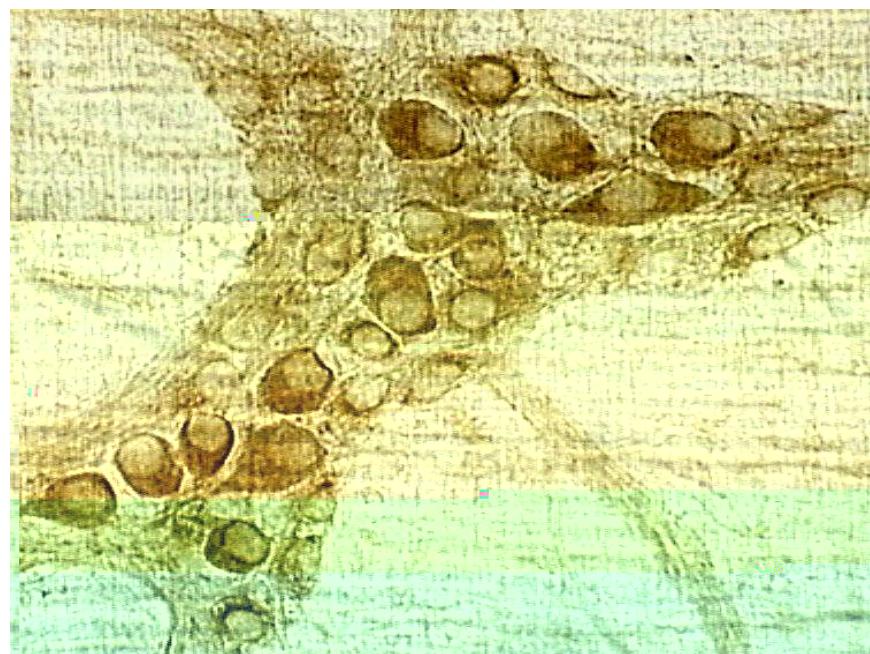


JOÃO PAULO FERREIRA SCHOFFEN



**EFEITOS DA IDADE E DA RAÇÃO HIPOPROTÉICA
SOBRE OS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS MIOSINA-
V IMUNOREATIVOS DO INTESTINO DE RATOS**



**Maringá - PR
2005**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOÃO PAULO FERREIRA SCHOFFEN

**EFEITOS DA IDADE E DA RAÇÃO HIPOPROTÉICA
SOBRE OS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS MIOSINA-
V IMUNOREATIVOS DO INTESTINO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde (Área de Ciências da Saúde) do Centro Universitário de São Paulo (UNIPESP) para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S367e Schoffen, João Paulo Ferreira
 Efeitos da idade e da ração hipoprotéica sobre os
 neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos do intestino
 de ratos / João Paulo Ferreira Schoffen. - Maringá, PR :
 [s.n.], 2005.
 92 f. : il. color.

Orientador : Prof. Dr. Maria Raquel Marçal Natali.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá. Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2005.

1. Ratos Wistar - Histologia. 2. Plexo mioentérico -
Envelhecimento. 3. Ileo - Ratos Wistar. 4. Colo proximal -
Ratos Wistar. 5. Ração hipoprotéica - Plexo Mioentérico. 6.
Neurônios mioentéricos - Miosina-V. I. Universidade
Estadual de Maringá. Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
II. Título.

CDD 21.ed.573.37

Zenaide Soares da Silva CRB 9/1307



***Efeito da radde sobre os corpos celulares
neuronais miosina-V imunoreativos
do plexo mioentérico do
íleo de ratos***



**Efeitos da ração hipoproteica sobre os neurônios
mioentéricos miosina-V imunoreativos e
parede do colo proximal de ratos
em envelhecimento**



normas para autores

Empenho, dedicação, coragem, humildade, persistência, amor, alegria e fé em Deus, valores transmitidos a mim por pessoas muito especiais. A demonstração de força e dignidade diante dos obstáculos da vida são exemplos que sempre serão lembrados. Aos principais responsáveis pelas minhas conquistas dedico este trabalho.

A vocês, João e Augusta (pai e mãe).

À Prof^a. Maria Raquel

O meu especial agradecimento pela confiança, carinho e compreensão a mim demonstrados durante o desenvolvimento e concretização deste trabalho. A humildade e simplicidade transmitida em seus ensinamentos demonstram a sua sapiência inestimável.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a vida e a grande emoção desse momento. A Ele devo o êxito de todas as barreiras ultrapassadas e o júbilo de todas as minhas vitórias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo, necessária para a execução deste trabalho.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá pelo apoio e colaboração.

À Profª. Drª. Nilza Cristina Buttow, pela sua contribuição com valiosas sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcílio Hübner de Miranda Neto, pela demonstração de confiança, pelo constante incentivo e apoio a mim prestado desde o momento em que o conheci. Sua humildade, solidariedade e sabedoria me surpreendem a cada dia que passa.

Aos professores e colegas de Curso, pois juntos trilhamos uma etapa importante de nossas vidas.

À Patrícia, pelo amor, compreensão, companheirismo e incentivo incondicionais.

À minha família, por serem fontes permanentes de incentivo e muito amor.

As minhas queridas irmãs Rose e Érica, que sempre me incentivaram e apoiaram em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos especiais, Angélica, Angélica Cristina, Cristiano, Dayane, Éder, Eleandro, Fernando, Márcia, Priscila, Renata e Thaís pela força e pela vibração em relação a esta jornada. Graças a vocês, aprendi muitas coisas, sobretudo o valor do companheirismo e da amizade.

Às técnicas da Histologia, Maria Euride e Maria dos Anjos, pelo apoio fornecido no desenvolvimento prático deste estudo e pela relação de amizade e companheirismo que mantivemos durante a nossa convivência.

À Cleonira (Kita), José Antônio e Valdir Trombelli, pelo excelente suporte técnico fornecido no decorrer desse estudo.

À Prof^a. Dr^a. Isaura Maria Mesquita Prado, pelos preciosos ensinamentos científicos que me proporcionou durante o curso de especialização. Ensinamentos estes, imprescindíveis para a realização do curso de mestrado.

Aos professores da Histologia e estagiários do Laboratório de Histotécnica Animal, que de alguma forma colaboraram para a realização dos procedimentos práticos.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

Meu profundo agradecimento!

APRESENTAÇÃO

Em consonância com a Resolução Nº 01/2003-CCPBC do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, esta dissertação de mestrado é composta por dois artigos científicos completos, redigidos na forma exigida pelas revistas científicas que pretendemos publicá-los, assim sendo:

SCHOFFEN, J.P.F.; NATALI, M.R.M. Efeito da idade sobre os corpos celulares neuronais miosina-V imunoreativos do plexo mioentérico do íleo de ratos / The effect of age on the immunoreactive myosin-V neuronal cellular bodies of the myenteric plexus of the ileum of rats. Será submetido à apreciação do corpo editorial da revista *Biogerontology* (ISSN 1389-5729), visando sua publicação.....Pág. 01

SCHOFFEN, J.P.F.; SOARES, A.; FREITAS, P.; BUTTOW, N.C.; NATALI, M.R.M. Efeitos da ração hipoprotéica sobre os neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos e parede do colo proximal de ratos em envelhecimento / Effects of a hypoproteic diet on myosin-V immunoreactive myenteric neurons and on the proximal colon wall of aging rats. Submetido à apreciação do corpo editorial da revista *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* (ISSN 1566-0702), visando sua publicação.....Pág. 42

RESUMO

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) é uma divisão do sistema nervoso autônomo que regula as funções gastrointestinais, incluindo a absorção, secreção e motilidade. Os neurônios deste sistema constituem uma complexa e variada população que deve ser conhecida para a compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiologia digestiva.

A incidência de problemas gastrointestinais, tais como disfagia, desordens no refluxo gastro-esofágico, diarréia, constipação e incontinência fecal aumentam drasticamente com a idade. Atualmente há uma emergente necessidade em compreender melhor a biologia do envelhecimento do SNE, no intuito de traduzir esse conhecimento em terapias que melhorarão a função do trato gastrointestinal e a qualidade de vida de idosos.

Alterações na função neuromuscular gastrointestinal relacionada à idade, principalmente devido a modificações nos neurônios do plexo mioentérico, tem sido demonstrada em humanos e em modelos animais, entretanto, a associação dessas alterações com desequilíbrios nutricionais é pouco investigada. Conhecer as necessidades nutricionais dos idosos em face às mudanças biológicas decorrentes do envelhecimento se torna imprescindível para a manutenção da saúde dessa crescente parcela da população.

Nesse sentido, foram conduzidos dois estudos experimentais para avaliar os efeitos da idade e de uma dieta hipoprotéica sobre os neurônios mioentéricos do intestino de ratos. Com este objetivo, o íleo e o colo proximal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) foram coletados e submetidos à elaboração de preparados de membrana imunomarcados com anticorpo anti-miosina-V para análise morfoquantitativa neuronal. A proteína motora miosina-V está envolvida com a dinâmica das membranas, transporte axoplasmático e liberação de neurotransmissores, permitindo a identificação da população mioentérica total.

Considerando que os neurônios mioentéricos são responsáveis pela inervação intrínseca da parede intestinal, também se realizou a inclusão em parafina e processamento histológico do colo proximal para analisar morfometricamente a espessura das túnicas mucosa e muscular externa. Para as análises morfométricas utilizou-se um sistema de análise de imagens computadorizado (Image-Pro Plus® 4.5). Parâmetros que comprovaram o quadro de restrição protéica, tais como peso corporal, consumo de ração, tamanho dos órgãos e dosagem de proteínas totais, albumina e globulinas também foram avaliados. Todos os dados quantitativos foram analisados estatisticamente, pelo teste t de Student ($p < 0.05$).

No primeiro experimento, comparou-se os efeitos do processo de envelhecimento

sobre a área dos corpos celulares neuronais do plexo mioentérico nas regiões antimesentérica e intermediária da circunferência ileal de animais com 3 e 12 meses de idade (100 neurônios/animal). Verificamos um aumento significativo no tamanho do corpo celular neuronal para os animais com 12 meses em relação aos de 3 meses, sem diferença significativa entre as regiões, independente da faixa etária considerada. O peso corporal dos animais aumentou com o avançar da idade, porém o tamanho do intestino delgado não foi alterado.

No segundo experimento, avaliamos o comportamento morfoquantitativo dos neurônios do plexo mioentérico, bem como a morfometria de elementos da parede do colo proximal de ratos com 360 dias de idade alimentados com ração normoprotéica (22%) (Grupo: controle) e hipoprotéica (8%) (Grupo: restrição protéica) durante 150 dias, a partir do 210º dia de vida. O número de neurônios, quantificados em 80 campos microscópicos, e a morfometria do corpo celular neuronal (100 neurônios/animal), não apresentaram diferenças significativas. Os animais alimentados com ração hipoprotéica apresentaram menor consumo de ração, menor nível de proteínas totais no sangue, redução no tamanho do colo proximal e na espessura da túnica mucosa. Independente do grupo nutricional houve manutenção do peso corporal médio dos ratos e da espessura da túnica muscular externa durante todo o experimento.

As implicações de todos estes resultados são discutidas considerando as possíveis alterações promovidas pelo envelhecimento e/ou pela ração hipoprotéica. O fator idade promoveu aumento na área do corpo celular dos neurônios do íleo de ratos, indicando a necessidade de um ajuste neuronal em função da maior demanda funcional, associada à perda neuronal típica da idade. Os componentes neuronais e não neuronais do colo proximal de ratos com 360 dias de idade se ajustaram à condição nutricional imposta, garantindo a manutenção de suas funções.

PALAVRAS-CHAVE: Envelhecimento, Intestino, Miosina-V, Neurônios mioentéricos, Ração hipoprotéica, Ratos.

ABSTRACT

The Enteric Nervous System (ENS) is a division of the autonomous nervous system which controls the gastrointestinal functions, including the absorption, secretions and motility. The neurons of this system constitute a complex and varied population that must be known for the comprehension of the mechanisms involved in the digestive physiology.

The incidence of gastrointestinal problems, such as dysphagia, disorders in the gastroesophageal reflux, diarrhea, constipation and fecal incontinence increase with age. Nowadays there is an emergent need in a better understanding of the biology of the ENS aging, in order to translate this knowledge in therapies that will improve the function of the gastrointestinal tract and the life quality of elderly.

Alterations in the gastrointestinal neuromuscular function related to age, mainly due to modifications in neurons of the myenteric plexus, have been demonstrated in human and animal models, however, the association of these modifications with nutritional disbalance is few investigated. Knowing the nutritional needs of elderly ad the biological changes due to aging is very important to the health maintenance of this growing population.

In this way, two experiments were conducted in order to evaluate the age effect and an hypoproteic diet on the neurons of the myenteric plexus in intestine of rats. Being that the aim, the ileum and proximal colon of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were collected and submitted to elaboration of whole-mount preparations immunostained with the antibody anti-myosin-V for neuronal morphoquantitative analysis. The motor protein myosin-V is involved with the membranes dynamic, axoplasmatic transport and neurotransmitters release, affording the identification of the total myenteric population.

Considering the neurons are also responsible for the intrinsic innervations of the intestinal wall, it was performed the paraffin inclusion and histological processing of the proximal colon to morphometrically evaluate the thickness of the mucous layer and external muscular layer. For the morphometric analysis it was used a computerized system of image analysis (Image-Pro Plus[®] 4.5). Parameters that agreed with the pattern of proteic restriction, such as body weight, food intake, organs size and dosage of total proteins, albumin and globulins were also evaluated. All the quantitative data were statistically evaluated, through test t of Student ($p < 5\%$).

In the first experiment, it was compared the effects of the aging process on the neurons cellular bodies of the myenteric plexus in the antimesenteric and intermediate regions

of the ileal circumference from animals of 3 e 12 months-old (100 neurons/animal). It was verified a significant increase in the neurons cellular bodies in animals of 12 months if compared to animals of 3 months-old, without any significant difference among regions, independent of the age considered. The body weight of the animals increased with age, however the size of small intestine was not changed.

