esôfago, os distúrbios motores geram sintomas como disfagia, dor torácica, regurgitação e pirose¹⁷. Na disfagia esofágica, observa-se a dificuldade na passagem do bolo alimentar pelo corpo esofágico¹⁷. Esse sintoma, dependendo de sua gravidade e frequência, pode levar os pacientes à desnutrição¹⁷, causando um impacto significativo na qualidade de vida dos indivíduos⁴.

Diante do exposto, há interferência da nutrição e do sistema serotoninérgico no desenvolvimento das estruturas pertencentes ao trato gastrointestinal, assim como dos componentes neuronais responsáveis pelo seu controle motor. É provável, portanto, que agressões ambientais incidindo no período neonatal possam interferir na maturação de estruturas neuromusculares, fundamentais para o funcionamento do sistema digestório, inclusive na vida adulta.

Conclusão

A desnutrição e/ou a inibição neonatal da recaptação de serotonina durante o período crítico da vida promovem alterações histológicas no desenvolvimento das estruturas neuromusculares do trato gastrointestinal. Esses achados sugerem que as mudanças morfológicas estão relacionadas à função regulatória da serotonina no controle motor do sistema digestório.

Referências

1. Alippi RM, Meta MD, Olivera MI, Bozzini C, Shneider P, Meta I, Bozzini C. Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible. *Arch Oral Biol* 2002; 47:47-53.
2. Baxter GS, Craig DA, Clarke DE. 5-Hydroxy-tryptamine₄ receptors mediate relaxation of the rat oesophageal tunica muscularis mucosae. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 1991; 343: 439-446.
3. Bayol S, Jones D, Goldspink G, Stickland NC. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *Br J Nutr* 2004; 91: 331–339.
4. Beattie DT, Smith JAM, Marquess D, Vickery RG, Armstrong SR, Pulido-Rios T, McCullough JL, Sandlund C, Richardson C, Mai N, Humphrey PPA. The 5-HT₄ receptor agonist, tegaserod, is a potent 5-HT_{2B} receptor antagonist in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 2004; 143:549–560.
5. Bedi KS, Birzgalis AR, Mahon M, Smart JL, Wareham AC. Early life undernutrition in rats. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and re-fed adult animals. *Br J Nutr* 1982;47(3):417-31.
6. Bozzini C, Barcelo AC, Alippi RM, Leal TL, Bozzini CE. The concentration of dietary casein required for normal mandibular growth in the rat. *J Dent Res* 1989; 68:840-842.
7. Brandão MCS, Angelis RC de, De-Souza RR, Fróes LB, Liberti EA. Effects of pre- and postnatal protein energy deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weanling rats. *Nutr Res* 2003; 23:215–223.

8. Buznicov GA, Lambert HW, Lauder JM. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res* 2001; 305: 177–186.
9. Castelucci P, Souza RR de, et al. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. *Cell Tissue Res* 2002; 310(1):1-7.
10. Cash BD, Chey WD. Review article: the role of serotonergic agents in the treatment of patients with primary chronic constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 1047–1060.
11. Chen JC, Tonkiss J, Galler JR, Volicer L. Effect of prenatal malnutrition on release of monoamines from hippocampal slices. *Life Sci* 1995; 57:1467-1475.
12. Coates MD, Mahoney CR, Linden DR et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 126:1657–64.
13. Coates MD, Johnson AC, Meerveld BGV, Mawe GM. Effects of serotonin transporter inhibition on gastrointestinal motility and colonic sensitivity in the mouse. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18:464–471.
14. Deiró TCBJ, Manhães de Castro R, Cabral Filho JE, Souza SL, Freitas-Silva SR, Ferreira LMP, Guedes RCA, Câmara VRV, Barros KMFT. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(10):1503-1509.
15. Deiró TC, Manhães-de-Castro R, Cabral-filho JE, Barreto-Medeiros JM, Souza SL, Marinho SM, Castro FM, Toscano AE, Jesus-deiró RA, Barros KM. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiol Behav* 2006; 87:338-344.

16. Doe-Young Kim MD, Michael Camilleri MD. Serotonin: A Mediator of the Brain–Gut Connection. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(10).
17. Domingues GR, Lemme EMO. Diagnóstico diferencial dos distúrbios motores esofagianos pelas características da disfagia. *Arq Gastroenterol* 2001;38(1).
18. Duncan M, Davison JS, Sharkey KA. Review article: endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 667–683.
19. Furness JB, Costa M. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 1980; 5:1-20.
20. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81(1–3):87–96.
21. Furness JB, Sanger GJ. Gastrointestinal neuropharmacology: identification of therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2(6): 609–11.
22. Galligan JJ. Electrophysiological studies of 5-hydroxytryptamine receptors on enteric neurons. *Behav Brain Res* 1996; 73: 199-201.
23. Gershon MD, Jonakait GM. Uptake and release of 5-hydroxytryptamine by enteric 5-hydroxytryptaminergic neurons: Effects of fluoxetine and chlorimipramine. *Br. J. Pharmacol* 1979; 66:7-9.
24. Gershon MD. Serotonin and its implication for the management of irritable bowel syndrome. *Rev Gastroenterol Disord* 2003; 3 (Suppl. 2): S25–34.
25. Gershon MD, Liu MT. Serotonin and neuroprotection in functional bowel disorders. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19 (Suppl. 2):19–24.
26. Gomes OA, Castelucci P, Fontes RBV, Liberti EA. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: A quantitative morphological study. *Auton Neurosci* 2006; 126-127:277-284.

27. Gregersen H, Lu X, Zhao J. Physiological growth is associated with esophageal morphometric and biomechanical changes in rats. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16:403–412.
28. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35(7):595-601.
29. Hisatomi K, Niiyama Y. Effects of postnatal undernutrition on the catecholamine and serotonin contents of suckling rat brain. *J Nutr Sci Vitaminol* 1980; 26: 279-292.
30. Hoffman B, Mezey E, Brownstein M. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science* 1991; 254:579–80.
31. Hollwarth M, Uray E. Physiology and pathophysiology of the esophagus in childhood. *Prog Pediatr Surg* 1985; 18:1–13.
32. Jolley SG, Baron HI. Disorders of esophageal function. In: O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG, editors. *Pediatric surgery*; 1998. p. 997–1005.
33. Koch A, Ruggeberg J. Function of the lower esophageal sphincter in infants. *Chir Forum Exp Klin Forsch* 1978;1978:53–7.
34. Lauder JM. Hormonal and humoral influences on brain development. *Psychoneuroendocrinology* 1983; 8(2):121-155.
35. Laurie LE. *Neurociência: fundamentos para a reabilitação*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
36. Lee YY, Park KS, Pak YK, Lee HK. The role of mitochondrial DNA in the development of type 2 diabetes caused by fetal malnutrition. *J Nutr Biochem* 2005; 16:195-204.

37. Liberti EA, Fontes RB, et al. Effects of combined pre- and post-natal protein deprivation on the myenteric plexus of the esophagus of weanling rats: a histochemical, quantitative and ultrastructural study. *World J Gastroenterol* 2007; 13(26):3598-604.
38. Liu J, Lauder JM. Serotonin promotes region-specific glial influences on cultures serotonin and dopamine neurons. *Glia* 1992; 5(4): 306-317.
39. Lomax AE, Furness JB. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res* 2000; 302:59-72.
40. Lopes-de-Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhães-de-Castro R, Bolaños-Jiménez F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci* 2008.
41. Lucas A. 1991. Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation Symposium* 156, 38–50, discussion 50–35.
42. Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. In: *Symposium: The effects of childhood diet on adult health and disease*. *J Nutr* 1998; 128:401S-406S.
43. Lucas A, Fewtrell MS, Cole TJ. Fetal origins of adult disease—the hypothesis revisited. *Bmj* 1999; 319.
44. Magalhães CP, Lima LO de, et al. Neonatal treatment effect with selective inhibitor of 5-HT recapture on [corrected] the cranium-encephalic anatomic development. *Arq Neuropsiquiatr* 2006; 64(4):990-3.
45. Manjarrez G, Manuel AL, Mercado CR, Hernandez RJ. Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. *Int J Dev Neurosci* 2003; 21(5):283–289.
46. Marinho SMOC. Efeito da manipulação neonatal do sistema serotoninérgico sobre o desenvolvimento do intestino delgado em ratos. Recife: Dissertação (Mestrado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 62p, 2004.

47. Meilus M, Natali MRM, Miranda Neto MH. Study of the myenteric plexus of the ileum of rats subjected to proteic undernutrition. *Rev Chil Anat* 1998; 16(1).
48. Messiha FS. Fluoxetine-Adverse effects and drug-drug interactions. *Clin Toxicol* 1993; 31: 603 ± 630.
49. Miranda-Neto MH de, Molinari SL, Stabille SR, Sant'ana DMG, Natali MRM. *Arq Neuropsiquiatr* 1999; 57(2-B): 387-391.
50. Mokler DJ, Galler JR, Morgane PJ. Modulation of 5-HT release in the hippocampus of 30-day-old rats exposed in utero to protein malnutrition. *Brain Res Dev Brain Res* 2003; 142(2):203–8.
51. Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz RO. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 1978; 2: 137-230.
52. Morgane PJ, Austin-Lafrance R, et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17(1):91-128.
53. Moura EG de, Lisboa PC, Custódio CM, Nunes MT, Souza K de P, Passos MCF. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 134– 139.
54. Neel JV. Diabetes mellitus: a 'thrifty' genotype rendered detrimental by 'progress'? *Am J Hum Genet* 1962; 14:353–362.
55. Nemecek GM, Coughlin SR, Handley DA, Moskovitz MA. Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:674-678.
56. Oliveira RB de. Implicações fisiológicas das funções motoras do músculo liso gastrintestinal. *REPM* 2008; 2(1): 3-13.

57. Ozanne SE, Martensz ND, Petry CJ, Loizou CL, Hales CN. Maternal low protein diet in rats programmes fatty acid desaturase activities in the offspring. *Diabetologia* 1998; 41, 1337–1342.
58. Park KS, Kim SK, Kim MS, Cho EY, Lee JH, Lee KU, Pak YK, Lee HK. Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. *J Nutr* 2003; 133(10): 3085-90.
59. Phillips RJ, Powley TL. Innervation of the gastrointestinal tract: Patterns of aging. *Auton Neurosci* 2007; 136:1–19.
60. Reeves JJ, Bunce KT, Humphrey PPA. Investigation into the 5-hydroxytryptamine receptor mediating smooth muscle relaxation in the rat oesophagus. *Br J Pharmacol* 1991; 103: 1067-1072.
61. Ross MG, Nijland MJM. Development of ingestive behavior. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1998; 274:879-893.
62. Silva HJ. Manipulação neonatal e da recaptção de serotonina em ratos: 1. Estabelecimento de protocolo para estudo murinométrico e validação; 2. Repercussões sobre a morfologia e morfometria da tûnicas musculares do esôfagoe sobre o consumo alimentar. Tese (Doutorado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 2006.
63. Sobotka TJ, Cook MP, Brodie RE. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Res* 1974; 65(3): 443–457.
64. Taniyama K, Makimoto N, Furuichi A, Sakurai-Yamashita Y, Nagase Y, Kaibara M, Kanematsu T. Functions of peripheral 5-hydroxytryptamine receptors, especially 5-hydroxytryptamine₄ receptor, in gastrointestinal motility. *J Gastroenterol* 2000; 35:575-582.

65. Toscano AE, Manhães-de-Castro R, Canon F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition* 2008; 24:270–278.
66. Toscano AE, Amorim MAF, Carvalho Filho EV de, Aragão R da S, Cabral-Filho JE, Moraes SRA de, Manhaes-de-Castro R. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? *Life Sci* 2008;82:1131–1136.
67. Tugay M, Yvldvz F, Utkan T, et al. Esophagitis impairs esophageal smooth muscle reactivity in the rat model: an in vitro study. *Dig Dis Sci* 2003;48:2147- 52.
68. Tuladhar BR, Costall B, Naylor RJ. Pharmacological characterization of the 5-hydroxytryptamine receptor mediating relaxation in the rat isolated ileum. *Br J Pharmacol* 1996; 119:303-310.
69. Tuladhar BR, Costall B, Naylor RJ. Modulation of 5-HT₄ receptor function in the rat isolated ileum by Fluoxetine: the involvement of endogenous 5-hydroxytryptamine. *Brit J Pharmacol* 2002; 136:150-156.
70. Zanin ST de M, Molinari SL, Sant’Ana D de MG, Miranda Neto MH de. *Arq Neuropsiquiatr* 2003; 61(3-A):650-653.
71. Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J Neurosci* 1996; 16:2352-2364.
72. Wallace AS, Burns AJ. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 2005; 319: 367–382.

73. Whitaker-Azmitia PM. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43 (4): 553-561.
74. Winick M, Rosso P, et al. Malnutrition and cellular growth in the brain. *Bibl Nutr Diet* 1972; 17:60-8.
75. Wong DT, Bymaster FP, Horng JS, Molloy BB. A new selective inhibitor for uptake of serotonin into synapto-somes of rat brain: 3-(p-tri-fluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *J Pharmacol Exp Therp* 1975; 193:804-811.

MATERIAIS E MÉTODOS



2. Materiais e Métodos

2.1. Animais:

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, num ciclo de luz (6:00 às 18:00 h) e escuridão (18:00 às 6:00 h) constante. Os ratos tiveram livre acesso à água filtrada e ração padrão do biotério (LABINA - Purina do Brasil, contendo 23% de proteína).

Para obtenção dos animais experimentais, foram acasalados ratos com idade entre 90 e 120 dias na proporção de um macho para 3 fêmeas. O diagnóstico da prenhez foi feito através da aferição do peso corporal a cada três dias. Confirmado o estado de gestação, as ratas foram separadas dos machos e alojadas individualmente em gaiolas-maternidade.

Um dia após o nascimento dos filhotes foram constituídas ninhadas de seis neonatos machos por mãe. Foram escolhidos os machos com peso entre 6,5 a 8,5g. Os animais foram então distribuídos entre as mães de maneira que não houvesse filhotes de uma mesma ninhada nos grupos experimentais.

Após o desmame os filhotes foram transferidos para gaiolas coletivas (até 06 animais por gaiola) e passaram a receber a dieta padrão do biotério. Segundo o tratamento imposto no período de aleitamento, os animais foram divididos em distintos grupos experimentais.

2.2. Manipulação Nutricional:

De acordo com a manipulação nutricional imposta às mães, os animais foram divididos em dois grupos:

Grupo Nutrido (N, n=39) – Composto por filhotes amamentados por nutrizes que receberam a dieta padrão utilizada no biotério, denominada “LABINA” (Agribbrands Purina do Brasil, LTDA). Essa dieta é normoprotéica e contém 23% de proteína, conforme descrito na Tabela 1.