In the second experiment, it was evaluated the morphoquantitative neurons behavior from myenteric plexus, as well the morphometry of elements from the colon proximal wall of 360 days age rats fed with normoproteic diet (22%) (Control group) and hypoproteic diet (8%) (Proteic restriction group) during 150 days, starting at 210° day of life. The neurons number, quantified in 80 microscopic fields, and the morphometry of the neurons cellular bodies (100 neurons/animal), did not showed any significant differences. The animals fed with hypoproteic diet showed the least food intake, the smallest level of proteins in blood, reduction of the proximal colon and thickness of the mucous layer. Independently of the nutritional groups there was a maintenance of the average body weight of rats and the thickness of the external muscular layer during the whole experiment.

The implications of these results are discussed considering the possible alterations promoted by aging and/or by a hypoproteic diet. The age factor promoted an increase of the neurons cellular bodies of the ileum of rats, indicating the need of a neuronal adjustment due to a higher functional demand associated to the neuronal loss typical of aging. The neuronal and non-neuronal components of the proximal colon of rats with 360 days fit to the nutritional condition imposed, guaranteeing the maintenance of their functions.

KEY WORDS: Aging, Hypoproteic diet, Intestine, Myenteric neurons, Myosin-V, Rats.

**Efeito da idade sobre os corpos celulares neuroniais miosina-V
imunoreativos do plexo mioentérico do íleo de ratos**

João Paulo Ferreira Schoffen*, Maria Raquel Marçal Natali

*Departamento de Ciências Morfológicas, Laboratório de Neurônios Entéricos,
Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil*

* Autor para correspondência: João Paulo Ferreira Schoffen. Tel.: +55 44 9963-1284; Fax +55 44 3261-4340. E-mail: jpschoffen@yahoo.com.br (J.P.F. Schoffen).

Número de tabelas: 01

Número de figuras: 04

Resumo

A incidência de problemas gastrointestinais aumentam drasticamente com a idade. Alterações na função neuromuscular gastrointestinal relacionada à idade tem sido demonstrada em humanos e em modelos animais, sendo estas alterações atribuídas em parte, à morte dos neurônios entéricos, fato este que pode levar a modificações no corpo celular dos neurônios remanescentes. Este estudo analisa os efeitos do processo de envelhecimento sobre a área dos corpos celulares neuronais do plexo mioentérico nas regiões antimesentérica e intermediária da circunferência ileal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 12 meses de idade em comparação com animais de 3 meses. O íleo dos animais foi removido e submetido à elaboração de preparados de membrana imunomarcados com anticorpo anti-miosina-V. A partir dos preparados de membrana foram realizadas as análises morfométricas com o auxílio de um sistema de análise de imagens computadorizado, com posterior distribuição dos neurônios em intervalos de classe de $100 \mu\text{m}^2$. A morfometria dos corpos celulares revelou um aumento significativo no tamanho dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos para os animais com 12 meses em relação aos de 3 meses, entretanto, não houve diferença significativa entre as regiões, independente da faixa etária considerada. As implicações desses resultados em relação ao aumento do peso corporal, tamanho do intestino delgado, organização geral do plexo mioentérico, método de marcação neuronal e os possíveis fatores envolvidos na regulação e/ou controle do volume das células nervosas com o avançar da idade são discutidos.

Palavras-chave: envelhecimento, íleo, miosina-V, plasticidade neuronal, plexo mioentérico, ratos, tamanho neuronal

Introdução

O processo de envelhecimento pode envolver mudanças estruturais e funcionais do trato gastrointestinal tais como: redução na freqüência e amplitude dos movimentos peristálticos, redução na digestão e absorção de nutrientes e na imunidade dos intestinos de pessoas idosas. Segundo Hall (2002), Wade (2002) e Wade e Cowen (2004) muitas desordens gastrointestinais se tornam mais comuns com o avançar da idade, especialmente as disfunções motoras.

Como o Sistema Nervoso Entérico do trato gastrointestinal é responsável por coordenar e integrar as atividades motoras intestinais, vários estudos tem sido realizados neste sistema para estabelecer uma etiologia para as desordens motoras que acometem os idosos. Os neurônios do plexo mioentérico, localizados entre a camada circular e longitudinal da túnica muscular, são os moduladores motores mais estudados. Progressiva redução no número destes neurônios com o avançar da idade foram relatadas no esôfago, (Meciano-Filho et al. 1995) estômago, (El-Salhy et al. 1999) intestino delgado, (Santer e Baker 1988; Gabella 1989; El-Salhy et al. 1999; Cowen et al. 2000; Phillips e Powley 2001; Phillips et al. 2003, 2004) e intestino grosso (Santer e Baker 1988; Gomes et al. 1997; El-Salhy et al. 1999; Phillips e Powley 2001; Phillips et al. 2003, 2004) de cobaias, ratos, camundongos e seres humanos, fato que poderia estar implicado nas disfunções motoras decorrentes do envelhecimento.

Além da perda neuronal, mudanças na organização do plexo mioentérico e no tamanho intestinal são observadas durante a ontogênese (Gabella 1971; Dunlap et al. 1988; Gabella 1989; Amenta 1993; Santer 1994; Johnson et al. 1998; Schäfer et al. 1999; Cowen et al. 2000; Phillips e Powley 2001; Phillips et al. 2003, 2004). Análises morfométricas dos corpos celulares neuronais do plexo mioentérico tem revelado um aumento no tamanho neuronal associado à idade no intestino delgado e grosso de ratos (Gabella 1971; Santer e

Baker 1988; Schäfer et al. 1999; Cowen et al. 2000; Phillips et al. 2003) e no esôfago de humanos (Meciano-Filho et al. 1995), o que demonstra a extraordinária capacidade plástica neuronal no tecido nervoso completamente diferenciado.

Estudos m601()-110.22210.3201(m)37.5404()-110.222(q)-0.310251(d)-0.3102(e)-16.2

Esoôfago dnoe ts25-150186(i)17.83docidt-0.3078udo d25id50380252029207643(a)1957826(a216824527m) II d528(d9.96.28419

Para este experimento foram utilizados segmentos do íleo de 10 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, provenientes do Biotério Central, mantidos em gaiolas individuais em sala com temperatura constante, alternância de ciclos de iluminação de claro e escuro de 12 horas, recebendo ração padronizada para roedores NUVILAB-NUVITAL® e água *ad libitum*.

Após serem anestesiados intraperitonealmente com Tiopental sódico (Thionembutal®) (40mg/kg do peso corporal), cinco animais com 3 meses e cinco com 12 meses de idade foram mortos, com realização de laparotomia, perfusão, retirada e mensuração do intestino delgado, sendo coletado especificamente o íleo.

Imunohistoquímica para o plexo mioentérico

O anticorpo escolhido, anti-miosina-V, recentemente descrito para a imunomarcação de neurônios do sistema nervoso entérico (Drengk et al. 2000) é específico e tem a vantagem de marcar exclusivamente neurônios (sensorial, motor ou interneurônio) e seus prolongamentos.

Os animais foram perfundidos com solução salina (1 ml/g de peso corporal) seguida por solução fixadora contendo 10 mM de periodato de sódio, 75 mM de lisina, 1% de paraformaldeído em 37 mM de tampão fosfato, pH 7,4. Imediatamente após a perfusão, cada íleo foi removido e a solução de fixação foi suavemente injetada dentro do lúmen. Depois de aplicar ligaduras para manter a distensão, as amostras foram pós-fixadas na mesma solução por aproximadamente 1 h, desidratadas em etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), clareadas em xilol, reidratadas em etanol (100%, 95%, 90%, e 80%) e armazenadas em etanol 70%. Os fragmentos do íleo foram abertos ao longo da borda mesentérica e dissecados sob estereomicroscópio com trans-iluminação através da remoção da túnica mucosa e túnica submucosa, obtendo-se preparados totais da túnica muscular contendo o plexo mioentérico.

Os tecidos foram lavados quatro vezes em PBS (0,1 M, pH 7,4) e bloqueado por 1h em PBS com 2% de BSA, 2% de soro de cabra e 0,5% de Triton X-100 em temperatura ambiente. A imunomarcação ocorreu com a incubação dos tecidos em 0,89 µg/ml de anticorpo purificado por afinidade específica para o domínio cauda medial da miosina-V (Espreafico et al. 1992; Buttow et al. 2003), diluído em PBS com 2% de BSA, 2% de soro de cabra e 0,1% de Triton X-100 em temperatura ambiente e sob agitação (24 h). Após a incubação, os fragmentos foram lavados duas vezes em PBS com 0,1% de Triton X-100 e duas vezes em PBS com 0,05% de Tween 20. Em seguida, os tecidos foram incubados com anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 24 h em temperatura ambiente sob agitação e lavados quatro

Análise estatística

Os dados morfométricos obtidos foram analisados pelo teste “t” de Student, com nível de significância de 5%. A análise estatística foi conduzida no programa estatístico GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc.).

Resultados

Peso corporal e comprimento do intestino delgado

Verificamos que os animais com 12 meses apresentaram um aumento significativo no peso corporal quando comparado aos animais de 3 meses (3 meses: $404,50 \pm 21,21$ g; 12 meses: $465,80 \pm 40,52$ g), entretanto, o comprimento do intestino delgado não foi alterado com o envelhecimento (3 meses: $127,80 \pm 3,96$ cm; 12 meses: $124,50 \pm 11,05$ cm).

Neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos

Independente da região da circunferência ileal ou da idade dos animais (3 e 12 meses), a disposição geral do plexo mioentérico não foi alterada, sendo que os neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos apresentaram-se agrupados em gânglios formando malhas predominantemente retangulares interconectadas por fibras (Figura 1a e 1b). Verificamos que os neurônios presentes nos gânglios mostraram-se diferenciados quanto à intensidade da imunomarcação neuronal em ambas as faixas etárias, no entanto os neurônios dos animais com 12 meses apresentaram marcação mais acentuada e fibras nervosas mais evidentes (Figura 1c e 1d).

A distribuição dos neurônios em intervalos de classe de $100 \mu\text{m}^2$ nas regiões antimesentérica e intermediária dos animais com 3 meses de idade demonstrou uma variabilidade na área do corpo celular de $61,50$ a $678,76 \mu\text{m}^2$, apresentando uma maior

percentagem de neurônios variando de 101 a 200 μm^2 em ambas as regiões (Figura 2), já nos animais com 12 meses a área variou de 86,72 a 813,98 μm^2 , sendo que o predomínio neuronal para a região antimesentérica foi no intervalo de 201 a 300 μm^2 , enquanto para a intermediária foi de 101 a 200 μm^2 (Figura 3).

A média total da área celular entre as idades revelou aumento estatisticamente significativo do corpo celular neuronal no ileo dos animais com 12 meses, entretanto não houve diferença significativa entre as regiões, independente da faixa etária considerada (Tabela 1). Ao compararmos os neurônios dos animais com 3 e 12 meses de idade, considerando as duas regiões, verificamos um evidente aumento de neurônios maiores do que 201 μm^2 nos animais mais velhos quando comparado aos animais jovens (Figura 4).

Discussão

A comparação do peso corporal entre os animais das duas faixas etárias (3 e 12 meses de idade), demonstrou aumento significativo deste parâmetro nos animais mais velhos em relação aos jovens, fato que pode ser justificado pelo crescimento do animal com o avançar da idade. De acordo com Phillips e Powley (2001), o peso corporal varia com a idade, sendo que os ratos continuam a ganhar peso até aproximadamente 21 meses, declinando rapidamente após esta idade.

Contrariamente ao peso corporal, o comprimento do intestino delgado manteve-se inalterado nos animais de 3 e 12 meses de idade. Resultado semelhante foi observado por Phillips e Powley (2001) em estudo com ratos nas idades de 3, 12, 21, 24 e

interferir no comprimento intestinal levando a um gradativo aumento, no entanto o mesmo ocorreria em idades mais avançadas para ratos (Dunlap et al. 1988; Johnson et al. 1998; Phillips et al. 2003, 2004) e cobaias (Gabella 1989), o que contraria as afirmações de Stump (1999). Segundo este autor o envelhecimento leva a uma redução no tamanho dos órgãos e não a um aumento, devido a menor taxa metabólica verificada com o evolver da idade.

Neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos

Dentre as diferentes técnicas existentes para a marcação de populações mioentéricas, o emprego do método de imunolocalização da proteína motora miosina-V vêm se destacando atualmente na literatura científica. Drengk et al. (2000), Buttow et al. (2003) e Zanoni et al. (2005) são alguns dos trabalhos que utilizaram este método.

Segundo Hasson e Mooseker (1997) e Langford e Molyneaux (1998), nas células nervosas, esta proteína pode ser encontrada nos terminais pré-sinápticos, organelas envoltas por membrana e junto à membrana plasmática. Parece estar relacionada com a dinâmica das membranas (endocitose e exocitose), transporte axoplasmático e liberação de neurotransmissores, sendo, por isso, considerada um elemento útil e preciso para a marcação e investigação morfoquantitativa neuronal.

Os preparados de membrana marcados pelo método imunohistoquímico para a miosina-V deste estudo, demonstram que a disposição geral do plexo mioentérico foi mantida com o avançar da idade. Não houve variação entre as regiões antimesentérica e intermediária da circunferência ileal, os neurônios mioentéricos encontravam-se agrupados em gânglios interconectados por fibras e formando malhas predominantemente retangulares em ambas as idades investigadas (3 e 12 meses).

Santer (1994) estudando o intestino delgado de ratos com 4, 24 e 30 meses

de idade verificou, assim como nós, que o padrão do plexo foi preservado durante o processo de envelhecimento. Entretanto, resultado divergente foi observado por Gabella (1989), que verificou mudanças na estrutura e formato dos gânglios e arquitetura dos plexos no intestino delgado de cobaias com idade entre 26-30 meses quando comparado a animais com 3-4 meses. O autor destaca a existência de maior separação entre os gânglios e poucos gânglios por área nos animais mais velhos, atribuindo estas diferenças à reorganização estrutural necessária para acomodar os elementos remanescentes de modo a garantir as propriedades fisiológicas, visto que o envelhecimento levaria a perda neuronal.

Ao compararmos a intensidade da marcação neuronal entre as diferentes idades, observamos uma heterogeneidade na coloração dos neurônios em ambas as faixas etárias. Constatamos uma marcação mais evidente nos neurônios e fibras nervosas do plexo mioentérico do íleo dos animais mais velhos (12 meses) quando comparado aos jovens (3 meses).

Apesar da utilização de diferentes marcadores neuronais, maior intensidade de coloração associada à idade foi observada por Schäfer et al. (1999) no duodeno e colo de ratos, ressaltando que a intensidade da coloração com o azul cuprolínico (população total), varia de acordo com a idade e o segmento intestinal; quanto maior a maturidade, maior será a intensidade da coloração. Santer (1994) estudando ratos com 4, 24 e 30 meses, verificou maior intensidade nas fibras nervosas na sub-população NADPH-diaforase do plexo mioentérico dos animais mais velhos.

Considerando o método empregado neste estudo (imunolocalização da proteína motora miosina-V), a heterogeneidade na intensidade da coloração neuronal observada em ambas as faixas etárias, poderia indicar diferentes níveis de atividade neuronal (Drengk et al. 2000). A marcação mais evidente nos neurônios e fibras nervosas dos animais com 12 meses, poderia estar associada a um aumento na atividade celular e expressão da

miosina-V que estaria ocorrendo no plexo mioentérico destes animais quando comparado aos de 3 meses de idade.

Azevedo et al. (2004) estudando a expressão da miosina-V no desenvolvimento embrionário do sistema nervoso de pintinhos, constataram um crescente aumento na expressão da miosina-V durante os vários estágios da embriogênese. Este fato indicaria seu papel geral na função neuronal e demonstraria sua expressão temporal e sítio-específica nas células nervosas, daí sugerindo que a expressão da miosina-V está relacionada com o seu recrutamento para tarefas celulares específicas, ou seja, depende da demanda celular. Esse padrão temporal distinto na expressão da miosina-V também foi descrito por Calliari et al. (2002) no processo de regeneração do nervo ciático após injúria nervosa.

Consideramos que o aumento na intensidade da marcação neuronal e das fibras nervosas nos animais com 12 meses de idade, indicaria uma adaptação dos neurônios a uma nova situação: as alterações celulares promovidas pelo envelhecimento. Estas poderiam conduzir a uma maior mobilização de componentes intracelulares, como por exemplo, o aumento no transporte de neurotransmissores objetivando suprir a atividade funcional de possíveis perdas neuronais que tenham ocorrido com a idade. Inferimos, portanto, que a proteína miosina-V estaria envolvida com as mudanças plásticas que acontecem não só durante o desenvolvimento, fato já relatado por Tilelli et al. (2003) para a miosina-V do cérebro de ratos, mas também em decorrência do envelhecimento.

Com relação ao tamanho neuronal, verificamos que as médias obtidas para as regiões antimesentérica e intermediária da circunferência do íleo não diferiram estatisticamente em nenhuma das faixas etárias investigadas (3 e 12 meses), fato que possibilitou a manutenção na distribuição neuronal entre essas duas regiões.

Resultado semelhante foi obtido por Miranda-Neto et al. (2000), que analisaram o tamanho neuronal nessas mesmas regiões do duodeno de ratos com 7 meses de

idade, e também não obtiveram variações significativas para o tamanho do corpo celular.

Apesar da existência de diferenças na densidade do plexo mioentérico entre as regiões da circunferência intestinal (Santer 1994; Miranda-Neto et al. 2001), nossos resultados demonstram uma manutenção na média das áreas dos corpos celulares, bem como na distribuição dos neurônios em intervalos de classe de $100 \mu\text{m}^2$ no íleo de todos os animais, entre as diferentes regiões.

Apesar da manutenção no tamanho e distribuição neuronal entre as duas regiões confrontadas, o que permitiu a somatória das duas regiões, a comparação da média das áreas neuronais entre os animais com 3 e 12 meses de idade, revelaram que houve um aumento na área do corpo celular neuronal com o avançar da idade.

O aumento no corpo celular de neurônios mioentéricos durante o processo de envelhecimento, já foi verificado por Gabella (1971), Santer e Baker (1988), Schäfer et al. (1999), Cowen et al. (2000) e Phillips et al. (2003) no intestino delgado e grosso de ratos, e por Meciano-Filho et al. (1995) no esôfago de humanos, entretanto, pouco se conhece sobre os fatores que promovem tal crescimento com o evolver da idade.

Entre os fatores que promoveriam tal aumento, algumas hipóteses são apontadas na literatura, tais como: o aumento no comprimento do intestino e da espessura da túnica muscular (Gabella 1971, 1989; Meciano-Filho et al. 1995; Schäfer et al. 1999); reorganização dos neurônios remanescentes, incluindo entre estas mudanças, o crescimento do corpo celular em função da redução neuronal típica da idade, garantindo seu papel funcional (Santer e Baker 1988; Gabella 1989); ou o aumento no tamanho neuronal ocorreria em função do estresse e da demanda funcional sobre certos tipos de neurônios remanescentes de uma gradativa perda neuronal, de modo a permitir a sobrevivência e adaptação dos neurônios que restaram para suprir a manutenção das funções intestinais (Phillips et al. 2003).

Diante das hipóteses apresentadas, e considerando o aumento na área do

corpo celular dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos dos animais de 12 meses, podemos descartar a possibilidade do aumento no comprimento intestinal ser o fator desencadeante da hipertrofia neuronal, pois obtivemos uma manutenção do mesmo. Entretanto, podemos inferir que aos 12 meses de idade para ratos, já se faz necessário um ajuste neuronal em função da maior demanda funcional, a qual estaria associada à perda neuronal típica da idade e refletida pelo maior tamanho neuronal, e pela maior intensidade na marcação da proteína miosina-V, verificada em nosso experimento.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Dr^a. Enilza Maria Espreafico (USP – Ribeirão Preto, Brasil) pelo fornecimento do anticorpo anti-miosina-V, a Dr^a Nilza Cristina Buttow, Angélica Soares, Priscila de Freitas e ao corpo técnico do Departamento de Ciências Morfofisiológicas, pelo excelente suporte técnico. Este trabalho foi financiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Referências

- Amenta F (1993) Aging of the autonomic nervous system. Library of Congress, Florida, USA
- Azevedo A, Lunardi LO and Larson RE (2004) Immunolocalization of myosin Va in the developing nervous system of embryonic chicks. *Anat Embryol* 208: 395-402
- Buttow NC, Zucoloto S, Espreafico EM, Gama P and Alvares, EP (2003) Substance P enhances neuronal area and epithelial cell proliferation after colon denervation in rats. *Dig Dis Sci* 48: 2069-2076
- Calliari A, Sotelo-Silveira J, Costa MC, Nogueira J, Cameron LC, Kun A, Benech J and Sotelo JR (2002) Myosin Va is locally synthesized following nerve injury. *Cell Motil Cytoskeleton* 51: 169-176
- Cowen T, Johnson RJR, Soubeyre V and Santer RM (2000) Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. *Gut* 47: 653-660
- Drengk AC, Kajiwara JK, Garcia SB, Carmo VS, Zucoloto S, Larson RE and Espreafico EM (2000) Immunolocalisation of myosin-V in the rat enteric nervous system. *J Aut Nerv Syst* 78: 109-112
- Dunlap CE, Mattox H, Nelson JB and Castell DO (1988) Morphometric analysis of enteric neurons in small intestine of the Fischer rat across age. *Gastroenterology* 94: 107.
- El-Salhy M, Sandström O and Holmlund F (1999) Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. *Mech Ageing Dev* 107: 93-103
- Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AAC, De Camilli P, Larson RE and Mooseker MS (1992) Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V

norvegicus. Acta Scientiarum 20: 221-224

Gabella G (1971) Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. J Anat 109: 81-94

Gabella G (1989) Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. Gastroenterology 96: 1487-1493

Gomes OA, Souza RR and Liberti EA (1997) A preliminary investigation of the effects aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. Gerontology 43: 210-217

Hall KE (2002) Aging and neural control of the GI tract II. Neural control of the aging gut: can an old dog learn new tricks? Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283: G827-G832

Hasson T and Mooseker MS (1997) The growing family of myosin motors and their role in neurons and sensory cells. Curr Opin Neurobiol 7: 615-623

Johnson RJR, Schemann M, Santer RM and Cowen T (1998) The effects of age on the overall population and on subpopulations of myenteric neurons in the rat small intestine. J Anat 192: 479-488

Langford GM and Molyneaux BJ (1998) Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. Brain Res Rev 28: 1-8

Meciano-Filho J, Carvalho VC and De Souza RR (1995) Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: a preliminary investigation. Gerontology 41: 18-21

Miranda-Neto MH, Furlan MMDP, Sant'ana DMG, Molinari SL and Souza JA (2000) Evaluation of the areas of neuronal cell bodies and nuclei in the myenteric plexus of the duodenum of adult rats. Arq Neuropsiquiatr 58: 246-251

Miranda-Neto MH, Molinari SL, Natali MRM and Sant'ana DMG (2001) Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. Arq

Neuropsiquiatr 59: 54-59

Phillips RJ and Powley TL (2001) As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. J Comp Neurol 434: 358-377

Phillips RJ, Kieffer EJ and Powley TL (2003) Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. Auton Neurosci 106: 69-83

Phillips RJ, Kieffer EJ and Powley TL (2004) Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. Anat Embryol 209: 19-30

Santer RM (1994) Survival of population of NADH-diaforase stained myenteric neurons in small intestine of aged rats. J Auton Nerv Syst 49: 115-121

Santer RM and Baker DM (1988) Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. J Auton Nerv Syst 25: 59-67

Schäfer KH, Hänsgen A and Mestres P (1999) Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. Anat Rec 256: 20-28

Stump SE (1999) Nutrição relacionada ao diagnóstico e tratamento. Manole, São Paulo, BR

Tilelli CQ, Martins AR, Larson RE and Garcia-Cairasco N (2003) Immunohistochemical localization of myosin Va in the adult rat brain. Neuroscience 121: 573-586

Wade PR and Cowen T (2004) Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. Neurogastroenterol Motil 16: 19-23

Wade RW (2002) Aging and neural control of the GI tract I. Age-related changes in the enteric nervous system. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283: G489-G495

Zanoni JN, Freitas P, Pereira RV, Santos Pereira MA and Miranda-Neto MH (2005) Effects of supplementation with ascorbic acid for a period of 120 days on the myosin-V and NADPHd positive myenteric neurons of the ileum of rats. Anat Histol Embryol 34: 149-153

Tabela 1. Área do corpo celular neuronal (μm^2) nas regiões antimesentérica e intermediária do íleo dos animais com 3 e 12 meses de idade (n=5). Média \pm desvio padrão.

Região	Animais	
	3 meses	12 meses
Antimesentérica	$262,75 \pm 27,59\text{a}$ ^(1,2)	$316,42 \pm 44,97\text{a}$
Intermediária	$243,06 \pm 31,40\text{a}$ ^(1,2)	$288,10 \pm 39,66\text{a}$
Média total	$252,90 \pm 24,94\text{a}$ ⁽²⁾	$302,26 \pm 39,55\text{b}$

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra (vertical), não diferem estatisticamente (teste t de Student, p> de 5%).

⁽²⁾ Médias seguidas de mesma letra (horizontal), não diferem estatisticamente (teste t de Student, p> de 5%).

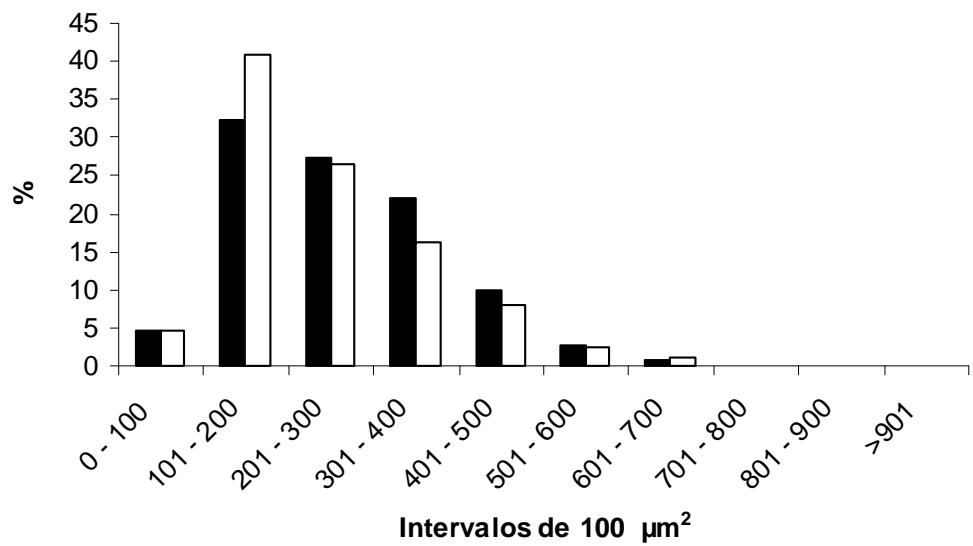


Figura 2. Distribuição por tamanho dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos no íleo dos animais com 3 meses de idade, classificados em intervalos de $100 \mu\text{m}^2$. Região antimesentérica (■) e intermediária (□).