Grupo Desnutrido (D, n=58) – Formado por filhotes amamentados por nutrizes que receberam dieta hipoprotéica, conteúdo 8% de proteína a Dieta Básica Regional – DBR, conforme Teodósio et. al.,1990. A DBR (Coutinho, 1976; Teodósio et al., 1990) foi elaborada com base em informações obtidas em inquéritos alimentares realizados pelo setor de Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os inquéritos foram feitos em populações de baixo poder aquisitivo da zona da Mata de Pernambuco. A DBR é uma dieta multideficiência. Ressalta-se a deficiência em proteína, em função da quantidade (cerca de 8%) e da qualidade (predomínio de proteína vegetal). Conforme descrito na Tabela 2. A utilização crônica da DBR no rato produz um quadro de desnutrição protéico-calórica severa semelhante à desnutrição infantil (Teodósio et al., 1990).

Tabela 1. Composição centesimal da Labina^{a,c}

Composição Centesimal (g%)					Kcal%
Proteínas	Carboidratos	Lípídeos	Cinzas	Fibras	
23,27	56,81	4,24	6,60	8,00 ^b	358,48

a: itens de enriquecimento por Kg de ração: ácido fólico (14,00 mg), antioxidante (150,00 mg), biotina (0,20 mg), cobalto (2,00 mg), cobre (30,00 mg), colina (2.800,00 mg), ferro (180,00 mg), iodo (2,00 mg), manganês (110,00 mg), niacina (242,00 mg), selênio (0,20 mg), pantotenato de cálcio (100,00 mg), piridoxina (12,00 mg), tiamina (12,00 mg), vitamina A (28.000,00 UI), vitamina B12 (44,00 mg), vitamina B2 (28,00 mg), vitamina D3 (4.400,00 UI), vitamina E (90,00 UI), vitamina K (7,00 mg), zinco (110,00 mg).

b: segundo a Agribbrands do Brasil.

c: Fonte: Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos, DN/UFPE.

Tabela 2 - Composição centesimal da Dieta Básica Regional (DBR)

Ingredientes	G%	Composição Centesimal					
		Proteína	Carboidrato	Lipídeos	Cinzas	Fibras	Kcal%
Feijão cozido e seco	18.34	3.99	10.66	0.24	0.57	1.09	60.76
Farinha de mandioca	64.81	0.84	48.59	0.12	0.43	5.64	198.80
Carne seca salgada	3.74	2.74	-	0.06	0.06	-	11.50
Gordura da carne salgada e seca	0.35	-	-	0.35	-	-	3.15
Batata doce	12.76	0.30	9.99	0.03	0.20	0.48	41.43
TOTAL	100.00	7.87	69.24	0.80	1.26	7.21	315.64

Teodósio et al., 1990.

2.3.Manipulação Farmacológica:

Os animais submetidos a manipulação nutricional foram divididos em diferentes subgrupos conforme a manipulação farmacológica estabelecida aos filhotes:

Grupo Nutrido/Salina (NS, n=21) - Composto por filhotes amamentados por nutrízes que receberam a dieta padrão utilizada no biotério, denominada “LABINA” (contém 23% de proteína) e tratados com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%, 1ml/100g de peso corporal, via subcutânea;

Grupo Nutrido/Sertralina (NSert, n=18) - Composto por filhotes amamentados por nutrízes que receberam a dieta padrão utilizada no biotério, denominada “LABINA” (contém 23% de proteína) e tratados com Sertralina com doses de 10 mg/Kg pc, 1ml/100g de peso corporal, via subcutânea;

Grupo Desnutrido/Salina (DS, n=38) - Formado por filhotes amamentados por nutrízes que receberam uma dieta hipoprotéica, contendo 8% de proteína (Dieta Básica Regional – DBR) e tratados com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%, 1ml/100g de peso corporal, via subcutânea;

Grupo Desnutrido/Sertralina (DSert, n=20) - Formado por filhotes amamentados por nutrízes que receberam uma dieta hipoprotéica, contendo 8% de proteína (Dieta Básica

Regional – DBR) e tratados com Sertralina com doses de 10 mg/Kg pc, 1ml/100g de peso corporal, via subcutânea;

Os tratamentos foram aplicados diariamente entre as 12 e 14 horas do 1º ao 21º dia de vida.

2.4. Delineamento Experimental:

Durante o período de aleitamento foi obtida a evolução ponderal. E, nos animais que foram sacrificados aos 22 ou 90 dias de vida, foi realizado o estudo do desenvolvimento, onde foram obtidas as seguintes medidas: tamanho e peso da porção proximal do esôfago; área e perímetro das fibras musculares longitudinais; número total de neurônios do plexo mioentérico; relação entre o número de neurônios do plexo mioentérico e a área das fibras musculares longitudinais; e, a relação entre o número de neurônios do plexo mioentérico e o perímetro das fibras musculares longitudinais.

2.4.1. Evolução Ponderal:

A aferição do peso corporal foi realizada diariamente, do 1º ao 21º dia, e no 30º, 40º, 50º, 60º, 70º, 80º e 90º dias pós-natal, entre 12:00 e 14:00 horas. Foi utilizada balança eletrônica digital, marca Marte AS 1000C, classe II, capacidade máxima 1000g (menor divisão 0,01g).

2.4.2. Estudo do desenvolvimento:

Aos 22 ou 90 dias de idade, os animais foram pesados (Fig. 1A) e anestesiados com solução de uretana a 12,5% e cloralose a 0,5% através de injeção intraperitoneal (0,01 ml/g

de peso corporal) (Fig. 1B). Sob efeito do anestésico, era medido o eixo longitudinal do corpo do animal (comprimento do focinho até a base da cauda) (Fig. 1C). Em seguida, realizada a abertura da cavidade torácica e posterior coleta do esôfago da junção faringo-esofágica até a junção gastroesofágica. Para isso, cada animal foi colocado em superfície plana de parafina, em decúbito dorsal, tendo suas patas fixadas através de agulhas. Foi realizada uma incisão na cavidade torácica e removido o esôfago completamente, da junção faringo-esofágica até a junção gastroesofágica, onde foi realizada a mensuração do comprimento total e da porção proximal do esôfago (EES à porção média) (Fig. 1D), através de paquímetro de aço inoxidável (Starret), bem como obtido o peso dessa parte superior do órgão em balança de precisão (Fig 1E).

Ao ser medida e pesada, a porção proximal do esôfago foi imersa, para sua fixação, em folmol tamponado a 10%. Depois de fixado, foi desidratado em uma bateria crescente de álcoois (70° a 100°), diafanizado em xilol e incluído em parafina. Foram realizados cortes transversais do esôfago com 5 micrômetros de espessura, e, posteriormente, corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan-Merck). A coloração de HE foi realizada inicialmente para localização dos neurônios do plexo mioentérico.

Após a coloração referida acima, foi realizada a impregnação com Nitrato de Prata contra-corada com HE para evidênciação e confirmação dos neurônios mioentéricos. A presente técnica possibilitou a análise morfométrica das fibras musculares longitudinais do esôfago e da população de neurônios do plexo mioentérico.

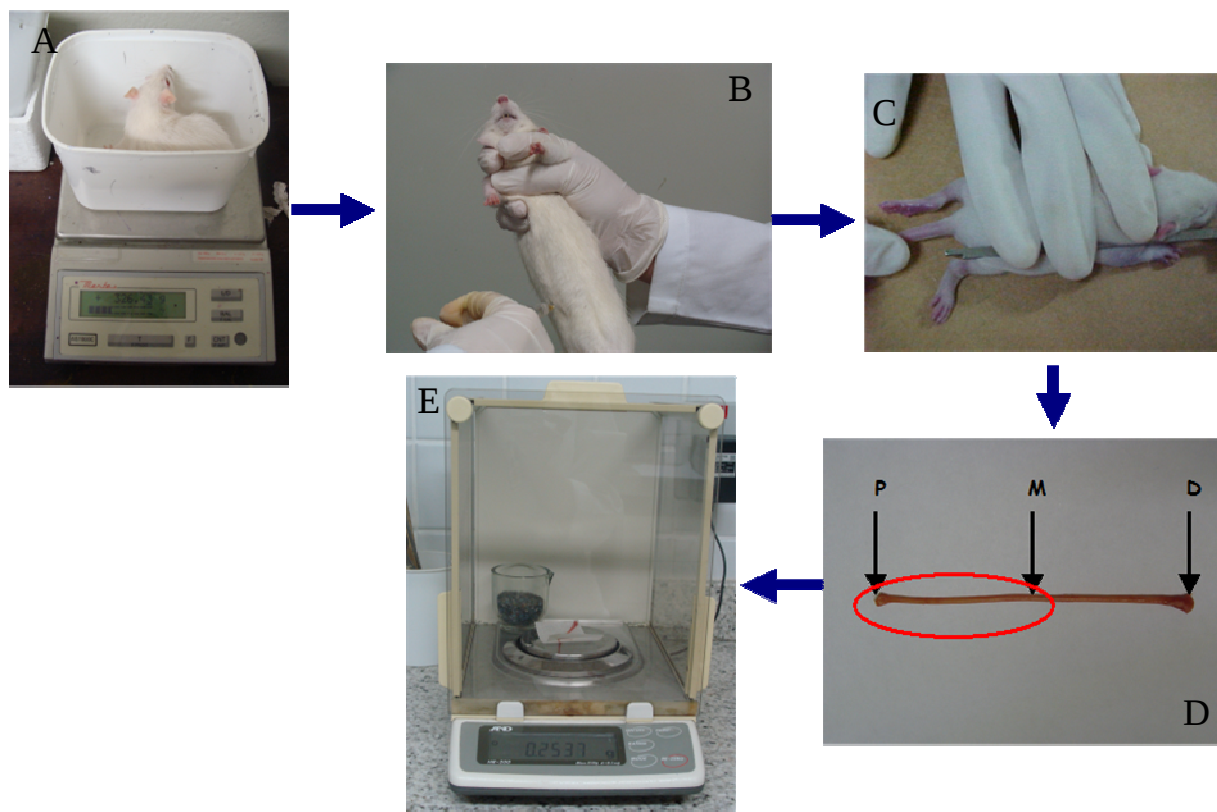


Fig 1. Procedimentos - Estudo do desenvolvimento. (A) Aferição do peso corporal. (B) Aplicação do anestésico. (C) Medida do eixo longitudinal do corpo - ELC. (D) Esôfago coletado da junção gastroesofágica até a junção faringoesofágica. (E) Aferição do peso da porção proximal do esôfago.

O método de impregnação com Nitrato de prata utilizado consistiu na colocação do material por 10 minutos na estufa para desparafinização. Depois de desparafinizado, o material histológico foi submerso por 5 minutos em xilol, seguido por 1 minuto em uma bateria decrescente de álcoois (100%, 90% e 70%). Posteriormente, foi imerso em ácido periódico por 10 minutos, seguido por água destilada, com posterior colocação no nitrato de prata em banho maria. Após a reação desejada com nitrato de prata, o material retornou para a água destilada (três banhos) e depois seguiu para o tiosulfato por 2 minutos. Em seguida, foi imerso em água corrente por 5 minutos seguido pela contra-coloração com HE. Depois de contra-corado, passou por uma bateria crescente de alcóois (1 banho), seguido pela imersão no xilol e posterior montagem entre lâmina e lamínula com resina sintética

(Entellan-Merck).

Para avaliar a área e o perímetro das células musculares, campos microscópicos de cada secção foram analisados em um microscópio de luz (Leica, objetiva 40x) conectado a um computador (Fig 2). Imagens de 30 células musculares foram capturadas de cada preparação para posterior análise no software Scion Image Beta 4.0.2 (Fig 3).



Fig 2. Análise morfométrica - microscópio de luz conectado a um computador.

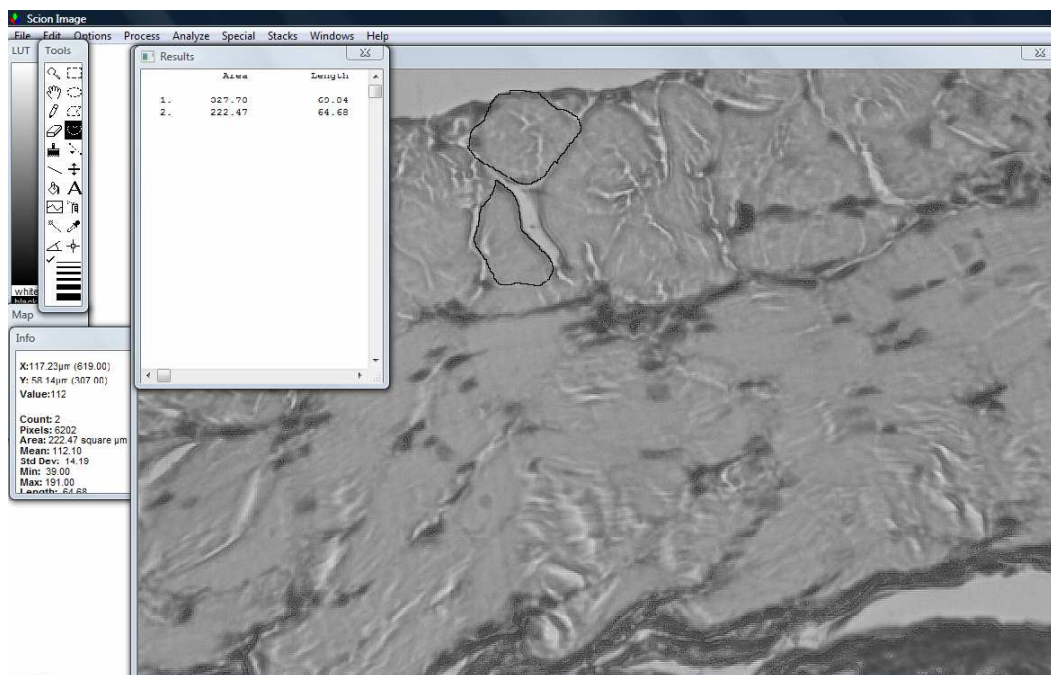


Fig 3. Software Scion Image Beta 4.0.2 – Análise morfométrica das células musculares da porção proximal do esôfago.

Para análise do número total de neurônios do plexo mioentérico da porção proximal do esôfago impregnados com nitrato de prata, campos microscópicos de cada secção foram analisados em um microscopio de luz (Leica, objetiva 40x) conectado a um computador (Fig 2). Imagens da circunferência total da porção proximal do esôfago foram capturadas de cada preparação para posterior análise no software Mesurim (Fig 4).