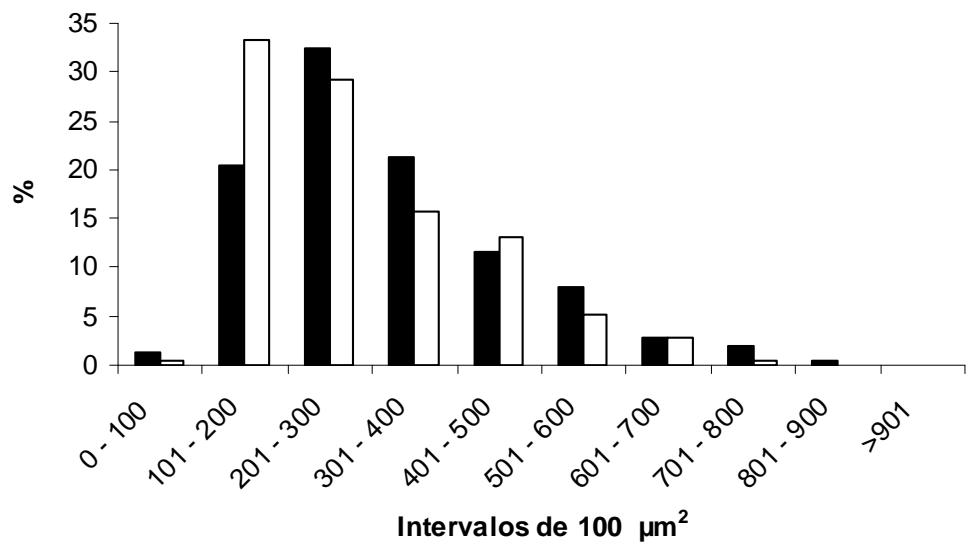


Figura 3. Distribuição por tamanho dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos no íleo dos animais com 12 meses de idade, classificados em intervalos de $100 \mu\text{m}^2$. Região antimesentérica (■) e intermediária (□).

Figura aii17.8388(c)3.72668(a)3.72668(da)-0.310251oami37.54048()970.119(i17.8382(na19.70221ti)-

The effect of age on the immunoreactive myosin-V neuronal cellular bodies of
the myenteric plexus of the ileum of rats

João Paulo Ferreira Schoffen*, Maria Raquel Marçal Natali

*Department of Morphophysiological Sciences, Enteric Neurons Laboratory, State University
of Maringá, Avenida Colombo 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brazil*

* Corresponding author: João Paulo Ferreira Schoffen. Tel.: +55 44 9963-1284; Fax +55 44
3261-4340. *E-mail:* jpschoffen@yahoo.com.br (J.P.F. Schoffen).

Number of tables: 01

Number of figures: 04

Abstract

The incidence of gastrointestinal problems increases drastically with age. Alterations in the gastrointestinal neuromuscular function related to age have been demonstrated in human and animal models. These alterations are attributed partly to the death of the enteric neurons, which can lead to changes in the cellular body of the remaining neurons. This study analyzes the effects of the aging process on the area of the neuronal cell bodies of the myenteric plexus in the antimesenteric and intermediate regions of the ileal circumference of Wistar rats (*Rattus norvegicus*), 12 months-old, comparing them to 3 months-old animals. The ileum of the animals was removed and submitted to elaboration of whole-mount preparations immunostained by the antibody anti-myosin-V. We performed the morphometric analyzes with whole-mount preparations with the help of a computerized image analyze system, with a subsequent distribution of neurons in classes intervals of $100 \mu\text{m}^2$. The cellular body morphometry revealed a significant increase in the size of the myosin-V immunoreactive myenteric neurons of the 12 months animals when compared to the 3 months-old. However, there was no significant difference between the regions, independent of the age considered. The implications of those results in relation to the increase of the body weight, size of the small intestine, general organization of the myenteric plexus, method of neuronal staining and the possible factors involved in the regulation and/or controls of the volume of nervous cells due to aging are discussed.

Key words: aging, ileum, myenteric plexus, myosin-V, neuronal plasticity, neuronal size, rats

Introduction

The aging process can involve structural and functional changes of the gastrointestinal tract such as: reduction in the frequency and amplitude of the peristaltic

movements, reduction in the digestion and absorption of nutrients and in the intestine immunity of elderly. According to Hall (2002), Wade (2002) and Wade and Cowen (2004) several gastrointestinal disorders become more common with aging, especially motor dysfunctions.

Since the Enteric Nervous System of the gastrointestinal tract is responsible for coordinating and integrating the intestinal activities, several studies have been made in this system to establish an etiology for the motor disorders afflicting the elderly. The myenteric plexus neurons, located between the circular and longitudinal layer of the muscular layer, are the most studied motor modulators. Progressive reduction in the number of these neurons due to aging have been reported in the esophagus (Meciano-Filho et al. 1995), stomach (El-Salhy et al. 1999), small intestine (Santer and Baker 1988; Gabella 1989; El-Salhy et al. 1999; Cowen et al. 2000; Phillips and Powley 2001; Phillips et al. 2003, 2004) and large intestine (Santer and Baker 1988; Gomes et al. 1997; El-Salhy et al. 1999; Phillips and Powley 2001; Phillips et al. 2003, 2004) of guinea pigs, rats, mice and human beings, a fact that could be implicated in the current motor dysfunctions due to the aging process.

Besides the loss of neurons, changes in the organization of the myenteric plexus and in the intestinal size have been observed during the ontogenesis (Gabella 1971; Dunlap et al. 1988; Gabella 1989; Amenta 1993; Santer 1994; Johnson et al. 1998; Schäfer et al. 1999; Cowen et al. 2000; Phillips and Powley 2001; Phillips et al. 2003, 2004). Morphometrical analyses on the neuronal cell bodies of the myenteric plexus has revealed an increase in the size of neurons related to the age in the small and large intestine of rats (Gabella 1971; Santer and Baker 1988; Schäfer et al. 1999; Cowen et al. 2000; Phillips et al. 2003) and in the esophagus of human beings (Meciano-Filho et al. 1995). This demonstrates the extraordinary neuronal plasticity capacity in the completely differentiated nervous tissues.

Morphological and quantitative studies of the myenteric plexus usually

study a specific segment of the digestive tube. However, several authors have been pointing out the occurrence of a variability in the neuronal density, which may be observed in a single gastrointestinal segment, when different regions of the stomach or of the intestinal circumference are compared (Santer 1994; Fregonesi et al. 1998; Miranda-Neto et al. 2001).

This fact should be considered of fundamental importance in quantitative and morphological analyses because phylogenetic and pathophysiological comparisons as well as those related to the aging process can be erroneously interpreted due to random selection of neurons along the intestinal circumference (Miranda-Neto et al. 2000).

Therefore, taking in consideration the occurrences of morphologic alterations of the myenteric plexus caused by the aging process such as, variations in the area of the cellular body, this study analyzes the effects of the aging process on the area of the neuronal cell bodies immunoreactive to myosin-V of the myenteric plexus of Wistar rats, aged 3 and 12 months, comparing the antimesenteric and intermediate regions of the ileal circumference.

Material and Methods

Animal treatment

All the procedures of this study regarding the use of animals were in agreement with the ethical principles adopted by the Brazilian School of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the State University of Maringá.

For this experiment, we used the ileum segments of 10 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), from Central Biotery. The animals were kept in individual cages, in room with constant temperature, with a photoperiod of 12 hours, receiving standard chow NUVILAB-NUVITAL® and water *ad libitum*.

After being anesthetized intraperitoneally with sodium Thiopental (Thionembutal[®]) (40mg/kg of body weight), five animals aged 3 months and five aged 12 months were sacrificed. The laparotomy was performed, followed by perfusion, collection and measurement of the small intestine, specifically the ileum.

Immunohistochemistry of the myenteric plexus

The antibody we chose, anti-myosin-V, recently described for the immunostaining of neurons from the enteric nervous system (Drengk et al. 2000), is specific and it has the advantage of staining only neurons (sensorial, motor or interneuron) and their processes.

The animals were perfused with saline solution (1 ml/g body weight) followed fixative solution containing 10 mM sodium periodate, 75 mM lysine, 1% paraformaldehyde in 37 mM phosphate buffer, pH 7.4. Immediately after perfusion, each ileum was removed and the fixative solution was gently inject into the lumen. After applying ligatures to maintain the distension, the samples were postfixed in the same solution as above for 1 hr, dehydrated in ethanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95% and 100%), cleared in xylol, rehydrated in ethanol (100%, 95%, 90%, and 80%) and stored in ethanol 70%. The ileum fragments were open the mesenteric border and dissected under a stereomicroscope with trans-illumination through the removal of the mucosa and submucosa layer, thus, obtaining whole-mount muscular layer preparations containing the myenteric plexus. The tissues were washed four times in PBS (0.1M, pH 7.4) and blocked for 1 hr in PBS with 2% BSA, 2% goat serum and 0.5% Triton X-100 at room temperature. Immunostaining proceeded with the incubation of tissues in 0.89 µg/ml of affinity-purified antibody specific to the myosin-V medial tail domain (Espreafico et al. 1992; Buttow et al. 2003) diluted in the PBS with 2% BSA, 2% goat serum and 0.1% Triton X-100 at room temperature and under shaking (24 h).

After incubation, the fragments were washed twice in PBS with 0.1% Triton X-100 and twice in PBS with 0.05% Tween 20. Soon after, the tissues were incubated with 10 µg/ml secondary antibody conjugated with peroxidase for 24 hours at room temperature under agitation and washed four times during 15 min in PBS with 0.05% Tween 20. The immunoreaction was developed with 0.75 mg/ml Diaminebenzidine in PBS and 0.03% H₂O₂ for 10 min. Samples were placed in a gel mounting medium containing 50% glycerol, 0.07 g/ml gelatin in PBS and 2 µl/ml phenol.

Neuronal morphometrical analysis

For this analysis, images of the cell bodies of myosin-V immunoreactive myenteric neurons of the whole-mounts preparations were previously taken with a high-resolution digital camera coupled to a optical microscope Olympus BX50 with 40X objective. We took pictures of 50 neurons in the antimesenteric region and of 50 neurons in the intermediate region of the ileal circumference of each animal, in a total of 250 cells per region and 500 cells per age group. They were measured with aid of a computerized image analysis system (Image-Pro Plus® 4.5 – Media Cibernetics). Then, the neurons of each age group were classified in class intervals of 100 µm²; we calculated the corresponding percentage for each age and region.

Statistical analysis

The obtained morphometric data were analyzed by the test "t" of Student, with a significance level of 5%. The statistical analysis was accomplished in the statistical program GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc.).

Results

Body weight and length of the small intestine

We observed that the animals aged 12 months presented a significative increase in their body weight when compared to the 3 months-old animals (3 months: 404.50 ± 21.21 g; 12 months: 465.80 ± 40.52 g). However, the length of the small intestine was not altered by age (3 months: 127.80 ± 3.96 cm; 12 months: 124.50 ± 11.05 cm).

Myosin-V immunoreactive myenteric neurons

Regardless of the region of the ileal circumference or the age of the animals (3 and 12 months-old), the general disposition of the myenteric plexus was not altered; the myosin-V immunoreactive myenteric neurons were arranged in ganglia forming predominantly rectangular meshes interwoven by fibers (Figure 1a and 1b). We observed that the neurons present in the ganglia were differentiated as for the intensity of their neuronal staining in both age groups. However, the neurons of the 12 months-old animals had a more evident staining and clearer nervous fibers (Figure 1c and 1d).

The distribution of neurons in class intervals of $100 \mu\text{m}^2$ in the antimesenteric and intermediate regions of the animals aged 3 months showed a variation in the cell body area ranging from 61.50 to $678.76 \mu\text{m}^2$, with a larger percentage of neurons varying from 101 to $200 \mu\text{m}^2$ in both regions (Figure 2). In the 12 months-old animals the area ranged from 86.72 to $813.98 \mu\text{m}^2$; the neuronal predominance in the antimesenteric region ranged from 201 to $300 \mu\text{m}^2$, while in the intermediate region from 101 to $200 \mu\text{m}^2$ (Figure 3).

The overall mean of the cellular area between both ages showed as statistically significative increase of the neuronal cell body in the ileum of the 12 months-old animals. There was no significative difference between the regions, regardless of the considered age group (Table 1). When comparing the neurons of the animals aged 3 and 12

months, considering the two regions, we observed an evident increase in the presence of neurons with a size bigger than $201 \mu\text{m}^2$ in the older animals when compared to the younger (Figure 4).

Discussion

The comparison of the body weight between the animals of the two age groups (3 and 12 months) showed a significative increase of this parameter in the older animals, which may be justified by the growth of the animal with the age. According to Phillips and Powley (2001), the body weight varies with age, and rats keep gaining weight until approximately 21-months-old, losing weight fast after reaching this age.

Unlike the body weight, the length of the small intestine remained unaffected in both age groups. A similar result was observed by Phillips and Powley (2001) in their study with rats aged 3, 12, 21, 24 and 27 months-old. They observed that the intestinal length was maintained until the age of 12 months; after 21 months of age, a significative increase in the length was observed.

Other studies reinforce the subject that the age factor could interfere in the intestinal length leading to a gradual increase, although the same would happen in later ages for rats (Dunlap et al. 1988; Johnson et al. 1998; Phillips et al. 2003, 2004) and guinea pigs (Gabella 1989), contradicting the reports of Stump (1999). According to this author, aging leads to a reduction in the organ size and not an increase, due to the smaller metabolic rate observed with aging.

Myosin-V immunoreactive myenteric neurons

Among the different existing techniques for the staining myenteric populations, the use of the myosin-V motor protein immunolocalisation method is standing

out now in the scientific literature. Drengk et al. (2000), Buttow et al. (2003) and Zanoni et al. (2005) are some of the works that used this method.

According to Hasson and Mooseker (1997) and Langford and Molyneaux (1998), in the nervous cells this protein can be found in the pre-synaptic terminals, in organellas enveloped by membrane and close to the plasmatic membrane. The protein seems to be related to the membrane dynamics (endocytoses and exocytoses), axoplasm transport and neurotransmitters release, thus, being considered a useful and precise element for the neuronal morphoquantitative demarcation and investigation.

The immunostained whole-mount preparations in this study show that the general disposition of the myenteric plexus was maintained. There was no variation between the antimesenteric and intermediate regions of the ileal circumference; the myenteric neurons were arranged in ganglions interconnected by fibers and formed predominantly rectangular nets in both ages groups (3 and 12 months).

Santer (1994), when studying the small intestine of 4, 24 and 30 months-old rats, observed (like we did) that the pattern of the plexus was preserved during the aging process. However, a different result was observed by Gabella (1989), who noticed changes in the ganglions structure and shape and in the architecture of the plexus in the small intestine of guinea pigs aged from 26-30 months when compared to 3-4-months animals. The author points out the existence of larger distances between the ganglions and also few ganglions per area in the older animals. He attributes these differences to the necessary structural reorganization to accommodate the remaining elements in order to ensure the physiologic properties, since aging would lead to neuronal loss.

When comparing the intensity of the neuronal staining between both ages, we observed heterogeneity in the coloration of the neurons. We noticed a more evident staining in the neurons and nervous fibers of the myenteric plexus of the ileum of the older

animals (12 months).

Despite of the use of different neuronal markers, Schäfer et al. (1999) also observed larger coloration intensity associated to the age in the duodenum and colon of rats. The intensity of the Cuprolic Blue staining (total population) varies according to the age and the intestinal segment; the older the animal, the more intense will the staining be. Santer (1994), when studying 4, 24 and 30 months-old rats, observed larger intensity in the nervous fibers in the sub-population NADPH-diaphorase of the myenteric plexus of the older animals.

Taking into account the method we employed in this study (immuno-localisation of the myosin-V protein), the intensity heterogeneity of the neuronal coloration observed in both age groups could indicate different levels of neuronal activity (Drengk et al. 2000). The more evident staining in the neurons and nervous fibers of the 12 months-old animals could be related to an increase in the cellular activity and expression of the myosin-V that could be taking place in the myenteric plexus of these animals.

Azevedo et al. (2004), when studying the expression of myosin-V in the embryonic development of the nervous system of chicks, noticed a crescent increase in the expression of myosin-V during the several stages of the embryogenesis. This could indicate its general role in the neuronal function and would demonstrate its temporary and target-site expression in the nervous cells, thus, suggesting that the expression of myosin-V is related to its recruitment for specific cellular tasks, i.e., it depends on the cellular demand. Calliari et al. (2002) have also described this distinct temporal pattern in the expression of myosin-V in the process of the regeneration of the sciatic nerve after nervous injury.

We considered that this increase in the staining intensity of neurons and nervous fibers in the 12 months-old animals would indicate an adaptation of the neurons to a new situation: the cellular alterations promoted by the aging process. These could lead to a larger mobilization of intracellular components, such as the increase in the transport of

neurotransmitters with the aim of covering the functional activity of possible neuronal losses that may have taken place due to age. We inferred, therefore, that the myosin-V protein may be involved with the plastic changes that take place not only during the developing stage, as already reported by Tilelli et al. (2003) for myosin-V in the brain of rats, but also due to aging.

As for the neuronal size, we observed that the obtained means for the antimesenteric and intermediate regions of the ileum circumference were not statistically different in any of the investigated age groups (3 and 12 months), which allowed the maintenance of the neuronal distribution between those two regions.

A similar result was obtained by Miranda-Neto et al. (2000) when they analyzed the neuronal size in those same regions of the duodenum of 7 months-old rats. They also did not find significative variations for the cell body size.

Despite the existing differences in the density of the myenteric plexus between the intestinal circumference regions (Santer 1994; Miranda-Neto et al. 2001), our results show that the means of the cell body area as well as the distribution of the neurons in class intervals of $100 \mu\text{m}^2$ in the ileum of all animals were maintained, among the different regions.

Although the size and distribution neuronal between the two confronted regions were maintained (which allowed adding the two regions), the comparison of the mean of the neuronal areas between the 3 and 12 months-old animals revealed there was an increase in the area of the neuronal cell body due to age.

The increase in the cell body of myenteric neurons through the aging process was already observed by Gabella (1971), Santer and Baker (1988), Schäfer et al. (1999), Cowen et al. (2000) and Phillips et al. (2003) in the small and large intestine of rats, and by Meciano-Filho et al. (1995) in the esophagus of human beings. However, little is

known about the factors responsible for such growth with age.

Among the factors that could lead to such increase, the literature mentions some hypotheses, such as: the increase in the length of the intestine and of the thickness of the muscular layer (Gabella 1971, 1989; Meciano-Filho et al. 1995; Schäfer et al. 1999); the reorganization of the remaining neurons – including the growth of the cellular body due to the neuronal reduction common with age, ensuring its functional role (Santer and Baker 1988; Gabella 1989); or the increase in the neuronal size neuronal – would take place due to the stress and to the functional demand on certain kinds of neurons remaining from a gradual neuronal loss, thus, allowing the survival and adaptation of the remaining neurons to help the intestinal functions maintenance (Phillips et al. 2003).

Taking in consideration the hypotheses presented and the increase in the area of the cell body of the myenteric neurons immunoreactive by myosin-V of the 12 months-old animals, we can dismiss the possibility of the increase in the intestinal length as the triggering factor of the neuronal hypertrophy, for our results showed they did not change. However, we can infer that rats at 12 months of age already need a neuronal adjustment due to the larger functional demand, which might be associated to the age-related neuronal loss and is shown by the larger neuronal size, and by the larger intensity in the staining by myosin-V protein, observed in our experiment.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Enilza Maria Espreafico (USP – Ribeirão Preto, Brazil) for supplying the antibody anti-myosin-V, Dr. Nilza Cristina Buttow, Angélica Soares, Priscila de Freitas and to the technical body of Department of Morphophysiological Sciences, for their superb technical support. This work was financed by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- Amenta F (1993) Aging of the autonomic nervous system. Library of Congress, Florida, USA
- Azevedo A, Lunardi LO and Larson RE (2004) Immunolocalization of myosin Va in the developing nervous system of embryonic chicks. *Anat Embryol* 208: 395-402
- Buttow NC, Zucoloto S, Espreafico EM, Gama P and Alvares, EP (2003) Substance P enhances neuronal area and epithelial cell proliferation after colon denervation in rats. *Dig Dis Sci* 48: 2069-2076
- Calliari A, Sotelo-Silveira J, Costa MC, Nogueira J, Cameron LC, Kun A, Benech J and Sotelo JR (2002) Myosin Va is locally synthesized following nerve injury. *Cell Motil Cytoskeleton* 51: 169-176
- Cowen T, Johnson RJR, Soubeyre V and Santer RM (2000) Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. *Gut* 47: 653-660
- Drengk AC, Kajiwara JK, Garcia SB, Carmo VS, Zucoloto S, Larson RE and Espreafico EM (2000) Immunolocalisation of myosin-V in the rat enteric nervous system. *J Aut Nerv Syst* 78: 109-112
- Dunlap CE, Mattox H, Nelson JB and Castell DO (1988) Morphometric analysis of enteric neurons in small intestine of the Fischer rat across age. *Gastroenterology* 94: 107.
- El-Salhy M, Sandström O and Holmlund F (1999) Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. *Mech Ageing Dev* 107: 93-103
- Espreafico EM, Cheney RE, Matteoli M, Nascimento AAC, De Camilli P, Larson RE and Mooseker MS (1992) Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J Cell Biol* 119: 1541-1557
- Fregonesi CEPT, Miranda-Neto MH and Molinari SL (1998) Estudo morfológico e quantitativo dos neurônios do plexo mientérico do corpo do estômago de *Rattus*

norvegicus. Acta Scientiarum 20: 221-224

Gabella G (1971) Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. J Anat 109: 81-94

Gabella G (1989) Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. Gastroenterology 96: 1487-1493

Gomes OA, Souza RR and Liberti EA (1997) A preliminary investigation of the effects aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. Gerontology 43: 210-217

Hall KE (2002) Aging and neural control of the GI tract II. Neural control of the aging gut: can an old dog learn new tricks? Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283: G827-G832

Hasson T and Mooseker MS (1997) The growing family of myosin motors and their role in neurons and sensory cells. Curr Opin Neurobiol 7: 615-623

Johnson RJR, Schemann M, Santer RM and Cowen T (1998) The effects of age on the overall population and on subpopulations of myenteric neurons in the rat small intestine. J Anat 192: 479-488

Langford GM and Molyneaux BJ (1998) Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. Brain Res Rev 28: 1-8

Meciano-Filho J, Carvalho VC and De Souza RR (1995) Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: a preliminary investigation. Gerontology 41: 18-21

Miranda-Neto MH, Furlan MMDP, Sant'ana DMG, Molinari SL and Souza JA (2000) Evaluation of the areas of neuronal cell bodies and nuclei in the myenteric plexus of the duodenum of adult rats. Arq Neuropsiquiatr 58: 246-251

Miranda-Neto MH, Molinari SL, Natali MRM and Sant'ana DMG (2001) Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. Arq

Neuropsiquiatr 59: 54-59

Phillips RJ and Powley TL (2001) As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. J Comp Neurol 434: 358-377

Phillips RJ, Kieffer EJ and Powley TL (2003) Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. Auton Neurosci 106: 69-83

Phillips RJ, Kieffer EJ and Powley TL (2004) Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. Anat Embryol 209: 19-30

Santer RM (1994) Survival of population of NADH-diaforase stained myenteric neurons in small intestine of aged rats. J Auton Nerv Syst 49: 115-121

Santer RM and Baker DM (1988) Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. J Auton Nerv Syst 25: 59-67

Schäfer KH, Hänsgen A and Mestres P (1999) Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. Anat Rec 256: 20-28

Stump SE (1999) Nutrição relacionada ao diagnóstico e tratamento. Manole, São Paulo, BR

Tilelli CQ, Martins AR, Larson RE and Garcia-Cairasco N (2003) Immunohistochemical localization of myosin Va in the adult rat brain. Neuroscience 121: 573-586

Wade PR and Cowen T (2004) Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. Neurogastroenterol Motil 16: 19-23

Wade RW (2002) Aging and neural control of the GI tract I. Age-related changes in the enteric nervous system. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283: G489-G495

Zanoni JN, Freitas P, Pereira RV, Santos Pereira MA and Miranda-Neto MH (2005) Effects of supplementation with ascorbic acid for a period of 120 days on the myosin-V and NADPHd positive myenteric neurons of the ileum of rats. Anat Histol Embryol 34: 149-153

Table 1. Area of the neuronal cell body (μm^2) in the antimesenteric and intermediate regions of the ileum of animals aged 3 and 12 months (n=5). Means \pm standard deviation.

Region	Animals	
	3 months	12 months
Antimesenteric	$262.75 \pm 27.59\text{a}$ ^(1,2)	$316.42 \pm 44.97\text{a}$
Intermediate	$243.06 \pm 31.40\text{a}$ ^(1,2)	$288.10 \pm 39.66\text{a}$
Total mean	$252.90 \pm 24.94\text{a}$ ⁽²⁾	$302.26 \pm 39.55\text{b}$

⁽¹⁾ Means followed by the same letter (vertical), do not statistically differ (test t of Student, p> 5%)

⁽²⁾ Means followed by the same letter (horizontal), do not statistically differ (test t of Student, p> 5%)

Figure 2.

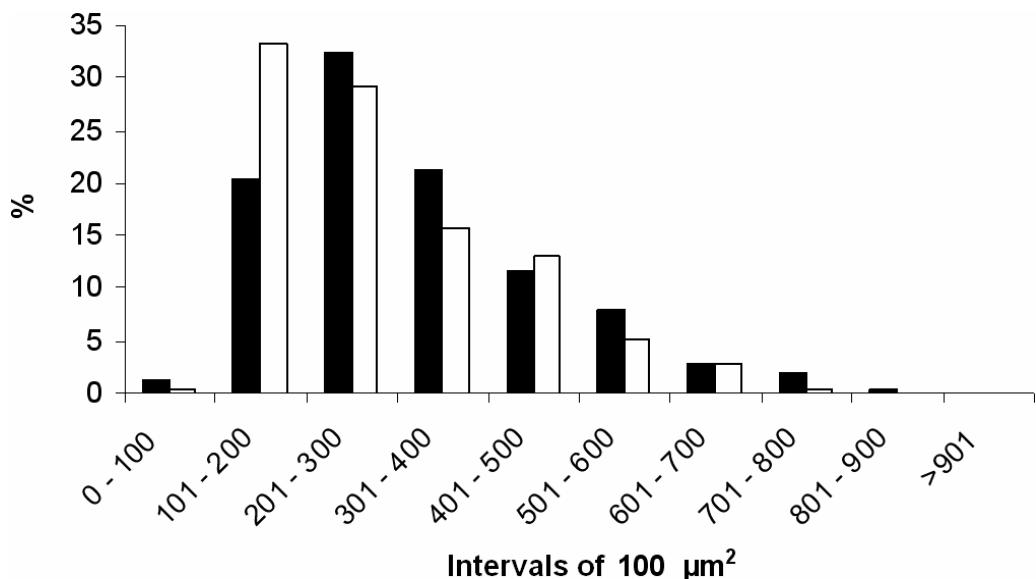


Figure 3. Distribution by size of myosin-V immunoreactive myenteric neurons in the ileum of the animals aged 12 months, classified in intervals of 100 μm^2 . Antimesenteric (■) and intermediate (□).

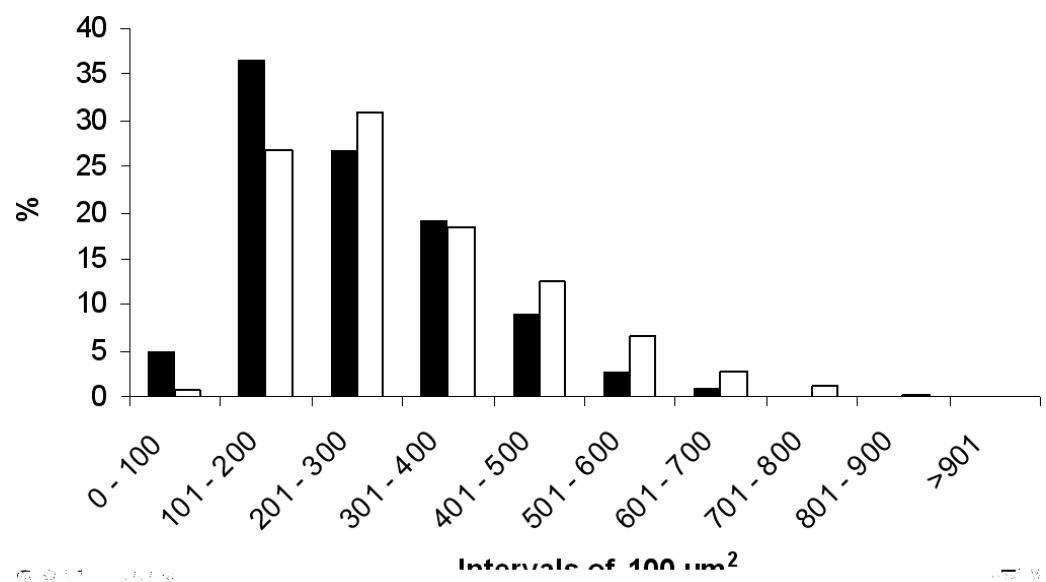


Figure 4. Distribution by size of myosin-V immunoreactive myenteric neurons, classified in intervals of $100 \mu\text{m}^2$. Animals aged 3 months (■) and 12 months (□).