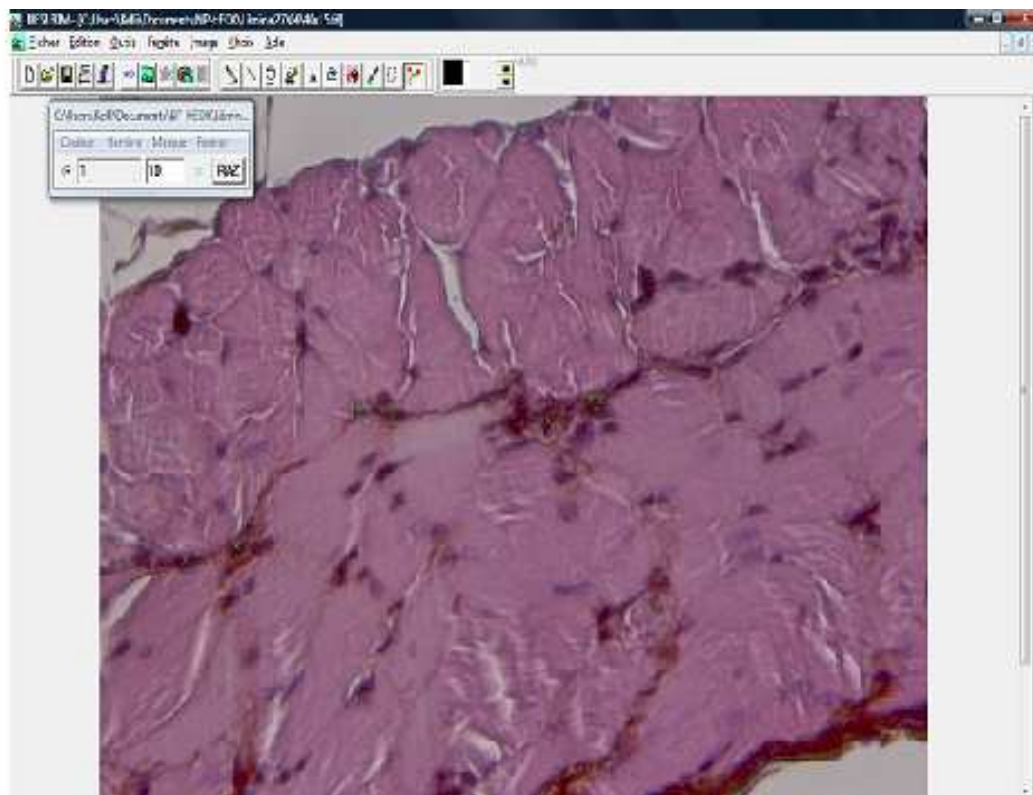


Fig 4. Software Mesurim – Análise morfométrica dos neurônios mioentéricos da porção proximal do esôfago.

O ANOVA Two-Way medidas repetidas foi realizado para o peso corporal. Para análise dos parâmetros de tamanho e peso do esôfago; área e perímetro das fibras musculares longitudinais; número de neurônios mioentérico da porção superior do esôfago; e as possíveis relações alométricas, foi efetuado o ANOVA Two-Way. Como teste post-hoc foi utilizado o Tukey. A significância estatística foi considerada, admitindo-se um nível crítico de 5% em todos os casos. Todos os dados são apresentados como média±EPM.

O protocolo experimental deste estudo (processo nº 018130/2007-03) (ANEXO C) foi aprovado pelo comitê de ética de experimentação animal (CEEa) da Universidade Federal de Pernambuco, de acordo com o Instituto Nacional de guia de saúde para cuidado e uso de animais de laboratório.

RESULTADOS



3.Resultados (Artigo Original)

Do serotonergic system manipulation program changes in the neuromuscular development of the esophagus?

Ferraz-Pereira, KN^a; Vitoriano, ILS^a; Melo, MPP^a; Leite, SP^b; Silva, S^b; Toscano, AE^a;

Silva, HJ^c; Manhães-de-Castro, R^a

Abstract

Stimuli or insults that occur during critical periods of development of the nervous system can result in persistent changes in the structure and function of the body. In this study, the effects of malnutrition and/or inhibition of serotonin reuptake during the postnatal period on the neuromuscular development of the esophagus were investigated in rats. The animals were divided into two groups, nourished or malnourished. Pharmacological manipulation was performed during the period of lactation. The animals were divided into two subgroups (saline or sertraline). Rats were weighed and sacrificed for removal of the esophagus on days 22 or 90. The total length of the esophagus was measured, and it was then divided into two portions of equal length. The proximal portion was sectioned for staining (Hematoxylin/eosin and impregnation by silver nitrate). Malnutrition and/or the action of neonatal sertraline appear to have been responsible for reducing body weight during lactation and after the period of nutritional recovery. The early protein restriction and the use of neonatal sertraline had impacts on the size and weight of the esophagus in animals on day 22. The nutritional manipulation caused persistent changes in both age groups that were studied in the area and the perimeter of the muscle fibers. Both insults caused a decrease in the number of myenteric neurons. Malnutrition and/or the use of selective serotonin reuptake inhibitors seem to result in neuromuscular changes in the morphology of the esophagus.

Keywords: malnutrition; serotonin, sertraline, muscle fibers; myenteric plexus, esophagus.

Introduction

There are critical periods in the development of the nervous system that are vulnerable to environmental insults (Winick, 1972; Morgane, 1978; Morgane, 1993). During these stages, early stimuli or insults may result in persistent changes in the structure and function of the body (Lee et al., 2005). This phenomenon, which is known as programming, may be responsible for the establishment of diseases in adulthood (Harding, 2001).

In rats, pre- and postnatal care are essential to the development of the gastrointestinal tract, which begins in embryogenesis and extends up to the period of weaning, about 21 days postnatally (Koch, Ruggeberg, 1978; Hollwarth, Uray, 1985, Jolley, Baron, 1998, Ross, Nijland, 1998). During such critical phases of life, damage to the smooth muscle contributes to changes in esophageal motor function (Tugay et al., 2003). It is therefore suggested that the characteristics of an active esophagus, such as longitudinal and circumferential strain, depend on its morphology and passive properties, such as the internal and external circumferential length and the thickness and area of mucosa and muscle layers (Gregersen, Lu, Zhao, 2004), as well as on the development of the ENS, which also undergoes further growth and development in this stage of life (Gershon, Liu, 2007).

Malnutrition and/or the administration of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in the early stages of development lead to permanent damage to the structures and functions of various systems of the body (Lucas, Fewtrell, Cole, 1999, Hales, Baker, 1992; Marinho, 2004; Magalhães et al., 2006; Liberti et al., 2007; Lopes-de-Souza et al., 2008). In the digestive system, these changes may compromise the functioning of the neuromuscular structures that belong to the gastrointestinal tract, possibly interfering in the

process of transporting the food bolus, which is essential to acquire nutrients (Coates et al., 2004; Cash, Chey, 2005).

This article aims to investigate whether malnutrition and/or inhibition of serotonin reuptake can lead to structural changes in the neuromuscular development of the esophagus in rats. This study will test the hypothesis that malnutrition and/or the administration of a serotonin reuptake inhibitor during the period of lactation will cause adaptive changes in the structural development of the longitudinal smooth muscle and neurons in the myenteric plexus of the esophagus.

Materials and Methods:

Albino rats of the Wistar strain that were established from a colony from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco (Brazil) were mated to obtain the experimental animals. Within 24 hours of their birth, litters were made up of six male newborns by mothers that were chosen at random. The animals were kept in a controlled environment with a temperature of $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ in a constant cycle of light (6:00 a.m. to 6:00 p.m.) and darkness (6:00 p.m. to 6:00 a.m.). The animals had free access to filtered water and standard animal feed (Labini - Purina of Brazil, containing 23% protein).

The rats were divided into two groups, which were nourished (N, n=39) and undernourished (D, n=58). The D animals were malnourished during lactation by suckling from mothers who received a hypoproteic diet with only 8% protein, which was the Regional Basic Diet (RBD) (Teodosio et. al., 1990). The N animals suckled from mothers who received a normal diet with 23% protein, which was the standard diet used in the vivarium (Labina - Agribands Purina of Brazil, LTDA). After weaning, which was at 21

days, all pups were fed a normal diet, which had a level of 23% protein, until the final days of the experiment.

The pharmacological manipulation included treatment with Sertraline once a day from the first day to the twenty-first day after birth. Members of the different nutritional groups were divided into two subgroups. The sub-nourished sertraline (NSert, n=18) and malnourished-sertraline (DSert, n=20) groups were treated with sertraline (10 mg/kg body weight, subcutaneously). Sertraline, which was obtained in salt form, was dissolved in saline and injected subcutaneously at a volume of 1 ml/100 g body weight. The sub-nourished saline (NS, n=21) and malnourished-saline (DS, n=38) groups received an equivalent volume of saline, which was in the form of a 0.9% solution of sodium chloride. The weight of each offspring was assessed to day after birth (day 1) until the period of weaning (day 21), and again at the ages of 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 days. Animals from each group were weighed and sacrificed at 22 or 90 days of age. The following parameters were measured: size and weight of the proximal portion of the esophagus, the area and perimeter of the longitudinal muscle fibers, the total number of neurons in the myenteric plexus, the relation between number of neurons and area of the muscle cells and the relationship between the number of neurons in the myenteric plexus and the perimeter of the muscle fibers.

The animals were weighed on a digital electronic scale and anesthetized with a solution of 12.5% urethane and 0.5% cloralose by intraperitoneal injection (0.01 ml/g body weight). Under the effects of anesthesia, the longitudinal axis of the body, which was the length of the snout to base of the tail, was measured. After the longitudinal axis was measured, an opening was made in the chest cavity, and the region of the esophagus from the pharynx-esophageal junction to the gastroesophageal junction was subsequently

collected. In order to perform this extraction, each animal was placed on flat surface of paraffin, in the supine position, with their feet fixed by needles. An incision was made in the thoracic cavity, and the esophagus was completely removed. This allowed the length and the proximal portion of the esophagus (ESS to the middle portion) to be measured via a stainless steel caliper . In addition, the weight of the upper body in precise balance was obtained.

The proximal portion of the esophagus was immersed in buffered folmol in order for it to be measured and weighed. After it was set, the esophagus was dehydrated in a gradient of alcohol (70% to 100%) and placed immediately into xylol and paraffin. Transverse sections were made of the esophagus that were 5 microns thick, and they were subsequently stained with hematoxylin and eosin (HE) and mounted between slides with synthetic resin (Entellan - Merck). The HE staining was initially performed in order to locate the neurons of the myenteric plexus. After the neurons were located, the slides were impregnated with silver nitrate and counter-stained with HE in order to illustrate and confirm of these neurons. Morphometric analysis was performed on the longitudinal muscle fibers and neurons in the myenteric plexus of the proximal portion of the esophagus.

For analysis of the total number of neurons in the myenteric plexus of the proximal portion of the esophagus that was impregnated with silver nitrate, thirty microscope fields from each section were analyzed under a light microscope (Leica, 40x objective) that was connected to a computer. Images of the total circumference of the proximal portion of the esophagus were taken from each preparation for later analysis by the software Mesurim.

To evaluate the area and perimeter of the muscle cells, thirty microscope fields from each section were analyzed under a light microscope (Leica, 40x objective) that was

connected to a computer. Images of thirty muscle cells were taken from each preparation for later analysis in the software Scion Image Beta 4.0.2.

The repeated measures two-way ANOVA was performed for body weight. The two-way ANOVA included the parameters of size and weight of the esophagus, the area and perimeter of the longitudinal muscle fibers, the number of myenteric neurons of the upper portion of the esophagus and the possible allometric relationships. In addition, post-hoc Tukey was used. Statistical significance was considered to be at a critical level of 5% in all cases.

The experimental protocol of this article (Case 018130/2007-03) was approved by the ethics committee for animal experimentation (EAEC) at the Federal University of Pernambuco, according to the National Institutes of Health guide for care and use of laboratory animals.

Results

Manipulation of nutritional and/or pharmacological factors ($F_{(3,781)}=107.45$, $p<0.001$), age ($F_{(11,781)}=3758.52$, $p<0.0001$) and the manipulation and interaction with age ($F_{(33,781)}=25.60$, $p<0.0001$) all showed differences in the body weight of the animals. The rats in DS ($q=5.607$, $p<0.0001$) and DSert ($q=4.301$, $p=0.013$) groups had lower body weight starting from the 14th day of life when they were compared with the rats in NS and NSert groups, respectively. The DSert ($q=5.969$, $p<0.001$) and NSert groups ($q=3.755$, $p=0.040$) had lower body weights when compared with the groups that were treated with the saline solution on both days 50 and 70 (Fig 1).

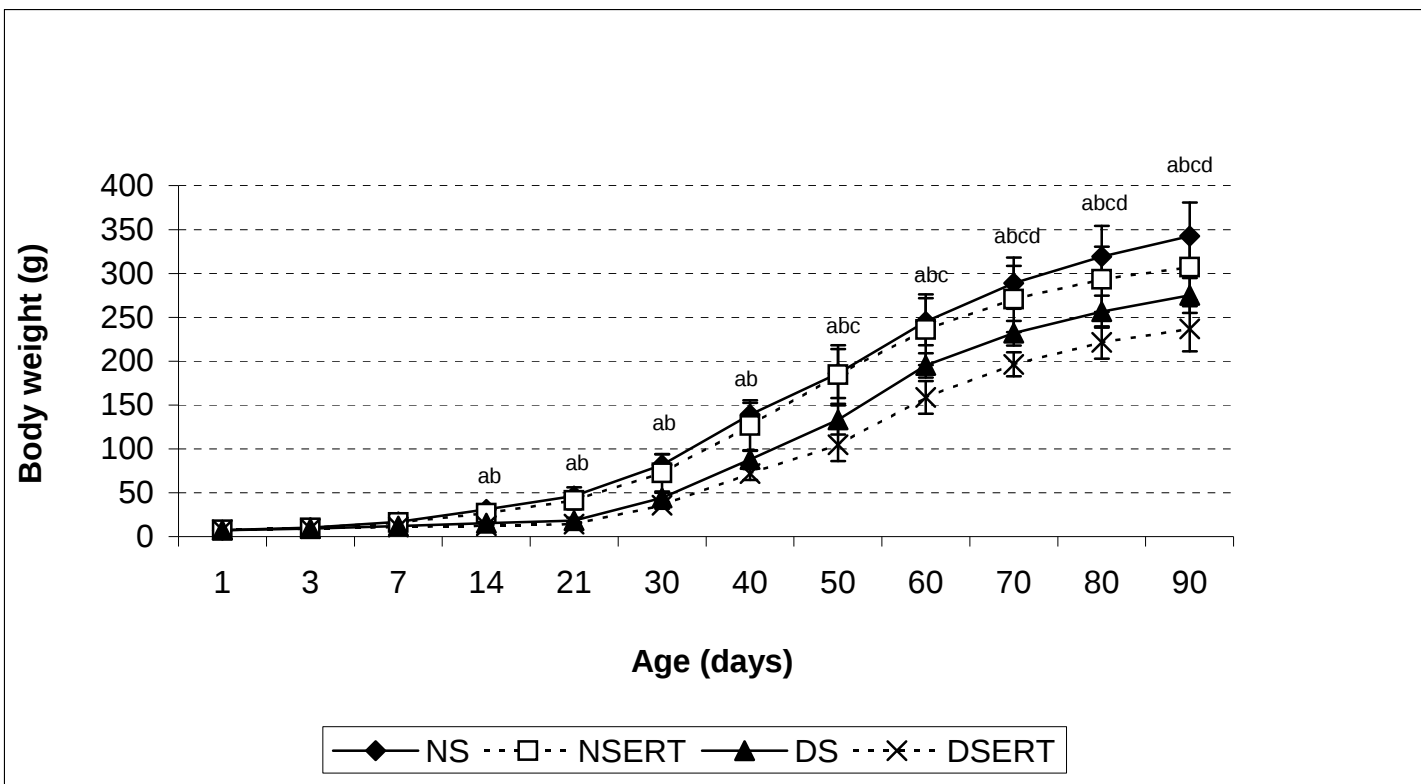


Fig 1. Effect of malnutrition and/or pharmacologic manipulation of the serotonergic system on the curve of body weight. The rats were subjected to nutritional manipulation (nourished or malnourished) and/or drug (sertraline 10 mg/kg bw or sodium chloride at 0.9%, 1ml/100g bw) during the period of lactation (two-way repeated measures ANOVA). The data are represented in mean±SEM. Multiple comparisons (Tukey test) - $p < 0.05$: a-NS vs DS b-NSert vs DSert c-DS vs DSert d-NS vs NSert.