**Efeitos da ração hipoprotéica sobre os neurônios mioentéricos miosina-V
imunoreativos e parede do colo proximal de ratos em envelhecimento**

João Paulo Ferreira Schoffen*, Angélica Soares, Priscila de Freitas, Nilza Cristina Buttow,

Maria Raquel Marçal Natali

*Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Laboratório de Neurônios Entéricos,
Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil*

* Correspondência para o autor: João Paulo Ferreira Schoffen. Tel.: +55 44 9963-1284; Fax +55 44 3261-4340. E-mail: jpschoffen@yahoo.com.br (J.P.F. Schoffen).

Número de tabelas: 02

Número de figuras: 03

Resumo

O objetivo deste trabalho foi analisar o comportamento morfoquantitativo dos neurônios do plexo mioentérico, bem como a morfometria de elementos da parede do colo proximal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) alimentados com ração normoprotéica (22%) e hipoprotéica (8%) mortos aos 360 dias de idade. Para avaliação neuronal foram utilizados preparados de membrana do colo proximal imunomarcados com anticorpo anti-miosina-V. Os neurônios foram quantificados em 80 campos microscópicos (16,98 mm²/animal) e a morfometria do corpo celular neuronal realizada em 100 neurônios/animal. Amostras do colo proximal, após pesagem e mensuração de seu comprimento, também foram submetidas à processamento histológico de rotina. Em seguida, foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina para realização de análise morfométrica das túnica mucosa e muscular externa. O número de neurônios e a morfometria do corpo celular neuronal não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Redução significativa no peso, comprimento do colo proximal e espessura da túnica mucosa foram observados nos animais alimentados com ração hipoprotéica quando comparado aos alimentados com ração normoprotéica. Concluiu-se que os componentes neuronais e não neuronais do colo proximal se ajustaram à condição nutricional imposta, garantindo a manutenção de suas funções.

Palavras-chave: ração hipoprotéica; neurônios mioentéricos; colo proximal; morfometria intestinal; miosina-V; envelhecimento

1. Introdução

O plexo mioentérico, um dos principais componentes do Sistema Nervoso Entérico, é formado por uma rede de gânglios, dispostos em fileiras regulares e interconectadas por fibras nervosas, as quais se estendem do esôfago ao canal anal. Está

localizado entre a camada circular e longitudinal da túnica muscular externa e exerce papel fundamental no controle da motilidade intestinal. Alterações no plexo mioentérico podem resultar no desenvolvimento de diversas patologias gastrointestinais, decorrente muitas vezes de desequilíbrios nutricionais.

Como a maioria das reações biomoleculares requer a participação de proteínas, é esperado que cada célula e cada tecido possam ser afetados quando sujeitos a condições de carência protéica (Deo, 1978). No entanto, a resposta celular a deficiência protéica é tempo-dependente, isto é, depende do período em que se inicia uma situação de carência nutricional, e a duração deste período (Firmansyah et al., 1989).

Estudos das alterações causadas pela restrição protéica sobre a morfologia e fisiologia do sistema nervoso justificam-se, já que este sistema é constituído por tecido de baixo índice de renovação celular e mudanças no número, forma ou funções dessas células podem levar a alterações drásticas no organismo (Deo, 1978). A utilização de ratos como modelo experimental no estudo dos neurônios do sistema nervoso entérico frente a situações de restrição protéica em diferentes fases do desenvolvimento animal, principalmente nas fases de gestação e lactação (Natali e Miranda-Neto, 1996; Miranda-Neto et al., 1999; Brandão et al., 2003) e em fase adulta (Araújo et al., 2003; Natali et al., 2003) é freqüente, sendo, porém, escassos os trabalhos com idades mais avançadas.

De acordo com Mitchell et al. (1978), as necessidades protéicas não diminuem com a idade, e o requerimento de certos aminoácidos, com o passar do tempo, pode ser ainda maior para “compensar” as alterações funcionais do organismo. Ressaltam também que a principal alteração fisiológica decorrente do processo de envelhecimento é a redução do número de células funcionantes, o que resultaria em lentidão dos processos metabólicos.

O plexo mioentérico atua sobre a parede intestinal, sendo a túnica muscular o tecido-alvo responsável pela manutenção, desenvolvimento e plasticidade deste plexo

(Saffrey e Burnstock, 1994). As variações são concomitantes à ocorrência de modificações nos órgãos por eles inervados. Esta plasticidade não se restringe aos períodos iniciais do crescimento do corpo, mas persiste no tecido nervoso completamente diferenciado, com potencial para promover aumento ou redução do volume celular neuronal a níveis desejados, dependendo de diferentes condições (Gabella, 1987). Consideramos que avaliar os neurônios mioentéricos frente a situações de restrição protéica associado ao processo de envelhecimento nos propiciará um excelente campo de investigação da plasticidade neuronal, bem como o comportamento das túnicas intestinais.

No estudo do plexo mioentérico utilizamos a técnica imunohistoquímica contra o domínio cauda medial da miosina-V. As miosinas não-convencionais são uma superfamília de motores ligados a actina responsáveis por uma rica variedade de eventos de motilidade intracelular. A imunolocalização da miosina-V tem sido utilizada em preparados totais de membrana do plexo mioentérico e submucoso de ratos (Drengk et al., 2000; Buttow et al., 2003; Zanoni et al., 2003; Buttow et al., 2004; Zanoni et al., 2005), a qual permite a identificação de toda a população neuronal do plexo mioentérico (Drengk et al., 2000).

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo analisar morfoquantitativamente os neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos e a morfometria de elementos da parede do colo proximal de ratos Wistar em processo de envelhecimento, alimentados com ração hipoprotéica.

2. Material e Métodos

2.1. Tratamento Animal

Todos os procedimentos deste estudo que envolvem o uso de animais estiveram de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação

Animal da Universidade Estadual de Maringá.

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, distribuídos em dois grupos: *Controle*: Alimentados com ração padronizada para roedores - NUVILAB-NUVITAL® (recomendada pelo National Research Council & National Health Institute - USA) com teor protéico de 22%; *Restrição protéica*: Alimentados com dieta com teor protéico de 8%, obtida a partir da adição de amido de milho à ração NUVILAB® (Natali et al., 2000), durante 150 dias, a partir do 210º dia de vida. Essa ração foi suplementada com vitaminas hidrossolúveis do Complexo B e mistura salina (American Institute of Nutrition, 1977; Natali e Miranda-Neto, 1996; Natali et al., 2000, 2003, 2005). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com iluminação de claro e escuro de 12 horas e temperatura de 22 ± 2 °C. A oferta de ração e água foi *ad libitum*.

O peso corporal dos animais foi verificado mensalmente e o consumo da ração controlado durante uma semana/mês. Este controle consistia em oferecer 100 gramas diárias de ração para cada animal e pesagem das sobras, obtendo desta forma, o consumo diário de cada animal.

Aos 360 dias de idade, os animais foram pesados e anestesiados intraperitonealmente com Tiopental sódico (Thionembutal®) (40mg/kg do peso corporal), seguido de coleta de sangue por punção cardíaca para a dosagem de proteínas totais (Método do Biureto - LABTEST®), albumina (Verde de Bromocresol - LABTEST®) e globulinas. Após realização de laparotomia e perfusão com solução salina e fixadora, o colo proximal (caracterizado pelo término da ampola íleo-ceco-cólica até o desaparecimento de pregas oblíquas da mucosa) foi coletado, mensurado e pesado. Parte das amostras foram destinadas a elaboração de preparados de membrana e parte para processamento histológico de rotina.

2.2. Imunohistoquímica para o plexo mioentérico

O anticorpo escolhido, anti-miosina-V, recentemente descrito para a imunomarcação de neurônios do sistema nervoso entérico (Drengk et al., 2000) é específico e tem a vantagem de marcar exclusivamente neurônios (sensorial, motor ou interneurônio) e seus prolongamentos.

Os animais foram perfundidos com solução salina (1 ml/g de peso corporal) seguida por solução fixadora contendo 10 mM de periodato de sódio, 75 mM de lisina, 1% de paraformaldeído em 37 mM de tampão fosfato, pH 7,4). Imediatamente após a perfusão, cada colo proximal foi removido e a solução de fixação foi suavemente injetada dentro do lúmen, distendendo a túnica muscular. Depois de aplicar ligaduras para manter a distensão, as amostras foram pós-fixadas na mesma solução por aproximadamente 1 h, desidratadas em etanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), clareadas em xilol, reidratadas em etanol (100%, 95%, 90% e 80%) e armazenadas em etanol 70%. Os fragmentos do colo foram abertos ao longo da borda mesocólica e dissecados sob estereomicroscópio com trans-iluminação através da remoção da túnica mucosa e túnica submucosa, obtendo-se preparados totais da túnica muscular contendo o plexo mioentérico. Os tecidos foram lavados quatro vezes em PBS (0,1 M, pH 7,4) e bloqueado por 1h em PBS com 2% de BSA, 2% de soro de cabra e 0,5% de Triton X-100 em temperatura ambiente. A imunomarcação ocorreu com a incubação dos tecidos em 0,89 µg/ml de anticorpo purificado por afinidade específica para o domínio cauda medial da miosina-V (Espreafico et al., 1992; Buttow et al., 2003), diluído em PBS com 2% de BSA, 2% de soro de cabra e 0,1% de Triton X-100 em temperatura ambiente e sob agitação (48 h). Após a incubação, os fragmentos foram lavados duas vezes em PBS com 0,1% de Triton X-100 e duas vezes em PBS com 0,05% de Tween 20. Em seguida, os tecidos foram incubados com anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 24 h em temperatura ambiente sob agitação e lavados quatro vezes durante 15 minutos em PBS com 0,05% de Tween 20. A imunoreação foi revelada com 0,75 mg/ml de Diaminobenzidina em

PBS e 0,03% de H₂O₂ por 10 minutos. As amostras foram montadas em meio com gel contendo 50% de glicerol, 0,07 g/ml de gelatina em PBS e 2 µl/ml de fenol.

2.2. Análise quantitativa e morfométrica neuronal

A quantificação dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos foi realizada em 80 campos microscópicos aleatórios de cada animal, considerando as regiões intermediária e antimesocólica (Miranda-Neto et al., 2001), com auxílio do microscópio de luz (Olympus BX41) e objetiva de 40X. Os meios neurônios observados foram contados em campos alternados. A área de cada campo microscópico foi de 0,2123 mm², perfazendo uma área total de 16,98 mm². Os resultados foram expressos em cm².

Na análise morfométrica o corpo celular de 800 células miosina-V imunoreativas do colo proximal, 400 células por grupo, foram aleatoriamente mensuradas nos preparados de membrana com auxílio de um sistema de análise de imagem (Image-Pro Plus® 4.5 - Media Cibernetics). Os neurônios foram classificados quanto ao tamanho em intervalos de classe de 100 µm².

2.4. Procedimento histológico e análise morfométrica da parede intestinal

Após serem lavadas em solução salina, amostras do colo proximal dos animais de cada grupo foram fixadas em formol a 10% tamponado (pH 7,3), desidratadas em série ascendente de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, para a obtenção de cortes histológicos de 7µm de espessura, os quais foram corados pelo método de hematoxilina-eosina (H.E.).

Os cortes foram utilizados na avaliação morfométrica da túnica mucosa (desde o ápice da cripta até a muscular da mucosa) e túnica muscular externa (40 medidas por

animal), através do sistema de análise de imagem (Image-Pro Plus® 4.5 - Media Cibernetics), com os resultados expressos em μm .

2.5. Análise estatística

Os dados quantitativos obtidos foram analisados pelo teste “t” de Student, com nível de significância de 5%. A análise estatística foi conduzida no programa estatístico GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc.).

3. Resultados

3.1. Tratamento Animal

Independente do grupo nutricional houve manutenção do peso corporal médio dos ratos após 150 dias de experimento (Controle: $465,8 \pm 40,52$ g; Restrição protéica: $443,3 \pm 54,28$ g), apesar de redução significativa no consumo de ração dos animais do grupo com restrição protéica. Estes valores são apresentados na Tabela 1 e correspondem à média de consumo durante 7 dias em cada mês durante 5 meses, a partir de 210 dias.

Com relação aos parâmetros sanguíneos avaliados, verificamos que o nível de proteínas totais apresentou-se significativamente reduzido no grupo com restrição protéica ($6,29 \pm 0,23$ g/dl) quando comparado ao grupo controle ($7,21 \pm 0,60$ g/dl), no entanto, o nível de albumina (Controle: $3,39 \pm 0,37$ g/dl; Restrição protéica: $3,51 \pm 0,54$ g/dl) e globulinas (Controle: $3,81 \pm 0,71$ g/dl; Restrição protéica: $2,78 \pm 0,56$ g/dl) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

3.2. Quantificação e morfometria dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos

A utilização do método imunohistoquímico para a miosina-V, permitiu a visualização do plexo mioentérico formado por arranjos ganglionares de diferentes

formas, interconectados a fibras nervosas organizadas em redes nervosas regulares predominantemente retangulares em ambos os grupos (Fig. 1A). Com relação aos gânglios, estes revelaram heterogeneidade neuronal na intensidade da reação e no perfil do corpo celular, independente do grupo (Fig. 1B).

O número médio de neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos do colo proximal obtido em 80 campos microscópicos nas regiões intermediária e antimesocólica, para ambos os grupos, revelou não haver diferenças estatisticamente significantes entre eles. O número médio de neurônios bem como a densidade neuronal estão apresentadas na Tabela 2.

A análise do perfil celular neuronal em ambos os grupos revelou grande diversidade no tamanho dos corpos celulares que variaram de 51,12 a 840,43 μm^2 . Ao comparar-se a média do perfil celular entre os grupos, verificamos não haver diferença estatisticamente significante (Tabela 2).

A distribuição dos neurônios em classes arbitrárias com intervalos de 100 μm^2 nos permitiu observar que há uma maior freqüência de neurônios nas classes de 101 a 200 μm^2 e de 201 a 300 μm^2 (58,8% dos neurônios no grupo controle e 67,5% no grupo com restrição protéica) (Fig. 2).

3.3. Morfometria da parede do colo proximal

O grupo com restrição protéica apresentou diferença significativa no tamanho do colo proximal quando comparado ao grupo controle, com redução no comprimento (Controle: $8,9 \pm 0,89$ cm; Restrição protéica: $7,62 \pm 0,47$ cm) e no peso (Controle: $1,47 \pm 0,25$ g; Restrição protéica: $1,01 \pm 0,16$ g) deste segmento.

Na avaliação morfométrica das túnica intestinais, verificamos que a espessura da túnica mucosa apresentou redução significativa para o grupo com restrição

protéica (Controle: $300,00 \pm 54,40 \mu\text{m}$; Restrição protéica: $202,16 \pm 8,54 \mu\text{m}$), enquanto que a espessura da túnica muscular apesar de menor para este grupo, não apresentou diferença estatisticamente significante (Controle: $178,99 \pm 51,16 \mu\text{m}$; Restrição protéica: $120,61 \pm 10,05 \mu\text{m}$) (Fig. 3).

4. Discussão

4.1. Aspectos nutricionais

O peso corporal dos animais que foram alimentados com ração com 8% de proteínas apresentou comportamento semelhante ao grupo controle, evidenciando que o nível protéico reduzido não afetou de forma significativa este parâmetro. Consideramos que este nível foi suficiente para a manutenção do peso corporal, e que o nível de 22% poderia ser considerado um excesso, visto que estes animais estavam em processo de envelhecimento (360 dias) e consequentemente possuíam menor taxa metabólica (Stump, 1999).

Mattson et al. (2003) ressaltaram que a restrição dietética pode aumentar a longevidade e a resistência a diversas doenças relacionadas com a idade e consideraram que o excesso de alimentação por período prolongado pode levar a insultos metabólicos nas células e a incidência de desordens como cânceres, problemas cardiovasculares, diabetes do tipo 2 e déficits na imunidade.

Estudos demonstraram que em ratos jovens (21, 60, 90 dias), o nível protéico da ração é fator determinante para que haja redução significativa no peso corporal (Natali e Miranda-Neto, 1996; Sant'ana et al., 1997; Fiorini et al., 1999). No entanto em ratos em processo de envelhecimento (345 dias), o nível de 8% na ração não foi capaz de reduzir este parâmetro de maneira significativa (Natali et al., 2005).

Com relação ao consumo de ração, verificamos que os animais do grupo com restrição protéica consumiram significativamente menor quantidade de ração quando

comparada ao grupo controle, sendo mantida esta condição durante todo o experimento. A menor ingesta, entretanto não foi suficiente para provocar queda do peso corporal destes animais, sugerindo que estes apresentaram melhor aproveitamento dos nutrientes, já que o menor consumo e a redução no nível protéico levaram-os às mesmas condições do grupo controle.

O conteúdo de fibras brutas na ração também é um fator que poderia ser considerado. No grupo controle este nível foi de 4,81% e no grupo com restrição protéica foi de 1,59%, o que levaria a um trânsito intestinal mais lento promovendo um aumento na absorção de nutrientes e consequente garantia de manutenção do peso corporal.

As alterações no nível das proteínas plasmáticas constituem um dos aspectos bioquímicos mais importantes quando se utiliza modelos com variação no nível protéico presente nas rações. Neste trabalho verificamos que o nível de proteínas totais nos animais alimentados com ração hipoprotéica apresentou-se significativamente reduzido e a avaliação da albumina e globulinas não diferiu entre os grupos.

Resultados semelhantes foram observados com ratos adultos alimentados por tempo prolongado com ração hipoprotéica (8%), onde apenas o nível de proteínas totais foi significativamente reduzido (Natali et al., 2000; Sant'ana et al., 2001; Natali et al., 2005). Redução no nível de albumina plasmática foi observado em ratos alimentados com dietas aprotéicas (Campana et al., 1975; Maffei et al., 1980).

O peso e comprimento do colo proximal dos ratos do grupo com restrição protéica foi significativamente menor. Este resultado é bastante comum em experimentos com restrição protéica, sendo observado no intestino delgado (Younoszai e Ranshaw, 1973; Shrader et al., 1977; Natali et al., 2005) e no colo (Sant'ana et al., 1997; Sant'ana et al., 2001; Castelucci et al., 2002; Araújo et al., 2003) de ratos.

Aumento no tamanho intestinal com a progressão da idade é atribuído como

um efeito do envelhecimento por diversos autores (Gabella, 1989; Santer, 1994; Johnson et al., 1998; Cowen et al., 2000; Phillips e Powley, 2001; Phillips et al., 2003, 2004). Desta forma, o menor tamanho do colo proximal observado em nosso estudo poderia ser considerado como uma resposta adaptativa à condição nutricional imposta e não ao envelhecimento dos animais.

4.2. Análise quantitativa e morfométrica dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos

Dentre as diferentes técnicas existentes para a marcação de populações mioentéricas, o emprego do método de imunolocalização da proteína motora miosina-V vem se destacando atualmente na literatura científica (Drengk et al., 2000; Buttow et al., 2003; Zanoni et al., 2003; Buttow et al., 2004; Zanoni et al., 2005).

Segundo Hasson e Mooseker (1997) e Langford e Molyneaux (1998), nas células nervosas, esta proteína pode ser encontrada nos terminais pré-sinápticos, organelas envoltas por membrana e junto à membrana plasmática. Parece estar relacionada com a dinâmica das membranas (endocitose e exocitose), transporte axoplasmático e liberação de neurotransmissores, sendo, por isso, considerada um elemento útil e preciso para a marcação e investigação morfoquantitativa neuronal.

Em nosso estudo a densidade neuronal observada para o colo proximal foi de $14.922,25 \pm 2.807,60$ neurônios/cm² para o grupo controle e $17.654,00 \pm 2.715,40$ neurônios/cm² para o grupo com restrição protéica, sendo esta diferença não significativa.

Experimento conduzido em nosso laboratório (dados não publicados)
revelaram densidade neuronal de 22.733,19 neurônios/cm², no colo proximal de ratos com 210 dias. Quando comparamos este valor a densidade por nós obtida para o grupo controle (14.922,25 neurônios/cm²) com 360 dias de idade, verificamos uma redução na

estar influenciando o tamanho dos corpos celulares neuronais no colo proximal. A idade, segundo Amenta (1993), poderia afetar o número de células nervosas e também o seu volume, o que poderia justificar o aumento do volume celular verificado nos neurônios mioentéricos de ratos (Gabella, 1971; Santer e Baker, 1988; Schäfer et al., 1999; Cowen et al., 2000; Phillips et al., 2003) e humanos (Meciano-Filho et al., 1995) em processo de envelhecimento.

Nos animais do grupo com restrição protéica a média da área dos corpos celulares não apresentou redução significativa quando comparada aos animais do grupo normoalimentado. Este resultado diverge do observado por vários autores que submeteram seus animais a situações de restrição protéica e verificaram redução no perfil celular neuronal no intestino grosso (Sant'ana et al., 1997; Castelucci et al., 2002) e intestino delgado (Torrejais et al., 1995; Natali et al., 2003) de ratos.

Ao analisarmos a distribuição da população neuronal em classes arbitrárias em intervalos de $100 \mu\text{m}^2$, verificamos que apesar da variabilidade observada no tamanho dos corpos celulares ($51,12$ à $840,43 \mu\text{m}^2$), a maioria dos neurônios em ambos os grupos apresentaram uma área variando de 101 a $300 \mu\text{m}^2$. Isto indica uniformidade na distribuição neuronal entre os grupos.

Segundo Bogliolo (1981) a hipotrofia neuronal é considerada um mecanismo básico de resposta celular à situações de agressões, como por exemplo a redução de nutrientes. Desta forma, o neurônio como resposta a esta injúria, se adaptaria com redução do metabolismo e consequente redução do seu volume, no entanto, este fato não ocorreu nos neurônios do grupo com restrição protéica avaliados neste trabalho.

Nossos resultados permitem inferir que a oferta de ração hipoprotéica (8%), influenciou alguns parâmetros nutricionais, mas não

em processo de envelhecimento.

4.3. Morfometria da parede do colo proximal

A análise morfométrica realizada na parede do colo proximal revelou redução significativa na espessura da túnica mucosa e preservação na espessura da túnica muscular dos animais alimentados com 8% de proteínas.

Redução na espessura da túnica mucosa de diferentes segmentos gastrointestinais de ratos é um resultado comum em modelos de desnutrição protéica e/ou calórica (Viteri e Schneider, 1974; Rodrigues et al., 1985; Natali et al., 2000). Apesar da redução morfométrica da túnica mucosa, acreditamos que o nível de restrição protéica adotado não levou a um prejuízo funcional do colo proximal. Isto revelaria um importante mecanismo de adaptação intestinal, uma vez que o grupo alimentado com ração hipoprotéica consumiu menor quantidade de ração, apresentou o colo proximal menor, porém manteve o peso corporal ao longo dos 150 dias.

Dados da literatura sobre o efeito de dietas com restrição protéica sobre a túnica muscular (Natali et al., 2000; Brandão et al., 2003; Natali et al., 2005) revelaram redução na espessura desta camada, justificada pela não acumulação de material protéico nas fibras musculares lisas da túnica muscular externa. Este fato provavelmente não ocorreu em nosso estudo, visto que houve manutenção na espessura desta túnica entre os grupos, apesar da dieta.

De acordo com Gabella (1987) o volume muscular, a inervação e a plasticidade neuronal mioentérica estão intimamente relacionados entre si. Alterações no volume do tecido muscular liso poderiam promover o aumento ou a redução do número e tamanho do corpo celular dos neurônios do plexo mioentérico.

Considerando este fato, notamos que muito pouco se discute sobre a interação entre os elementos neuronais e não neuronais que regem a plasticidade neuronal em

modelos de restrição protéica. Nossos resultados permitem inferir que a oferta de 8% de proteínas a ratos em processo de envelhecimento foi suficiente para preservar a espessura da túnica muscular do colo proximal e, em consequência, o número e o tamanho dos neurônios mioentéricos que a inervam.

Concluímos, portanto, que as túnica mucosa e muscular e a população neuronal do colo proximal de ratos com 360 dias de idade se ajustaram à oferta de ração hipoprotéica durante 150 dias, garantindo a manutenção de suas funções.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Dr^a. Enilza Maria Espreafico (USP – Ribeirão Preto, Brasil) pelo fornecimento do anticorpo anti-miosina-V, a Maria Euride do Carmo Cancino, Maria dos Anjos Moreira Fortunato, Valdir Trombelli e José Antônio de Souza, pelo excelente suporte técnico. Este trabalho foi financiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Referências

- Amenta, F., 1993. Aging of the autonomic nervous system. Library of Congress, United States, 354 pp.
- American Institute of Nutrition, 1977. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr.* 107, 1340-1348.
- Araújo, E.J.A., Sant'ana, D.M.G., Molinari, S.L., Miranda-Neto, M.H., 2003. Effect of protein and vitamin B deficiency on the morphoquantitative aspects of the myenteric plexus of the descending colon of adults rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 61, 226-233.
- Bogliolo, L., 1981. Patologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1236 pp.
- Brandão, M.C.S., De Angelis, R.C., De Souza, R.R., Froes, 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 wealing rats. *Nutr. Res.* 75, 7-15.
- Buttow, N.C., Santin, M.S., Macedo, L.C., Teixeira, A.C.N., Novakowski, G.C., Armelin, T.R.B., Assmann, K., 2004. Study of the myenteric and submucous plexuses after BAC treatment in the intestine of rats. *Biocell* 28, 135-142.
- Buttow, N.C., Zucoloto, S., Espreafico, E.M., Gama, P., Alvares, E.P., 2003. Substance P enhances neuronal area and epithelial cell proliferation after colon denervation in rats. *Dig. Dis. Sci.* 48, 2069-2076.
- Campana, A.O., Burini, C.R., Outa, A.Y., Camargo, L.V., 1975. Experimental protein deficiency in adult rats. *Rev. Bras. Pesqui. Méd. Biol.* 8, 221-226.
- Castelucci, P., Souza, R.R.De., Angelis, R.C., Furness, J.B., Liberti, E.A., 2002. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative study. *Cell Tissue Res.* 310, 1-7.
- Cowen, T., Johnson, R.J.R., Soubeyre, V., Santer, R.M., 2000. Restricted diet recues rat enteric motor neurons from age related cell death. *Gut* 47, 653-660.