Tables 1 and 2 present the parameters that were evaluated for the esophagus on days 22 and 90, respectively. For the weight of the upper portion of the esophagus on day 22, the diet effect ($F_{(1,51)}=51.598$, $p<0001$) led to differences in body weight, but neither the drug effect ($F_{(1, 51)}=0.0760$, $p= 0784$) nor the interaction between the two factors (diet vs. drugs) ($F_{(1,51)}=1.204$, $p=0.278$) led to any differences in body weight. On day 90, the diet effect ($F_{(1,40)}=0.574$, $p=0.453$), the drug effect ($F_{(1,40)}=3.063$, $p=0.088$) and the interaction of diet and drug ($F_{(1,40)}=0.000951$, $p=0.976$) showed no difference in the weight of the upper portion of the esophagus. On day 22, the rats in groups DS and DSert had a lower weight of the proximal portion of the esophagus when compared to groups NS and

NSert, respectively. On day 90, there were no differences among any of the groups for the weight of the proximal portion of the esophagus.

With regard to the size of the upper portion of the esophagus on day 22, the diet effect ($F_{(1,51)}=118.594$, $p<0001$) and the drug effect ($F_{(11,51)}=11.641$, $p=0.001$) showed differences, but there was no diet vs. drug interaction ($F_{(1,51)}=0.735$, $p=0.395$). The DS group on day 22 showed a reduction in the size of the esophagus when compared to the NS group. The DSert group on day 22 also had a smaller size when compared with both the NSert and DS groups. On day 90, the diet effect ($F_{(1,40)}=0.0101$, $p=0.921$), the drug effect ($F_{(1,40)}=0.575$, $p=0.453$) and the interaction of diet vs. drug ($F_{(1,40)}=0.0722$, $p=0.790$) showed no differences in the size of the esophagus.

With regard to the area and perimeter of the longitudinal muscle fibers on day 22, a difference was observed for the diet effect (area - $F_{(1,17)}=36.666$, $p<0.001$ / perimeter - $F_{(1,17)}=33.406$, $p<0001$) but not for the drug effect (area - $F_{(1,17)}=0.0150$, $p=0.904$ / perimeter - $F_{(1,17)}=0.000638$, $p=0.980$) nor the interaction of diet vs. drug (area - $F_{(1,17)}=2.073$, $p=0.172$ / perimeter - $F_{(1,17)}=2.701$, $p=0.123$). On day 90, a difference was still observed for the diet effect (area - $F_{(1,18)}=26.161$, $p<0,001$ / perimeter - $F_{(1,18)}=26.753$, $p<0001$) and still not for the drug effect (area - $F_{(1,18)}=0.534$, $p=0.476$ / perimeter - $F_{(1,18)}=0.534$, $p=0.476$) nor the interaction of diet vs. drugs (area - $F_{(1,18)}=0.149$, $p=0.705$ / perimeter - $F_{(1,18)}=0.00360$, $p=0.953$). The muscle cells of the DS and DSert groups had lower area and perimeter when compared to the NS and NSert groups, respectively, at both the ages that were studied.

With regard to the total number of myenteric neurons in the proximal portion of the esophagus that were impregnated with silver nitrate on day 22, the diet effect showed differences ($F_{(1,19)}=5.261$, $p=0.036$), but the drug effect ($F_{(1,19)}=0.358$, $p=0.558$) and the

interaction of diet vs. drug ($F_{(1,19)}=0.0311$, $p=0.862$) did not show any differences. On day 90, the drug effect showed a difference ($F_{(1,19)}=13.906$, $p=0.002$), but the diet effect ($F_{(1,19)}=0.0204$, $p=0.888$) and interaction of diet vs. drug ($F_{(1,19)}=0.550$, $p=0.469$) did not show a difference (Fig 3). On day 22, a lower number of neurons in the DS (Fig 3C) and DSert groups (Fig 3D) was observed when compared to the NS (Fig 3A) and NSert groups, respectively (Fig 3B). On day 90, there was a smaller population of neurons in the DSert (Fig 3H) and NSert groups when compared to the DS (Fig 3G) and NS groups, respectively.

Table 1. Effect of malnutrition and/or manipulation of the serotonergic system on the parameters macroscopes and microscopes of the upper portion of the esophagus in animals sacrificed on days 22. The rats were subjected to nutritional manipulation (nourished or malnourished) and/or drug (sertraline 10 mg/kg bw or sodium chloride at 0.9%, 1ml/100g bw) during the period of lactation (two-way ANOVA). The data are represented in mean $\pm$ SEM.

Parameters	Experimental Groups				ANOVA	
	NS	NSert	DS	DSert	F	P
Weight of the esophagus (g)	0,014 $\pm$ 0,002 (n=9)	0,013 $\pm$ 0,001 (n=10)	0,006 $\pm$ 0,0004 ^a (n=21)	0,007 $\pm$ 0,001 ^b (n=12)	Diet=51,598 Drug=0,0760 DietxDrug=1,204	<0,001 0,784 0,278
Size of the esophagus (mm)	21,8 $\pm$ 0,7 (n=10)	19,9 $\pm$ 0,5 ^a (n=10)	16,7 $\pm$ 0,2 ^a (n=21)	15,6 $\pm$ 0,4 ^{b,c} (n=12)	Diet=118,594 Drug=11,641 DietxDrug=0,735	<0,001 0,001 0,395
Area of the muscle fibers (μm)	45,3 $\pm$ 6,0 (n=4)	50,7 $\pm$ 4,3 (n=4)	29,3 $\pm$ 1,5 ^a (n=5)	24,8 $\pm$ 1,6 ^b (n=5)	Diet=36,666 Drug=0,0150 DietxDrug=2,07	<0,001 0,904 0,172
Perimeter of the muscle fibers (μm)	26,7 $\pm$ 1,6 (n=4)	28,6 $\pm$ 1,6 (n=4)	21,9 $\pm$ 0,6 ^a (n=5)	20,0 $\pm$ 0,7 ^b (n=5)	Diet=33,406 Drug=0,000638 DietxDrug=2,70	<0,001 0,980 0,123
Total number of myenteric neurons	211,6 $\pm$ 21,7 (n=4)	220,2 $\pm$ 30,9 (n=4)	161,2 $\pm$ 10,8 ^a (n=5)	177,0 $\pm$ 11,1 ^b (n=5)	Diet=5,261 Drug=0,358 DietxDrug=0,0311	0,036 0,558 0,862

Multiple comparisons (Tukey test) - $p<0.05$: a-Comparison with the NS group, b-Comparison with the NSert group c-comparison with the DS group.

Table 2. Effect of malnutrition and/or the manipulation of the serotonergic system on the parameters macroscopes and microscopes of the upper portion of the esophagus in animals sacrificed on days 90. The rats were subjected to nutritional manipulation (nourished or malnourished) and/or drug (sertraline 10 mg / kg bw or sodium chloride at 0.9%, 1ml/100g bw) during the period of lactation (two-way ANOVA). The data are represented in mean $\pm$ SEM.

Parameters	Experimental Groups				ANOVA	
	NS	NSert	DS	DSert	F	P
Weight of the esophagus (g)	0,08 $\pm$ 0,005 (n=11)	0,07 $\pm$ 0,004 (n=8)	0,07 $\pm$ 0,002 (n=15)	0,07 $\pm$ 0,004 (n=7)	Diet=0,574 Drug=3,063 DietxDrug=0,000951	0,453 0,088 0,976
Size of the esophagus (mm)	36,6 $\pm$ 1,0 (n=11)	35,4 $\pm$ 0,9 (n=8)	36,2 $\pm$ 0,9 (n=15)	35,6 $\pm$ 1,4 (n=7)	Diet=0,0101 Drug=0,575 DietxDrug=0,0722	0,921 0,453 0,790
Area of the muscle fibers (μm)	302,1 $\pm$ 30,4 (n=5)	331,6 $\pm$ 34,8 (n=4)	154,2 $\pm$ 15,6 ^a (n=5)	134,8 $\pm$ 5,0 ^b (n=5)	Diet=26,161 Drug=0,534 DietxDrug=0,149	<0,001 0,476 0,705
Perimeter of the muscle fibers (μm)	71,9 $\pm$ 3,2 (n=5)	75,6 $\pm$ 2,6 (n=4)	50,3 $\pm$ 2,6 ^a (n=5)	48,6 $\pm$ 0,5 ^b (n=5)	Diet=26,753 Drug=0,534 DietxDrug=0,00360	<0,001 0,476 0,953
Total number of myenteric neurons	442,2 $\pm$ 24,2 (n=5)	356,4 $\pm$ 35,1 ^a (n=4)	459,4 $\pm$ 14,9 (n=5)	331 $\pm$ 35,4 ^c (n=5)	Diet=0,0204 Drug=13,906 DietxDrug=0,550	0,888 0,002 0,469

Multiple comparisons (Tukey test) - $p < 0.05$: a-Comparison with the NS group, b-Comparison with the NSert group c-comparison with the DS group.

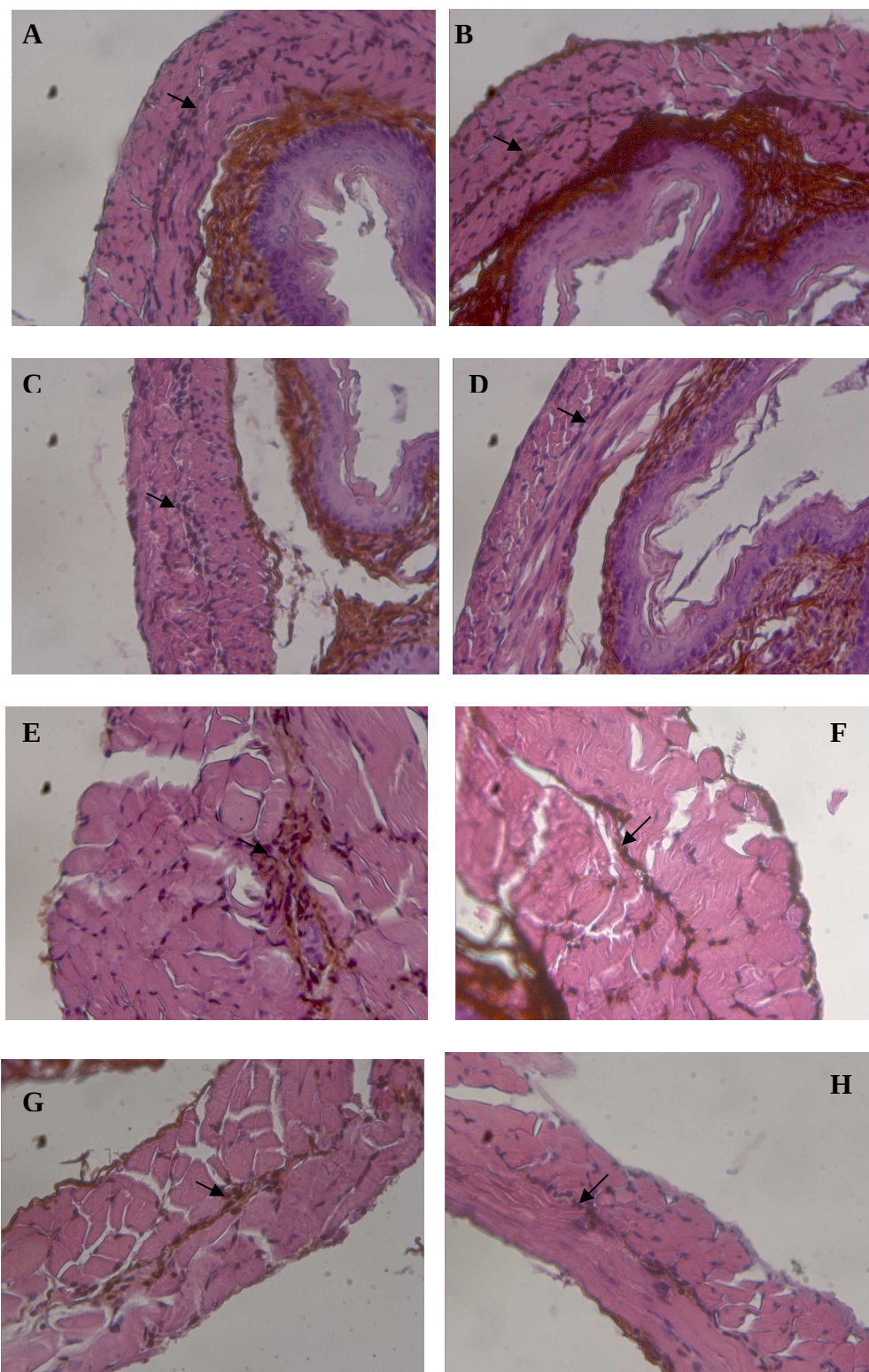


Fig 2. Myenteric neurons impregnated by silver nitrate in rats subjected to malnutrition and/or manipulation of the serotonergic system during the period of lactation. A, B, C and D correspond respectively to the NS, NSert, DS and DSert groups on days 22. E, F, G and H refer to the NS, NSert, DS and DSert groups on days 90 (two-way ANOVA). The arrows indicate the neurons of the myenteric plexus impregnated with silver nitrate.

Figure 3 shown the relationship between the total number of neurons in the myenteric plexus and the area of the esophageal longitudinal muscle fibers on days 22 and 90. With regard to this relationship on day 22, the diet effect showed differences ($F_{(1,17)}=4.912$, $p=0.044$), but the drug effect ($F_{(1,17)}=1.063$, $p=0.320$) and the interaction of diet vs. drug ($F_{(1,17)}=1.506$, $p=0.240$) did not show any differences. On day 90, the diet effect again showed a difference ($F_{(1,18)}=27.921$, $p<0001$), and the drug effect ($F_{(1,18)}=3.798$, $p=0.070$) and the interaction of diet vs. drug ($F_{(1,18)}=0.398$, $p=0.538$) also did not show any differences. The ratio was higher in the DS group when compared to the NS group on days 22 and 90. The ratio was also higher in the DSert group when compared to the NSert group on days 22 and 90.

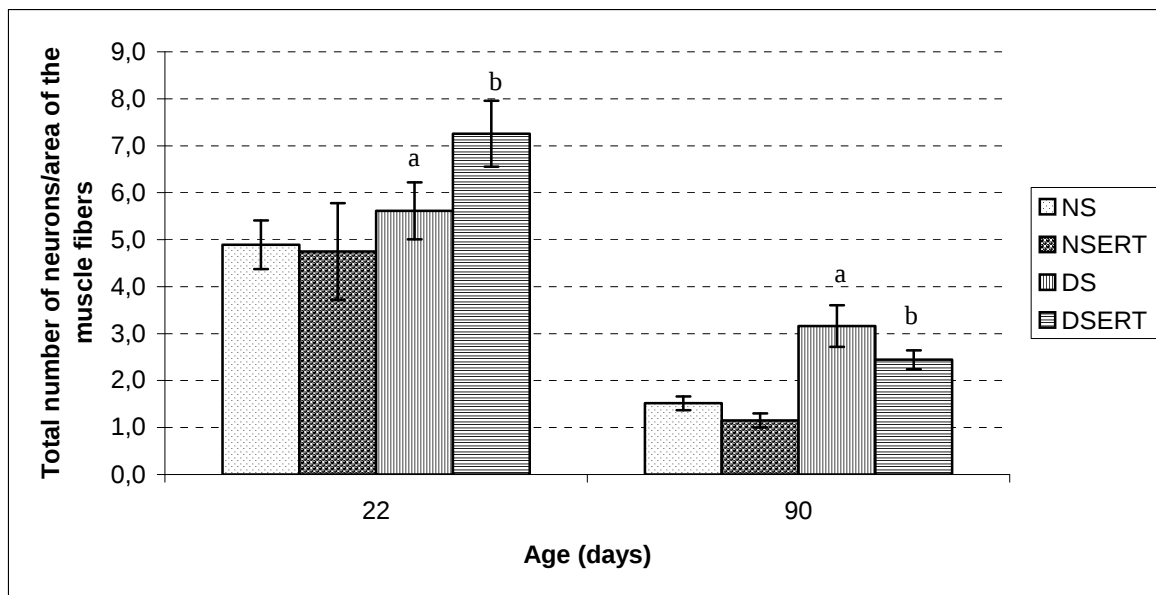


Fig 3. Effect of malnutrition and/or manipulation of the serotonergic system on the relationship between the number of neurons in the myenteric plexus and the area of longitudinal muscle fibers in animals sacrificed on days 22 or 90. The rats were subjected to nutritional manipulation (nourished or malnourished) and/or drug (sertraline 10 mg/kg bw or sodium chloride at 0.9%, 1ml/100g bw) during the period of lactation (two-way ANOVA). The data are represented in mean $\pm$ SEM. Multiple comparisons (Tukey test) - $p<0.05$: a-Comparison with the NS group, b-Comparison with the NSert group c-comparison with the DS group, d-Comparison with the DSert group.

Figure 4 present the relationship between the total number of neurons in the myenteric plexus and the perimeter of the esophageal longitudinal muscle fibers on days

22 and 90. On day 22, the diet effect ($F_{(1,17)}=0.00165$, $p=0.968$), the drug effect ($F_{(1,17)}=0.686$, $p=0.422$) and the interaction of diet vs. drug ($F_{(1,17)}=0.498$, $p=0.492$) showed no difference. On day 90, the diet ($F_{(1,18)}=15.570$, $p=0.001$) and drug effects ($F_{(1,18)}=8.967$, $p=0.009$) showed differences, but there was no interaction of diet vs. drug ($F_{(1,18)}=1.029$, $p=0.326$). There was a higher ratio in the DS and DSert groups when compared to the N and NSert groups, respectively. The NS and DS groups showed a higher ratio when compared to the NSert and DSert groups, respectively.

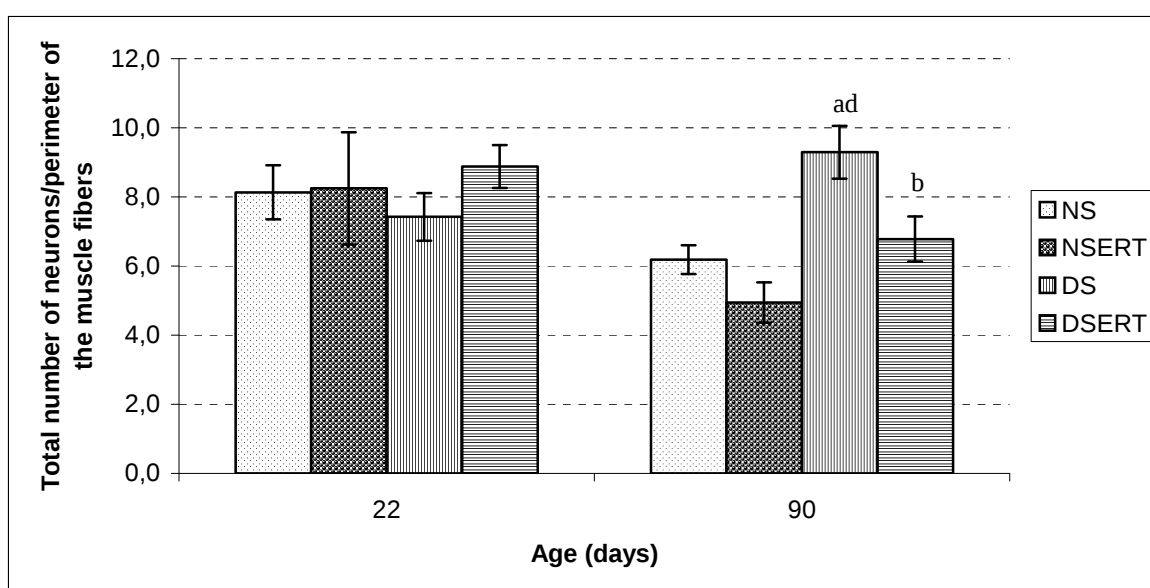


Fig 4. Effect of malnutrition and/or manipulation of the serotonergic system on the relationship between the number of neurons in the myenteric plexus and the perimeter of longitudinal muscle fibers in animals sacrificed on days 22 or 90. The rats were subjected to nutritional manipulation (nourished or malnourished) and/or drug (sertraline 10 mg / kg bw or sodium chloride at 0.9%, 1ml/100g bw) during the period of lactation (two-way ANOVA). The data are represented in mean $\pm$ SEM. Multiple comparisons (Tukey test) - $p < 0.05$: a-Comparison with the NS group, b-Comparison with the NSert group c-comparison with the DS group, d-Comparison with the DSert group.

Discussion

In this study, it was demonstrated that the manipulations that were imposed during the lactation period promoted changes in body weight and the parameters that were analyzed in the proximal portion of the esophagus, which included size, weight, area and perimeter of the longitudinal muscle fibers and total number of neurons in the myenteric

plexus. Malnutrition during this critical period of development was responsible for reducing body weight during the time in which the experimental treatments were performed, and the malnutrition persisted even after the period of nutritional recovery. When the manipulation of the serotonergic system through the administration of SSRIs was associated with malnutrition, a greater difference was observed in the weight of the animals.

Malnutrition and Sertraline, which was the serotonin reuptake inhibitor, had a considerable impact on the size and weight of the proximal portion of the esophagus in animals on day 22. On day 90, however, there were no changes in these parameters.

These findings are in agreement with the observations of Toscano et al. (2008). These authors observed that malnutrition during lactation reduced body weight and the weight of the heart over the short term (Toscano et al., 2008). In addition, they observed that the administration of fluoxetine, which is an SSRI, caused a decrease in growth of the heart on day 30, with a subsequent recovery (Toscano et al., 2008).

Silva (2006) observed that malnutrition that was associated with the chronic use of selective serotonin reuptake inhibitors during this critical period of development can interfere with the development of the esophagus. However, the manipulation of the serotonergic system through the administration of fluoxetine (SSRI) interferes in the development of this structure only in the late phase (Silva, 2006).

Programming insults such as malnutrition and the administration of SSRIs during the early stages of life can lead to permanent damage in the morphology and physiology of the organs and tissues of the body (Lucas, Fewtrell, Cole, 1999; Hales, Baker, 1992; Magalhães et al., 2006; Lopes-de-Souza et al., 2008, Marinho, 2004; Liberti et al., 2007). These changes may be the result of the stimulation of the serotonergic system by means of

the aforementioned exogenous factors (Halford, Blundell, 1996). This serotonergic manipulation may affect somatic growth and development (Toscano et al., 2008). The role of 5-HT in the regulation of feeding behavior and body weight is already clear (Toscano et al., 2008). Studies show that protein malnutrition (Manjarrez et al., 2003; Mokler et al., 2003) and administration of an SSRI (Deiró et al., 2006) affect food intake and body weight gain as a result of increased availability of serotonin in the synaptic cleft.

We observed that nutritional manipulation caused persistent changes at both ages that were studied (days 22 and 90) in the area and the perimeter of the longitudinal muscle fibers of the upper portion of the esophagus. The important factor is the early nutrition programming environment (Lucas et al., 1999), which can induce considerable consequences in adulthood (Lucas, 1998). This perinatal malnutrition can induce muscle atrophy (Alippi et al., 2002; Bozzini et al., 1989). In addition, the neonatal malnutrition may irreversibly damage the morphology of the muscle (Bedi et al., 1982). It can also reduce cell proliferation, which reduces the number of muscle fibers and nuclei in the offspring (Bedi et al., 1982, Park et al., 2003; Bayol et al., 2004). Changes in the proportions of fiber types after early malnutrition have also been observed (Toscano et al., 2008). Therefore, malnutrition compromises the biomechanical and elastic contractile properties of the muscle (Toscano et al., 2008).

Changes in the smooth muscle contribute to changes in esophageal motor function (Tugay et al., 2003). Therefore, it is proposed that the active characteristics of the esophagus, such as the longitudinal and circumferential strain, are dependent on its morphology and passive properties, such as internal and external circumferential length, the thickness and area of the mucosal layer and the thickness and area of the muscular layers (Gregersen, Lu, Zhao, 2004).

Potential morphological and physiological changes in the neonatal smooth muscle of the digestive system as a result of malnutrition may also be caused by inactivation of the carrier molecule of serotonin (SERT) (Coates et al., 2006). This plasma membrane protein that is responsible for the degradation and inactivation of serotonin that is found within the interstitial space (Gershon, 2003). This cycle of the release and reuptake of serotonin should remain untouched by its influence on the control of motor, sensory and secretory reflexes (Coates et al., 2006). Therefore, it has been suggested that changes in 5-HT signaling, which affects the availability of the neurotransmitter, may contribute to disturbances in gastrointestinal function (Coates et al., 2004; Cash; Chey, 2005).

In this study, we observed that both applied environmental insults caused a reduction in the number of myenteric neurons in the proximal portion of the esophagus. However, the diet factor only had an effect after weaning on day 22, but there were no permanent changes in the young adults, 90. Long-term effects were observed for the administration of the serotonin reuptake inhibitor, although it did not have any noticeable effects right after weaning.

With regard to the relationship between the number of neurons in the myenteric plexus and the area of longitudinal muscle cells of the proximal portion of the esophagus, diet had both short-term and long-term effects. Administration of the serotonin reuptake inhibitor only had an effect in the long term.

Protein deficiency during this critical period of life causes a delay in the development of tissues and myenteric neurons in young rats (Castelucci et al., 2002, Brandão et al, 2003, Gomes et al., 2006; Liberti et al., 2007). However, the morphological and morphometric characteristics of enteric neurons recover after the rats were returned to a normal diet (Meilus et al., 1998; Miranda Neto et al., 1999; Castelucci et al., 2002,

Gomes et al., 2006). These possible effects of protein malnutrition in the myenteric plexus neural structures indicate that the control of gastrointestinal motility may be affected in a negative way (Miranda Neto, 1999).

In the enteric nervous system, the manipulation of the serotonergic system that is induced by the use of SSRIs also results in a delay in the development of neurons in the myenteric plexus of the gastrointestinal tract (Marinho, 2004). The administration of fluoxetine during the lactation period causes a reduction in the number of neurons and in the size of myenteric nerve cells in the segment of distal small intestine that can be seen on day 75 (Marinho, 2004). These SSRIs can act as blockers and inactivate this bioamine, which functions as the carrier molecule for serotonin (Wong et al., 1975). SERT inhibition produces an increased synaptic concentration of serotonin, which allows for a greater availability for this neurotransmitter to connect with its receptor (Laurie, 2004). Thus, SSRIs may affect brain function (Wong et al., 1975) and gastrointestinal tract function (Gershon, Jonakait, 1979; Wade et al., 1996) as a result of changes in the function of 5-HT receptors (Tuladhar, Costall, Naylor, 2002).

Furness (2000) indicated that there was a strong relationship between the ganglionic myenteric plexus and the smooth muscles of the digestive system. Given that, it is suggested that changes in neural structures of the myenteric plexus that are associated with morphological impairment of the muscle fibers of the digestive system are indicative that damage to gastrointestinal motility may occur (Miranda Neto, 1999).

It has been proposed that the changes in 5-HT signaling as a result of nutritional and pharmacological manipulations affect the availability of serotonin and, therefore, may interfere with gastrointestinal function (Coates et al., 2004; Cash, Chey, 2005). One of the

symptoms that can result from motor dysfunction in the esophagus is dysphagia (Domingues, Lemme, 2001), which is the difficulty of the passage of food bolus by the esophageal body (Domingues, Lemme, 2001). This symptom, which results from a decrease in esophageal motility, may be responsible for the occurrence of pharyngoesophageal reflux (Marchesan, Furkim, Santini, 1999) and the increased risk of laryngotracheal penetration or aspiration after swallowing (Matsuo, Palmer, 2008). Esophageal dysphagia, depending on its severity and frequency, may lead to malnutrition (Domingues, Lemme, 2001), which can generate a negative impact on an individual's quality of life (Beattie et al. 2004).

Conclusion

Malnutrition and/or serotonin reuptake inhibition during the critical period of life prior to weaning promotes adaptive changes in the development of the neuromuscular structures of the upper portion of the esophagus. These findings indicate that the structural changes that are associated with metabolic programming are related to the regulatory role of serotonin in the neuromotor development of the gastrointestinal tract.

References

1. Alippi, R.M., Meta, M.D., Olivera, M.I., Bozzini, C., Shneider, P., Meta, I., Bozzini, C., 2002. Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible. *Arch. Oral Biol.* 47, 47-53.
2. Bayol, S., Jones, D., Goldspink, G., Stickland, N.C., 2004. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *Brit J Nutr* 91, 331–339.
3. Beattie, D.T., Smith, J.A.M., Marquess, D., Vickery, R.G., Armstrong, S.R., Pulido-Rios, T., McCullough, J.L., Sandlund, C., Richardson, C., Mai, N., Humphrey, P.P.A., 2004. The 5-HT₄ receptor agonist, tegaserod, is a potent 5-HT_{2B} receptor antagonist in vitro and in vivo. *Brit J Pharmacol.* 143, 549–560.
4. Bedi, K.S., Birzgalis, A.R., Mahon, M., Smart, J.L., Wareham, A.C., 1982. Early life undernutrition in rats. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and refed adult animals. *Br J Nutr.* 47(3), 417-31.
5. Bozzini, C., Barcelo, A.C., Alippi, R.M., Leal, T.L., Bozzini, C.E., 1989. The concentration of dietary casein required for normal mandibular growth in the rat. *J Dent Res.* 68, 840-842.
6. Brandão, M.C.S., Angelis, R.C. de, De-Souza, R.R., Fróes, L.B., Liberti, E.A., 2003. Effects of pre- and postnatal protein energy deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weanling rats. *Nutr Res.* 23, 215–223.
7. Cash, B.D., Chey, W.D., 2005. Review article: the role of serotonergic agents in the treatment of patients with primary chronic constipation. *Aliment Pharmacol Ther.* 22, 1047–1060.

8. Castelucci, P., Souza, R.R. de, et al., 2002. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. *Cell Tissue Res.* 310(1):1-7.
9. Coates MD, Mahoney CR, Linden DR et al., 2004. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 126:1657–64.
10. Coates, M.D., Johnson, A.C., Meerveld, B.G.V., Mawe, G.M., 2006. Effects of serotonin transporter inhibition on gastrointestinal motility and colonic sensitivity in the mouse. *Neurogastroenterol Motil.* 18, 464–471.
11. Deiró, T.C., Manhães-de-Castro, R., Cabral-Filho, J.E., Barreto-Medeiros, J.M., Souza, S.L., Marinho, S.M., Castro, F.M., Toscano, A.E., Jesus-Deiró, R.A., Barros, K.M., 2006. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiol Behav.* 87, 338–344.
12. Domingues, G.R., Lemme, E.M.O., 2001. Diagnóstico diferencial dos distúrbios motores esofagianos pelas características da disfagia. *Arq. Gastroenterol.* 38(1).
13. Furness, J.B., 2000. Types of neurons in the enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81(1–3), 87–96.
14. Gershon, M.D., Jonakait, G.M., 1979. Uptake and release of 5-hydroxytryptamine by enteric 5-hydroxytryptaminergic neurons: Effects of fluoxetine and chlorimipramine. *Br. J. Pharmacol.* 66, 7-9.
15. Gershon, M.D., 2003. Serotonin and its implication for the management of irritable bowel syndrome. *Rev. Gastroenterol. Disord.* 3 (Suppl. 2), 25–34.
16. Gershon, M.D., Liu, M.T., 2007. Serotonin and neuroprotection in functional bowel disorders. *Neurogastroenterol. Motil.* 19 (Suppl. 2), 19–24.

17. Gregersen, H., Lu, X., Zhao, J., 2004. Physiological growth is associated with esophageal morphometric and biomechanical changes in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 16, 403–412.
18. Gomes, O.A., Castelucci, P., Fontes, R.B.V., Liberti, E.A., 2006. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: A quantitative morphological study. *Auton Neurosci.* 126-127, 277-284.
19. Hales, C.N., Barker, D.J., 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 35(7), 595-601.
20. Harding, J.E., 2001. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol.* 30, 15-23.
21. Halford, J.C.G., Blundell, J.E., 1996. Metergoline antagonizes fluoxetine-induced suppression of food intake but not changes in the behavioural satiety sequence. *Pharmacol Biochem Behav.* 54, 745–751.
22. Hollwarth, M., Uray, E., 1985. Physiology and pathophysiology of the esophagus in childhood. *Prog. Pediatr. Surg.* 18, 1–13.
23. Jolley, S.G., Baron, H.I., 1998. Disorders of esophageal function. In: O'Neill, J.A., Rowe, M.I., Grosfeld, J.L., Fonkalsrud, E.W., Coran, A.G., editors. *Pediatric surgery.* 997–1005.
24. Koch, A., Ruggeberg, J., 1978. Function of the lower esophageal sphincter in infants. *Chir. Forum Exp. Klin. Forsch.* 1978, 53–7.
25. Laurie, L.E., 2004. *Neurociência: fundamentos para a reabilitação.* Rio de Janeiro: Elsevier.

26. Lee, Y.Y., Park, K.S., Pak, Y.K., Lee, H.K., 2005. The role of mitochondrial DNA in the development of type 2 diabetes caused by fetal malnutrition. *J Nutr Biochem.* 16, 195-204.
27. Liberti, E.A., Fontes, R.B., et al., 2007. Effects of combined pre- and post-natal protein deprivation on the myenteric plexus of the esophagus of weanling rats: a histochemical, quantitative and ultrastructural study. *World J Gastroenterol.* 13(26):3598-604.
28. Lopes-de-Souza, S., Orozco-Solis, R., Grit, I., Manhães-de-Castro, R., Bolaños-Jiménez, F., 2008. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci.*
29. Lucas, A., 1998. Programming by early nutrition: an experimental approach. In: Symposium: The effects of childhood diet on adult health and disease. *J Nutr.* 128, 401S-406S.
30. Lucas, A., Fewtrell, M.S., Cole, T.J., 1999. Fetal origins of adult disease—the hypothesis revisited. *Bmj.* 319.
31. Marchesan, I.Q., Furkim, A.M., Santini, C.S., 1999. *Disfagias Orofaríngeas.* São Paulo: Profono.
32. Marinho, S.M.O.C., 2004. Efeito da manipulação neonatal do sistema serotoninérgico sobre o desenvolvimento do intestino delgado em ratos. Recife: Dissertação (Mestrado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 62p.
33. Magalhães, C.P., Lima, L.O. de, et al., 2006. Neonatal treatment effect with selective inhibitor of 5-HT recapture on [corrected] the cranium-encephalic anatomic development. *Arq Neuropsiquiatr.* 64(4):990-3.
34. Manjarrez, G., Manuel, A.L., Mercado, C.R., Hernandez, R.J., 2003. Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. *Int J Dev Neurosci.* 21(5), 283–289.

35. Matsuo, K., Palmer, J.B., 2008. Anatomy and Physiology of Feeding and Swallowing: Normal and Abnormal. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 19, 691–707.
36. Meilus, M., Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., 1998. Study of the myenteric plexus of the ileum of rats subjected to proteic undernutrition. *Rev. Chil. Anat.* 16(1).
37. Miranda-Neto, M.H. de, Molinari, S.L., Stabille, S.R., Sant'Ana, D.M.G., Natali, M.R.M., 1999. *Arq. Neuropsiquiatr.* 57(2-B), 387-391.
38. Mokler, D.J., Galler, J.R., Morgane, P.J., 2003. Modulation of 5-HT release in the hippocampus of 30-day-old rats exposed in utero to protein malnutrition. *Brain Res Dev Brain Res.* 142(2), 203–8.
39. Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawrylewicz, R.O., 1978. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev.* 2, 137-230.
40. Morgane, P.J., Austin-Lafrance, R., et al, 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 17(1):91-128.
41. Park, K.S., Kim, S.K., Kim, M.S., Cho, E.Y., Lee, J.H., Lee, K.U., Pak, Y.K., Lee, H.K., 2003. Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. *J. Nutr.* 133(10), 3085-90.
42. Ross, M.G., Nijland, M.J.M., 1998. Development of ingestive behavior. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 274, 879-893.
43. Silva, H.J., 2006. Manipulação neonatal e da recaptação de serotonina em ratos: 1. Estabelecimento de protocolo para estudo murinométrico e validação; 2. Repercussões sobre a morfologia e morfometria da tûnicas musculares do esôfago e sobre o consumo alimentar. Tese (Doutorado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.

44. Toscano, A.E., Amorim, M.A.F., Carvalho Filho, E.V. de, Aragão, R. da S., Cabral-Filho, J.E., Moraes, S.R.A. de, Manhães-de-Castro, R., 2008. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? *Life Sci.* 82, 1131–1136.
45. Toscano, A.E., Manhães-de-Castro, R., Canon, F., 2008. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition.* 24, 270–278.
46. Tuladhar, B.R., Costall, B., Naylor, R.J., 2002. Modulation of 5-HT₄ receptor function in the rat isolated ileum by Fluoxetine: the involvement of endogenous 5-hydroxytryptamine. *Brit J Pharmacol.* 136, 150 ± 156.
47. Tugay M, Yvldvz F, Utkan T, et al., 2003. Esophagitis impairs esophageal smooth muscle reactivity in the rat model: an in vitro study. *Dig Dis Sci.* 48:2147- 52.
48. Wade, P.R., Chen, J., Jaffe, B., Kassem, I.S., Blakely, R.D., Gershon, M.D., 1996. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J. Neurosci.* 16, 2352-2364.
49. Winick M, Rosso P, et al., 1972. Malnutrition and cellular growth in the brain. *Bibl Nutr Dieta*; 17:60-8.
50. Wong, D.T., Bymaster, F.P., Horng, J.S., Molloy, B.B., 1975. A new selective inhibitor for uptake of serotonin into synapto-somes of rat brain: 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *J. Pharmacol. Exp. Therp.* 193, 804-811.

CONSIDERAÇÕES FINAIS



4.Considerações finais

Este estudo possibilitou desmonstrar:

- Os efeitos precoces e tardios da desnutrição e da manipulação neonatal do sistema serotoninérgico sobre o desenvolvimento neuromuscular do trato gastrointestinal.
- A forte relação dos insultos nutricionais e/ou farmacológicos do sistema serotoninérgico, incidentes nas fases críticas do desenvolvimento, com a programação, sobretudo os fatores exógenos que atingem a morfogênese neuromuscular esofagiana.
- O papel programador da serotonina no desenvolvimento morfológico do trato gastrointestinal, em particular do esôfago.

Referências

1. Alippi RM, Meta MD, Olivera MI, Bozzini C, Shneider P, Meta I, Bozzini C., 2002. Effect of protein-energy malnutrition in early life on the dimensions and bone quality of the adult rat mandible. *Arch Oral Biol.* 47:47-53.
2. Baxter GS, Craig DA, Clarke DE, 1991. 5-Hydroxy-tryptamine₄ receptors mediate relaxation of the rat oesophageal tunica muscularis mucosae. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 343: 439-446.
3. Bayol S, Jones D, Goldspink G, Stickland NC., 2004. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. *Br J Nutr.* 91: 331–339.
4. Beattie DT, Smith JAM, Marquess D, Vickery RG, Armstrong SR, Pulido-Rios T, McCullough JL, Sandlund C, Richardson C, Mai N, Humphrey PPA, 2004. The 5-HT₄ receptor agonist, tegaserod, is a potent 5-HT_{2B} receptor antagonist in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 143:549–560.
5. Bedi KS, Birzgalis AR, Mahon M, Smart JL, Wareham AC, 1982. Early life undernutrition in rats. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and refed adult animals. *Br J Nutr.* 47(3):417-31.
6. Bozzini C, Barcelo AC, Alippi RM, Leal TL, Bozzini CE, 1989. The concentration of dietary casein required for normal mandibular growth in the rat. *J Dent Res.* 68:840-842.
7. Brandão MCS, Angelis RC de, De-Souza RR, Fróes LB, Liberti EA, 2003. Effects of pre- and postnatal protein energy deprivation on the myenteric plexus of the small intestine: a morphometric study in weanling rats. *Nutr Res.* 23:215–223.
8. Buznicov GA, Lambert HW, Lauder JM, 2001. Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 305: 177–186.

9. Castelucci P, Souza RR de, et al., 2002. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. *Cell Tissue Res.* 310(1):1-7.
10. Cash, B.D., Chey, W.D., 2005. Review article: the role of serotonergic agents in the treatment of patients with primary chronic constipation. *Aliment Pharmacol Ther.* 22, 1047–1060.
11. Chen JC, Tonkiss J, Galler JR, Volicer L, 1995. Effect of prenatal malnutrition on release of monoamines from hippocampal slices. *Life Sci.* 57:1467-1475.
12. Coates MD, Mahoney CR, Linden DR et al., 2004. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 126:1657–64.
13. Coates MD, Johnson AC, Meerveld BGV, Mawe GM, 2006. Effects of serotonin transporter inhibition on gastrointestinal motility and colonic sensitivity in the mouse. *Neurogastroenterol Motil.* 18:464–471.
14. Deiró TCBJ, Manhães de Castro R, Cabral Filho JE, Souza SL, Freitas-Silva SR, Ferreira LMP, Guedes RCA, Câmara VRV, Barros KMFT, 2004. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. *Braz J Med Biol Res.* 37(10):1503-1509.
15. Deiró TC, Manhães-de-Castro R, Cabral-filho JE, Barreto-Medeiros JM, Souza SL, Marinho SM, Castro FM, Toscano AE, Jesus-deiró RA, Barros KM, 2006. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiol Behav.* 87:338-344.
16. Doe-Young Kim MD, Michael Camilleri MD, 2000. Serotonin: A Mediator of the Brain–Gut Connection. *Am J Gastroenterol.* 95(10).

17. Domingues GR, Lemme EMO, 2001. Diagnóstico diferencial dos distúrbios motores esofagianos pelas características da disfagia. *Arq Gastroenterol.* 38(1).
18. Duncan M, Davison JS, Sharkey KA, 2005. Review article: endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Aliment Pharmacol Ther.* 22: 667–683.
19. Furness JB, Costa M, 1980. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience.* 5:1-20.
20. Furness JB, 2000. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.* 81(1–3):87–96.
21. Furness JB, Sanger GJ, 2002. Gastrointestinal neuropharmacology: identification of therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol.* 2(6): 609–11.
22. Galligan JJ, 1996. Electrophysiological studies of 5-hydroxytryptamine receptors on enteric neurons. *Behav Brain Res.* 73: 199-201.
23. Gershon MD, Jonakait GM, 1979. Uptake and release of 5-hydroxytryptamine by enteric 5-hydroxytryptaminergic neurons: Effects of fluoxetine and chlorimipramine. *Br. J. Pharmacol.* 66:7-9.
24. Gershon MD, 2003. Serotonin and its implication for the management of irritable bowel syndrome. *Rev Gastroenterol Disord.* 3 (Suppl. 2): S25–34.
25. Gershon MD, Liu MT, 2007. Serotonin and neuroprotection in functional bowel disorders. *Neurogastroenterol Motil.* 19 (Suppl. 2):19–24.
26. Gomes OA, Castelucci P, Fontes RBV, Liberti EA, 2006. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat small intestine: A quantitative morphological study. *Auton Neurosci.* 126-127:277-284.
27. Gregersen H, Lu X, Zhao J, 2004. Physiological growth is associated with esophageal morphometric and biomechanical changes in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 16:403–412.

28. Hales CN, Barker DJ, 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 35(7):595-601.
29. Halford, J.C.G., Blundell, J.E., 1996. Metergoline antagonizes fluoxetine-induced suppression of food intake but not changes in the behavioural satiety sequence. *Pharmacol Biochem Behav*. 54, 745–751.
30. Harding, J.E., 2001. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol*. 30, 15-23.
31. Hisatomi K, Niiyama Y, 1980. Effects of postnatal undernutrition on the catecholamine and serotonin contents of suckling rat brain. *J Nutr Sci Vitaminol*. 26: 279-292.
32. Hoffman B, Mezey E, Brownstein M, 1991. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. *Science*. 254:579–80.
33. Hollwarth M, Uray E, 1985. Physiology and pathophysiology of the esophagus in childhood. *Prog Pediatr Surg*. 18:1–13.
34. Jolley SG, Baron HI. Disorders of esophageal function. In: O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG, editors. *Pediatric surgery*; 1998. p. 997–1005.
35. Koch A, Ruggeberg J, 1978. Function of the lower esophageal sphincter in infants. *Chir Forum Exp Klin Forsch*. 53–7.
36. Lauder JM, 1983. Hormonal and humoral influences on brain development. *Psychoneuroendocrinology*. 8(2):121-155.
37. Laurie LE. *Neurociência: fundamentos para a reabilitação*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

38. Lee YY, Park KS, Pak YK, Lee HK, 2005. The role of mitochondrial DNA in the development of type 2 diabetes caused by fetal malnutrition. *J Nutr Biochem.* 16:195-204.
39. Liberti EA, Fontes RB, et al., 2007. Effects of combined pre- and post-natal protein deprivation on the myenteric plexus of the esophagus of weanling rats: a histochemical, quantitative and ultrastructural study. *World J Gastroenterol.* 13(26):3598-604.
40. Liu J, Lauder JM, 1992. Serotonin promotes region-specific glial influences on cultures serotonin and dopamine neurons. *Glia.* 5(4): 306-317.
41. Lomax AE, Furness JB, 2000. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res.* 302:59-72.
42. Lopes-de-Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhães-de-Castro R, Bolaños-Jiménez F, 2008. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci.*
43. Lucas A. 1991. Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation Symposium* 156, 38–50, discussion 50–35.
44. Lucas A, 1998. Programming by early nutrition: an experimental approach. In: *Symposium: The effects of childhood diet on adult health and disease.* *J Nutr.* 128:401S-406S.
45. Lucas A, Fewtrell MS, Cole TJ, 1999. Fetal origins of adult disease—the hypothesis revisited. *BMJ.* 319.
46. Magalhães CP, Lima LO de, et al., 2006. Neonatal treatment effect with selective inhibitor of 5-HT recapture on [corrected] the cranium-encephalic anatomic development. *Arq Neuropsiquiatr.* 64(4):990-3.

47. Manjarrez G, Manuel AL, Mercado CR, Hernandez RJ, 2003. Serotonergic receptors in the brain of in utero undernourished rats. *Int J Dev Neurosci.* 21(5):283–289.
48. Marinho SMOC. Efeito da manipulação neonatal do sistema serotoninérgico sobre o desenvolvimento do intestino delgado em ratos. Recife: Dissertação (Mestrado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 62p, 2004.
49. Marchesan, I.Q., Furkim, A.M., Santini, C.S., 1999. Disfagias Orofaríngeas. São Paulo: Profono.
50. Matsuo, K., Palmer, J.B., 2008. Anatomy and Physiology of Feeding and Swallowing: Normal and Abnormal. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 19, 691–707.
51. Meilus M, Natali MRM, Miranda Neto MH, 1998. Study of the myenteric plexus of the ileum of rats subjected to proteic undernutrition. *Rev Chil Anat.* 16(1).
52. Messiha FS, 1993. Fluoxetine-Adverse effects and drug-drug interactions. *Clin Toxicol.* 31: 603 ± 630.
53. Miranda-Neto MH de, Molinari SL, Stabille SR, Sant'ana DMG, Natali MRM, 1999. *Arq Neuropsiquiatr.* 57(2-B): 387-391.
54. Mokler DJ, Galler JR, Morgane PJ, 2003. Modulation of 5-HT release in the hippocampus of 30-day-old rats exposed in utero to protein malnutrition. *Brain Res Dev Brain Res.* 142(2):203–8.
55. Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, Bronzino J, Kissane J, Hawrylewicz RO, 1978. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev.* 2: 137-230.
56. Morgane PJ, Austin-Lafrance R, et al., 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 17(1):91-128.

57. Moura EG de, Lisboa PC, Custódio CM, Nunes MT, Souza K de P, Passos MCF, 2007. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *J Nutr Biochem.* 18: 134– 139.
58. Neel JV, 1962. Diabetes mellitus: a ‘thrifty’ genotype rendered detrimental by ‘progress’? *Am J Hum Genet.* 14:353–362.
59. Nemecek GM, Coughlin SR, Handley DA, Moskovitz MA, 1986. Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:674-678.
60. Oliveira RB de, 2008. Implicações fisiológicas das funções motoras do músculo liso gastrintestinal. *REPM.* 2(1): 3-13.
61. Ozanne SE, Martensz ND, Petry CJ, Loizou CL, Hales CN, 1998. Maternal low protein diet in rats programmes fatty acid desaturase activities in the offspring. *Diabetologia.* 41, 1337–1342.
62. Park KS, Kim SK, Kim MS, Cho EY, Lee JH, Lee KU, Pak YK, Lee HK, 2003. Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. *J Nutr.* 133(10): 3085-90.
63. Phillips RJ, Powley TL, 2007. Innervation of the gastrointestinal tract: Patterns of aging. *Auton Neurosci.* 136:1–19.
64. Reeves JJ, Bunce KT, Humphrey PPA, 1991. Investigation into the 5-hydroxytryptamine receptor mediating smooth muscle relaxation in the rat oesophagus. *Br J Pharmacol.* 103: 1067-1072.
65. Ross MG, Nijland MJM, 1998. Development of ingestive behavior. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 274:879-893.
66. Silva HJ. Manipulação neonatal e da recaptação de serotonina em ratos: 1. Estabelecimento de protocolo para estudo murinométrico e validação; 2. Repercussões

sobre a morfologia e morfometria da t nicas musculares do esôfago e sobre o consumo alimentar. Tese (Doutorado), Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

67. Sobotka TJ, Cook MP, Brodie RE, 1974. Neonatal malnutrition: neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Res.* 65(3): 443–457.

68. Taniyama K, Makimoto N, Furuichi A, Sakurai-Yamashita Y, Nagase Y, Kaibara M, Kanematsu T, 2000. Functions of peripheral 5-hydroxytryptamine receptors, especially 5-hydroxytryptamine₄ receptor, in gastrointestinal motility. *J Gastroenterol.* 35:575-582.

69. Toscano AE, Manhães-de-Castro R, Canon F, 2008. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition.* 24:270–278.

70. Toscano AE, Amorim MAF, Carvalho Filho EV de, Aragão R da S, Cabral-Filho JE, Moraes SRA de, Manhaes-de-Castro R, 2008. Do malnutrition and fluoxetine neonatal treatment program alterations in heart morphology? *Life Sci.* 82:1131–1136.

71. Tugay M, Yvldvz F, Utkan T, et al., 2003. Esophagitis impairs esophageal smooth muscle reactivity in the rat model: an in vitro study. *Dig Dis Sci.* 48:2147- 52.

72. Tuladhar BR, Costall B, Naylor RJ, 1996. Pharmacological characterization of the 5-hydroxytryptamine receptor mediating relaxation in the rat isolated ileum. *Br J Pharmacol.* 119:303-310.

73. Tuladhar BR, Costall B, Naylor RJ, 2002. Modulation of 5-HT₄ receptor function in the rat isolated ileum by Fluoxetine: the involvement of endogenous 5-hydroxytryptamine. *Brit J Pharmacol.* 136:150-156.

74. Zanin ST de M, Molinari SL, Sant Ana D de MG, Miranda Neto MH de, 2003. *Arq Neuropsiquiatr.* 61(3-A):650-653.

75. Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD, 1996. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J Neurosci.* 16:2352-2364.
76. Wallace AS, Burns AJ, 2005. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* 319: 367–382.
77. Whitaker-Azmitia PM, 1991. Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43 (4): 553-561.
78. Winick M, Rosso P, et al., 1972. Malnutrition and cellular growth in the brain. *Bibl Nutr Diet.* 17:60-8.
79. Wong DT, Bymaster FP, Horng JS, Molloy BB, 1975. A new selective inhibitor for uptake of serotonin into synapto-somes of rat brain: 3-(p-tri-fluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine. *J Pharmacol Exp Therp.* 193:804-811.

ANEXO A

Instruções aos Autores – Disposições Gerais

O periódico *Neurobiologia* publica artigos inéditos, revisões, notas didáticas, Casos Clínicos, Análise de Artigos e Revisão de Livros, Cartas ao Editor e Noticiário, em português e inglês, de autores de quaisquer centros de pesquisa do Brasil e do exterior. Os requisitos para apresentação de originais foram estabelecidos em conformidade com “Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals” do International Committee of Medical Journals Editors – Grupo Vancouver – publicado no Ann Intern Med 1997;126:36-47, disponível em versão digital em <http://www.acponline.org>.

Artigos e correspondências devem ser encaminhados para:

REVISTA NEUROBIOLOGIA

Mestrado e Doutorado em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da UFPE

Centro de Ciências da Saúde – CCS – UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária

50.670-420 Recife/PE Brasil

Tele-fax: 0055-81-2126-8539

E-mail: editor@neurobiologia.org

Home-page: <http://www.neurobiologia.org>

Aceito para publicação, torna-se o trabalho propriedade permanente da Revista Neurobiologia, que reserva todos os direitos autorais do artigo publicado, no Brasil e no exterior, permitindo, entretanto, sua posterior reprodução como transcrição, com a devida citação da fonte, mediante autorização prévia por escrito.

- Visando substancialmente proteger direitos dos autores, é obrigatório o envio da carta de autorização para publicação assinada por todos os autores. No caso de estudos envolvendo seres humanos, os autores devem mencionar que o estudo foi conduzido conforme os princípios da declaração de Helsinki e com o consentimento informado da cada participante ou de seus responsáveis legais. Não é permitida a apresentação do trabalho em outro periódico.

- Modelo para carta de autorização:

“Os autores abaixo assinados transferem com exclusividade todos os direitos para publicação, em qualquer forma ou meio, do artigo....., garantem que o mesmo é inédito e não está sendo avaliado por outro periódico e que o estudo foi conduzido conforme os princípios da declaração de Helsinki (incluir nome completo, endereço postal, telefone, fax, e-mail e assinatura de todos os autores).

Objetivando manter o padrão da Neurobiologia, o respeito às normas para publicação é condição obrigatória para o recebimento do trabalho. Após a análise técnica pelo Editor, quanto ao cumprimento das normas, o trabalho será encaminhado aos Editores de Área que dispõem de plena autoridade para decidir sobre sua aceitação, podendo reapresentá-lo aos autores, no prazo máximo de 30 dias, para que sejam feitas as alterações sugeridas.

De cada artigo será enviado um exemplar da revista. Os trabalhos devem ser enviados em formato eletrônico, acompanhados de duas cópias impressas na última versão, e não serão devolvidos em nenhuma hipótese.

■ Estrutura do artigo

- Todas as páginas devem estar numeradas indicando na primeira o total de páginas.
- A primeira página deve conter: título do trabalho, nome completo dos autores, com entrada direta e sobrenome completo, e filiação científica.
- Os resumos devem ser apresentados em português e inglês, inclusive títulos, com no máximo 200 palavras. Recomenda-se que os resumos sejam previamente encaminhados pelo autor a um revisor especialista no idioma.
- Os unitermos, entre 3 a 10, devem ser apresentados nos dois idiomas. Devem ser utilizados termos da lista denominada Medical Subject Headings do Index Medicus ou da lista de Descritores em Ciências da Saúde, publicada pela BIREME, para trabalhos em língua portuguesa.
- A citação de autores no corpo do texto deve ser numerada em sobrescrito pela ordem de apresentação.
- Correções ortográficas serão feitas, visando manter a homogeneidade e a qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo do autor. Recomenda-se que o texto seja previamente encaminhado a um revisor técnico especialista no idioma.
- Tabelas e ilustrações devem estar numeradas e impressas em folhas separadas, com as respectivas legendas, em formato que permita sua reprodução e incluídas no disquete. Os locais para inserção deverão ser indicados no texto, com destaque.
- Ilustrações não serão aceitas em negativo e a impressão de fotos a cores será cobrada dos autores.

- Agradecimentos deverão ser mencionados antes das referências.

-As referências devem ser apresentadas ao final, numeradas e em ordem alfabética. No texto, citá-las apenas pelo número. Dever ser usado o estilo que se seguem:

■ Artigos de revistas

1. Artigo padrão

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Am Intern Med* 1996 jun 1; 124:980-3. (a NLM lista até 25 autores. Caso haja mais que 25, liste os primeiros 24 seguidos da expressão et al.) (Caso o periódico tenha paginação contínua ao longo do volume, o mês e a edição devem ser omitidos.)

2. Uma organização como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996;164:282-4.

3. Ausência de autor

Cancer in South Africa □editorial□. *S Afr Med J* 1994;84:15.

4. Volume com suplemento

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 1:275-82.

5. Número com suplemento

Payne DK, Sullivan MK, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23 (1 Suppl 2):89-97.

6. Volume em partes

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995;32 (Pt 3):303-6.

7. Número em partes

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. *NZ Med J* 1994;107 (986 Pt 1):377-8.

8. Número sem volume

Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. Clin Orthop 1995;(320):110-4.

9. Sem número nem volume

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responses. Curr Opin Gen Surg 1993:325-33.

■ Livros e outras obras monográficas

1. Autor(es) pessoal(is)

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY):Delmar publishers; 1996.

2. Editor(es), compilador(es) como autor(es)

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

3. Organização como autor e editor

Institute of Medicine(US). Looking at the future of medical program. Washington: The institute; 1992.

4. Volume com complemento

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995, p. 465-78.

5. Anais de congressos

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology: 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

6. Trabalho de congresso

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoft O, editors, MEDINFO92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992, p. 1561-5.

7. Relatório científico ou técnico

Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report n^o.: HHSIGOEI37485300870.

8. Dissertação

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

■ Outros materiais publicados

1. Artigo em jornal

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50.000 admissions annually. The Washington Post 1996 jun 21; Sect. A:3 (col.5).

2. Material audiovisual

HIV+AIDS: the facts and the future [videocassete]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

■ Outros materiais publicados

1. No prelo

Lesner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. In press 1996.

■ Material eletrônico

1. Artigo de revista em formato eletrônico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 jan-mar [cited 1996 jun 5];(1);[24 screens]. Available from: URL: <http://www.cde.gov/ncidod/IED/eid.htm>

2. Monografia em formato eletrônico

CDI, clinical dermatology illustrated [monograph on CD-ROM], Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

3. Arquivo de computador

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational System;1993.

ANEXO B

Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical

Adopted as the official publication of The International Society for Autonomic

Neuroscience -  <http://www.isanweb.org/>

Guide for Authors

Types of Article

Full-length articles of original research; Short Communications; Review articles; Clinical Reports and Book Reviews. For Full-length articles, please note you will be required to select a major and minor classification when submitting to the online system. The Editor-in-Chief should be consulted whenever a review article is under consideration. Rapid Communications will be accepted if extremely concise, fully documented and dealing with a novel and important observation in a research area in rapid expansion. These will receive priority handling both in the reviewing and publishing processes such that their publication will be advanced.

Ethics

Human Experiments

Papers describing experimental work on human subjects which carry a risk of harm must include a statement (a) that the experiments were conducted with the understanding and the consent of each subject, and (b) a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments.

Animal Experiments

Papers describing experiments on living animals should provide (a) a full description of any anaesthetic and surgical procedure used, and (b) evidence that adequate steps were taken to ensure that animals did not suffer unnecessarily at any stage of the experiment, and comply with the existing national and international guidelines on the conduct of animal experiments.

Copyright Submission

Copyright submission of a paper to *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* will imply that it represents original research not previously published (except in the form of an abstract or a preliminary report) and that it is not being considered for publication elsewhere. It also implies the transfer of the Copyright from the author to the publisher. Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur with the submission and that a copy of the final manuscript has been approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out. If accepted, the manuscript shall not be

published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and Publisher. If illustrations or other small parts of articles or books already published elsewhere are used in papers submitted to *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, the written permission of author and Publisher concerned must be included with the manuscript. In these cases, the original source must be indicated in the legend of the illustration.

Special regulations for readers and authors in the USA regarding copying and copyright are to be found in the preliminary pages of each issue.

Manuscript Preparation

All manuscripts must be submitted through the online system at <http://ees.elsevier.com/autneu/>. Manuscripts mailed to the editorial office will not be processed. Registration is required if using the system for the first time. After accessing the web site click on the "Register" link located towards the middle of the top of the screen. Detailed instructions are provided by clicking on the "Tutorial for Authors" link in the grey Author Information box in the upper right corner of the screen. The cover letter must contain a statement assuring that the material has not been published or is under active consideration by another journal. The authors must also indicate in the cover letter that the research was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and/or with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the United States National Institutes of Health.

The author should select a set of classifications from a list, and a category designation for their manuscript (original article, letter to the editor, short communication, etc.). Details of five reviewers that are required with a submission can be provided in the comments box or at a later stage when uploading the files for submission.

Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or journal procedures to the Editorial Office (autneu@elsevier.com). Once the uploading is done, the system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions, will be by e-mail.

The **Title** of the paper should be as concise, clear and as informative as possible, it should not contain abbreviations and should not exceed 120 letters and spaces; it should be free of unusual typographical characters so that it will not be too difficult for other authors to type it and retrieve it. The **Abstract** should summarize the results obtained and the major conclusions in such a way that a reader not familiar with the particular area of work can understand the implications of the work. The Abstract should not exceed one twentieth of the length of the manuscript. Full-length papers should normally be divided into the following headings: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion (and Conclusions), (Acknowledgements) and References. Abbreviations should be used sparingly and should be avoided in the Abstract.

Rapid communications

Reports on exciting new results within the scope of the journal can be submitted for publication in the rapid communications section. A rapid communication should not exceed 700 words and should contain at most one simple table or figure. A maximum of 8 references may be used. The manuscript should be arranged in the following order: title (not exceeding 100 characters including spaces between words); surname(s) of author(s), preceded by one name spelled out in full; name and address of the establishment where the work was done (all on 1 page); abstract (max. 75 words) and keywords (indexing terms, max. 3 items); text without subheadings; acknowledgement(s); references; figure legend and figure or table. Name, full postal address, telephone, fax numbers and e-mail address of the author to whom correspondence is to be sent should be mentioned on the title page. Rapid communications have priority at the editorial office and publisher.

Short communications

Short communications should be prepared as rapid communications but should not exceed four pages in print (approx. 2000-3000 words including abstract, captions and references). A maximum of 2 illustrations (figures and tables) is allowed. An abstract of not more than 100 words should be provided and 3-6 keywords should be listed immediately below the abstract.

Clinical reports

Clinical reports should be prepared as Short communications.

Literature References

Citations in the text should be given in parentheses at the appropriate place by author(s) name(s) followed by the year in chronological order according to the Harvard system (Paintal, 1973; Birdsall et al., 1980). With more than two authors, name only the first followed by "et al." (Birdsall et al., 1980). When two or more papers by the same author(s) appear in one year, distinguish them by a, b, etc. after the date.

The Reference List

The reference list should be submitted in double spacing. It should be arranged in alphabetical order of the first author's name. If the first author's name appears more than once, the order is as follows: (1) single author: chronological sequence; (2) author and co-author: alphabetically according to co-author; (3) author and more than one co-author: chronological sequence (as in the text these will be referred to as "et al."). Reference must be complete including, in this order: author's name, initials, year of publication, title of article, title of the journal, volume, first and last page number of the article cited. Title abbreviations should conform to those adopted by List of Serial Title Word Abbreviations (available from International Serial data System, 20 Rue Bachaumont, 75002 Paris, France, ISBN 2-904938-02-8).

Examples: Paintal, A.S., 1973. Vagal sensory receptors and their reflex effects. *Physiol. Rev.* 53, 159-227. Birdsall, N.J.M., Hulme, B.C., Hamner, R., Stockton, J.R., 1980. Subclasses of muscarinic receptors. In: Yamamura, H.I., Olsen, R.W., Usdin, E. (Eds.), *Psychopharmacology and Biochemistry of Transmitters and Receptors*. Elsevier, Amsterdam, pp. 97-100. Leiblich, I., 1982. *Genetics of the Brain*. Elsevier, Amsterdam,

492 pp.

Unpublished experiments may be mentioned only in the text. They must not be included in the list of References. Papers which have been accepted for publication but which have not appeared may be quoted in the reference list as "in press". Personal communications may be used only when written authorization from the investigator is submitted with the manuscript. They must not be included in the list of references. All references listed should be referred to in the text and vice versa.

Figures

Figures of good quality should be submitted online as a separate file. The lettering should be large enough to permit photographic reduction. Legends should be typed together on a separate page in the electronic manuscript. If a figure cannot be submitted online, a hardcopy may be sent; please contact the Editorial Office (autneu@elsevier.com) for further instructions.

Colour illustrations must be approved by the editors and the extra costs of colour reproduction will be charged to the author(s).

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g. ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, a limited number of colour figures may be printed in the journal without cost, at the discretion of the Editor, who will make the judgement based on the academic necessity of the colour illustrations. For further information on the preparation of the electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork>.

Each illustration should be numbered in Arabic numerals (Fig. 1, Fig. 2, etc.) An illustration, together with its legend, should be understandable with minimal reference to the text. a. All illustrations should be designed to fit either a single column (7 cm) or the full text width (16 cm).

b. Line drawings should normally be about twice the final size. Symbols should be used sparingly and direct labelling with an explicative term or abbreviation is preferred. All symbols and lettering should be large enough to permit reduction.

c. Micrographs. These should be submitted in a form suitable for direct reproduction without reduction. The maximum space available for micrographs is 16x19 cm. Micrographs should be carefully cropped, to leave out areas of low information content, and they should be grouped and arranged to optimize the available space. They should be separated by gutters of 2-3 mm and be directly labelled. Micrographs must have a calibration bar. Illustrations and legends should not be placed sideways.

Tables

Tables should be submitted online as a separate file and should bear a short descriptive title. Legends for each table should appear on the same page as the table. All tables must be numbered consecutively in Arabic numerals and cited in the text. Titles should be brief but descriptive. Tables should not have vertical lines, and horizontal lines must be kept to a

minimum. Tables should be prepared for use in a single column (8.4 cm wide) or be of page width (17.6 cm).

- (a) Each table should have a brief explanatory heading and sufficient experimental detail (following the table body as a footnote) so as to be intelligible without reference to the text.
- (b) Tables should not duplicate material in text or illustrations
- (c) Short or abbreviated column headings should be used and if necessary, explained in footnotes, and indicated as a,b,c, etc.
- (d) Statistical measures of variation, S.D., S.E., M., etc. should be identified.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Preparation of Supplementary Material

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com/>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/authors>.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication within 48 hours: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with

the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Page charge

There will be no page charge.

For complete up-to-date addresses of Editors please check the link to Editorial Board at the beginning of these instructions. "0") have been used properly, and format your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your word processor (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open but indicated by a unique code (e.g., Gralpha, #, etc., for the Greek letter α). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your word processor to introduce word splits and do not use a justified layout. Please adhere strictly to the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of the journal. Further information may be obtained from the Publisher.

Literature References

Citations in the text should be given in parentheses at the appropriate place by author(s) name(s) followed by the year in chronological order according to the Harvard system (Paintal, 1973; Birdsall et al., 1980). With more than two authors, name only the first followed by "et al." (Birdsall et al., 1980). When two or more papers by the same author(s) appear in one year, distinguish them by a, b, etc. after the date.

The Reference List should be typed in double spacing. It should be arranged in alphabetical order of the first author's name. If the first author's name appears more than once, the order is as follows: (1) single author: chronological sequence; (2) author and co-author: alphabetically according to co-author; (3) author and more than one co-author: chronological sequence (as in the text these will be referred to as "et al."). Reference must be complete including, in this order: author's name, initials, year of publication, title of article, title of the journal, volume, first and last page number of the article cited. Title abbreviations should conform to those adopted by *List of Serial Title Word Abbreviations* (available from International Serial data System, 20 Rue Bachaumont, 75002 Paris, France, ISBN 2-904938-02-8).

Examples:

Paintal, A.S., 1973. Vagal sensory receptors and their reflex effects. *Physiol. Rev.* 53, 159-227.

Birdsall, N.J.M., Hulme, B.C., Hamner, R., Stockton, J.R., 1980. Subclasses of muscarinic receptors. In: Yamamura, H.I., Olsen, R.W., Usdin, E. (Eds.), *Psychopharmacology and Biochemistry of Transmitters and Receptors*. Elsevier, Amsterdam, pp. 97-100.

Leiblich, I., 1982. *Genetics of the Brain*. Elsevier, Amsterdam, 492 pp.

Unpublished experiments may be mentioned only in the text. They must **not** be included in the list of References. Papers which have been accepted for publication but which have not appeared may be quoted in the reference list as "in press". Personal communications may be used only when written authorization from the investigator is submitted with the manuscript. They must not be included in the list of references. All references listed should be referred to in the text and vice versa.

Illustrations

Each illustration should bear the author's name and be numbered in Arabic numerals (Fig. 1, Fig. 2, etc.), must be referred to in the text and should be accompanied by a legend (typed with double spacing on separate pages). An illustration, together with its legend, should be understandable with minimal reference to the text.

- a. All illustrations should be designed to fit either a single column (7 cm) or the full text width (16 cm).
- b. Line drawings: these should be drawn in Indian ink on white card, drawing or tracing paper or be quality black and white prints. Line drawings should normally be about twice the final size. Symbols should be used sparingly and direct labelling with an explicative term or abbreviation is preferred. All symbols and lettering should be large enough to permit reduction.
- c. *Micrographs*. These should be mounted on **thin** cardboard and submitted in a form suitable for direct reproduction without reduction. The maximum space available for micrographs is 16×19 cm. Micrographs should be carefully cropped, to leave out areas of low information content, and they should be grouped and arranged to optimize the available space. They should be separated by gutters of 2-3 mm and be directly labelled by the author with Letraset or similar lettering aids. Micrographs must have a calibration bar. Illustrations and legends should not be placed sideways. The original manuscript should be accompanied by a set of illustrations marked "For Printer". In the 4 copies of the paper, the illustrations should be original photographs or good quality photocopies. (Xerox copies are not acceptable).
- d. Specific requests for reproduction of illustrations for a particular size (e.g. ×100%) should be mentioned on the reverse side of the figure.
- e. Colour illustrations must be approved by the editors and the extra costs of colour reproduction will be charged to the author(s).

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g. ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, a limited number of colour figures may be printed in the journal without cost, at the discretion of the Editor, who will make the judgement based on the academic necessity of the colour illustrations. For further information on the preparation of the electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork>

Tables

Tables of numerical data should be typed/printed out (double spacing) on a separate page, numbered in sequence in Arabic numerals (Table 1, 2, etc.), provided with a heading and

referred to in the text as Table 1, 2, etc.

Preparation of Supplementary Material

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>

Supplementary files can be submitted on disk; these files can be stored on 3.5 inch diskette, ZIP-disk, or CD (either MS-Windows or Macintosh).

Proofs

Authors should keep a copy of their manuscript as proofs will be sent to them without the manuscript. Proofs will be drawn on lower-quality paper. Only printer's errors may be corrected (clearly marked in the text with red pen and clarified in the margin), no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed at this stage. For Rapid Communications, in the interest of speed no proofs will be sent to the authors; proofreading will be undertaken by the Publisher.

E-Offprints *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* offers e-offprints only. The author will receive an acknowledgement letter with an offprint Form highlighting this change. Free paper offprints are no longer sent to the author.

Page charge There will be no page charge.

For complete up-to-date addresses of Editors please check the link to Editorial Board at the beginning of these instructions.

<http://authors.elsevier.com>

ANEXO C

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Moraes Cabral, 1230
Campus de Biologia, 50670-910
Recife, PE, Brasil
Fone: (51) 3271-1111
Fax: (51) 3271-1112
www.ufpe.br



Ofício nº 11/08

Recife, 08 de janeiro de 2008

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Prof. Raul Manhães de Castro**
Departamento de Nutrição - UFPE
Processo nº 018130/2007-03

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado **"Tratamento neonatal com sertralina: desenvolvimento dos plexos intramurais esofágianos em desnutridos"**.

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

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

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

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

CCB: Integrar para desenvolver