- Deo, M.G., 1978. Cell biology of protein-calorie malnutrition. *World. Rev. Nutr. Diet.* 32, 49-95.
- Drengk, A.C., Kajiwara, J.K., Garcia, S.B., Carmo, V.S., Zucoloto, S., Larson, R.E., Espreafico, E.M., 2000. Immunolocalisation of myosin-V in the rat enteric nervous system. *J. Aut. Nerv. Syst.* 78, 109-112.
- Espreafico, E.M., Cheney, R.E., Matteoli, M., Nascimento, A.A.C., De Camilli, P., Larson, R.E., Mooseker, M.S., 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell. Biol.* 119, 1541-1557.
- Fiorini, A., Molinari, S.L., Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., 1999. Quantitative morphological analysis of the myenteric neurons of the ileum in rats under experimental desnutrition. *Acta Scientiarum* 21, 409-413.
- Firmansyah, A., Sunoto, S., 1989. Effect of malnutrition during different periods on the small intestine of the rat. *Jpn. J. Exp. Med.* 59, 1-7.
- Furlan, M.M.D.P., Molinari, S.L. Miranda-Neto, M.H., 2002. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 60, 576-581.
- Gabella, G., 1971. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J. Anat.* 109, 81-94.
- Gabella, G., 1987. Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In: Johnson, L.R. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 2nd edition. Raven Press, New York, pp. 335-381.
- Gabella, G., 1989. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. *Gastroenterology* 96, 1487-1493.
- Hasson, T., Mooseker, M.S., 1997. The growing family of myosin motors and their role in

- neurons and sensory cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 615-623.
- Johnson, R.J.R., Schemann, M., Santer, R.M., Cowen, T., 1998. The effects of age on the overall population and on subpopulations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J. Anat.* 192, 479-488.
- Langford, G.M., Molyneaux, B.J., 1998. Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. *Brain Res. Rev.* 28, 1-8.
- Maffei, H.V.L., Rodrigues, M.A.M., Camargo, J.L.V., Campana, A.O., 1980. Intraepithelial lymphocytes in the jejunal mucosa of malnourished rats. *Gut* 21, 32-36.
- Mattson, M.P., Duan, W., Guo, Z., 2003. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease cellular and molecular mechanisms. *J. Neurochem.* 84, 417-431.
- Meciano-Filho, J., Carvalho, V.C., De Souza, R.R., 1995. Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: a preliminary investigation. *Gerontology* 41, 18-21.
- Miranda-Neto, M.H., Molinari, S.L., Stabille, S.R., Sant'ana, D.M.G., Natali, M.R.M., 1999. Morphologic and quantitative study of the myenteric neurons of the jejunum of malnourished rats (*Rattus norvegicus*). *Arq. Neuropsiquiatr.* 57, 387-391.
- Miranda-Neto, M.H.; Molinari, S.L.; Natali, M.R.M; Sant'ana, D.M.G., 2001. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 59, 54-59.
- Mitchell, S.H., Rynbergen, H.J., Anderson, L., Dibble, M.V., 1978. Nutrição. 16^a edição. Interamericana, Rio de Janeiro, 1246 pp.
- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., 1996. Effect of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of the duodenum of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 54, 273-279.

- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., Orsi, A.M., 2000. Effect of hypoproteic diet supply on adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Acta Scientiarum* 22, 567-571.
- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., Orsi, A.M., 2003. Morfometry and quantification of the myenteric neurons of the duodenum of adult rats fed with hypoproteic chow. *Int. J. Morphol.* 21, 273-277.
- Natali, M.R.M., Molinari, S.L., Valentini, L.C., Miranda-Neto, M.H., 2005. Morphoquantitative evaluation of the duodenal myenteric neuronal population in rats fed with hypoproteic ration. *Biocell* 29, 39-46.
- Phillips, R.J., Kieffer E.J., Powley T.L., 2003. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Auton. Neurosci.* 106, 69-83.
- Phillips, R.J., Kieffer E.J., Powley T.L., 2004. Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. *Anat. Embryol.* 209, 19-30.
- Phillips, R.J., Powley T.L., 2001. As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J. Comp. Neurol.* 434, 358-377.
- Rodrigues, M.A.M., De Camargo, J.L.V., Coelho, K.I.R., Montenegro, M.R.G., Angeleli, A.Y.O., Burini, R.C., 1985. Morphometric study of the small intestinal mucosa in young, adult, and old rats submitted to protein deficiency and rehabilitation. *Gut* 26, 816-821.
- Saffrey, M.J., Burnstock, G., 1994. Growth factors and the development and plasticity of enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 49, 183-196.
- Sant'ana, D.M.G., Miranda-Neto, M.H., Souza, R.R., Molinari, S.L., 1997. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of subjected to proteic desnutrition. *Arq. Neuropsiquiatr.* 55, 687-695.
- Sant'ana, D.M.G., Molinari, S.L., Miranda-Neto, M.H., 2001. Effects of protein and vitamin B deficiency on blood parameters and myenteric neurons of the colon of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 59, 493-498.

- Santer, R.M., 1994. Survival of population of NADH-diaforase stained myenteric neurons in small intestine of aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 49, 115-121.
- Santer, R.M., Baker, D.M., 1988. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 25, 59-67.
- Schäfer, K.H., Hänsgen, A., Mestres, P., 1999. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *Anat. Rec.* 256, 20-28.
- Shrader, R.E., Ferlatte, M.I., Zeman, F.J., 1977. Early postnatal development of the intestine in progeny of protein-deprived rats. *Biol. Neonate* 31, 181- 198.
- Stump, S.E., 1999. Nutrição relacionada ao diagnóstico e tratamento. 4^a edição. Manole, São Paulo, 760 pp.
- Torrejais, M.M., Natali, M.R.M., Conegero, C.I., Miranda-Neto, M.H., 1995. Effect of proteic malnutrition after breast-feeding on the morphology of the intestinal wall and myenteric neurons of the ileum of rats. *Rev. Unimar* 17, 315-27.
- Viteri, F.E., Schneider, M.D., 1974. Gastrointestinal alterations in protein-calorie malnutrition. *Symp. Gastrointest. Physiol.* 58, 1487-1505.
- Younoszai, M.K., Ranshaw, J., 1973. Gastrointestinal growth in the fetus and suckling rat pups: Effects of maternal dietary protein. *J. Nutr.* 103, 454- 461.
- Zanoni, J.N., Buttow, N.C., Bazotte, N.C., Miranda-Neto, M.H., 2003. Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. *Auton. Neurosci.* 104, 32-38.
- Zanoni, J.N., Freitas, P., Pereira, R.V., Santos Pereira, M.A. Miranda-Neto, M.H., 2005. Effects of supplementation with ascorbic acid for a period of 120 days on the myosin-V and NADPHd positive myenteric neurons of the ileum of rats. *Anat. Histol. Embryol.* 34, 149-153.

Tabela 1

Consumo de ração (gramas) dos animais do grupo controle e grupo com restrição protéica. Média ± desvio padrão

Grupo	Mês					Média
	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	
Controle (n=5)	32,18 ^a ⁽¹⁾	29,30a	30,40a	26,54a	29,08a	29,50 ± 2,06a
Restrição protéica (n=4)	20,88b	19,93b	20,23b	19,85b	20,68b	20,31 ± 0,45b

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente (teste t de Student, p> de 5%).

Tabela 2

Número de neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos, densidade neuronal (neurônios/cm²) e área do perfil celular neuronal (μm^2) dos animais do grupo controle e grupo com restrição protéica.

Média ± desvio padrão

Grupo	Número	Densidade	Perfil celular
Controle (n=5)	2.533,87 ± 476,70a ⁽¹⁾	14.922,25 ± 2.807,60a	286,63 ± 54,66a
Restrição proteica (n=4)	2.997,75 ± 461a	17.654,00 ± 2.715,40a	247,57 ± 20,04a

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente (teste t de Student, p> de 5%).

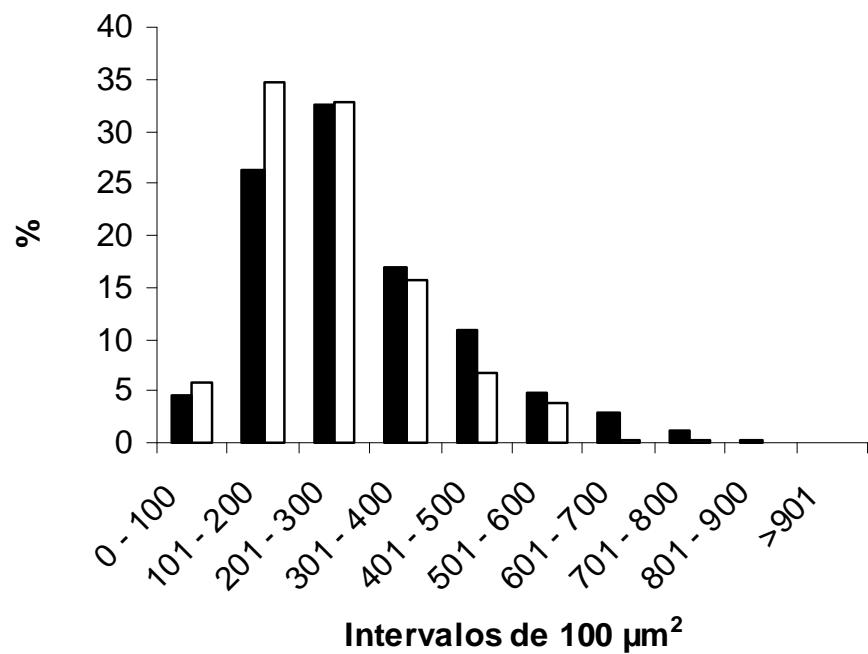


Fig. 2. Distribuição por tamanho dos neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos, classificados em intervalos de $100 \mu\text{m}^2$. Grupo: controle (■) e com restrição protéica (□).

Effects of a hypoproteic diet on myosin-V immunoreactive myenteric neurons
and on the proximal colon wall of aging rats

João Paulo Ferreira Schoffen*, Angélica Soares, Priscila de Freitas, Nilza Cristina Buttow,
Maria Raquel Marçal Natali

*Department of Morphophysiological Sciences, Enteric Neurons Laboratory, State University
of Maringá, Avenida Colombo 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brazil*

* Corresponding author: João Paulo Ferreira Schoffen. Tel.: +55 44 9963-1284; Fax +55 44
3261-4340. E-mail: jpschoffen@yahoo.com.br (J.P.F. Schoffen).

Number of tables: 02

Number of figures: 03

Abstract

The objective of this work was to analyze the morphoquantitative behavior of neurons of the myenteric plexus as well as the morphometry of elements of the proximal colon wall of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) fed a normoproteic (22%) and a hypoproteic diet (8%), sacrificed at 360 days of age. To perform the neuronal evaluation, we used whole- mount preparations of the proximal colon immunostained with the antibody anti-myosin-V. The neurons were quantified in 80 microscopic fields (16.98 mm²/animal). The neuronal cell body morphometry was performed in 100 neurons/animal. Samples of the proximal colon were weighed and measured, and then submitted to routine histological processing. They were later stained by the hematoxylin-eosin method in order to perform the morphometric analysis of the mucosa and external muscular layer. The number of neurons and the neuronal cell body morphometry did not present significative changes between the studied groups. A significant reduction in the weight and length of the proximal colon and in mucosa layer thickness was observed in the animals fed the hypoproteic diet. Our conclusion was that the neuronal and non-neuronal components of the proximal colon adapted themselves to the imposed nutritional condition, guaranteeing the maintenance of their functions.

Keywords: hypoproteic diet; myenteric neurons; proximal colon; intestinal morphometry; myosin-V; aging

1. Introduction

The myenteric plexus, one of the main components of the Enteric Nervous System, is formed by a network of ganglia, arranged in regular rows and interweaved by nerve fibers, which extends from the esophagus to the anal channel. It is located between the

circular and longitudinal layer of the external muscular layer and plays a major role in the intestinal motility control. Changes in the myenteric plexus may result in the development of several gastrointestinal pathologies, due to nutritional unbalance.

As most of the biomolecular reactions require the participation of proteins, it is expected that each cell and each tissue may be affected when submitted to proteic deprivation conditions (Deo, 1978). However, the cellular response to protein deficiency is time-dependent, i.e., it depends on the period that the nutritional deprivation situation begins, and on the duration of this period (Firmansyah et al., 1989).

Studies of the alterations caused by the protein restriction on the morphology and physiology of the nervous system are justified, since this system is constituted by tissues with a low rate of cellular renewal, thus, changes in the number, shapes or functions of these cells may lead to drastic alterations in the organism (Deo, 1978). The use of rats as experimental models in the study of neurons of the enteric nervous system submitted to situations of proteic restriction in different phases of the animal development, mainly in the gestation and lactation phases (Natali and Miranda-Neto, 1996; Miranda-Neto et al., 1999; Brandão et al., 2003) and in adult phase (Araújo et al., 2003; Natali et al., 2003), is rather frequent; however, studies at a more advanced age are scarce.

According to Mitchell et al. (1978), the proteic needs does not decrease with age, and the necessity of some amino acids, due to age, may even increase "to compensate" the organism functional alterations. They also point out that the main physiologic alteration due to the aging process is the reduction on the number of working cells, which would result in the slowness of metabolic processes.

The myenteric plexus acts on the intestinal wall, being the muscular layer the target-tissue responsible for its maintenance, development and plasticity (Saffrey and Burnstock, 1994). The variations that take place in the peripheral neurons are concomitant to

the variations in the organs innervated by them. This plasticity is not limited to the initial periods of body growth; it remains in the completely differentiated nervous tissue, with a potentiality to promote an increase or a reduction of the neuronal cell volume at desired levels, depending on different conditions (Gabella, 1987). We consider that assessing the myenteric neurons when faced with situations of proteic restriction associated to the aging process will provide us an excellent investigative field on the neuronal plasticity as well as the behavior of intestinal layers.

We employed the immunostaining technique myosin-V to study the myenteric plexus. The unconventional myosins are a superfamily of actin-based motors responsible for a rich array of intracellular motility events. The immunolocalisation of myosin-V has been used in whole-mount preparations of myenteric and submucous plexus of rats (Drengk et al., 2000; Buttow et al., 2003; Zanoni et al., 2003; Buttow et al., 2004; Zanoni et al., 2005), which allow us to identify the whole neuronal population of the myenteric plexus (Drengk et al., 2000).

Therefore, the present study aims at analyzing morphoquantitatively the myosin-V immunoreactive myenteric neurons and the morphometry of elements of the proximal colon wall of aging Wistar rats, fed a hypoproteic diet.

2. Material and methods

2.1. Animal treatment

All the procedures of this study regarding the use of animals were in agreement with the ethical principles adopted by the Brazilian School of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the State University of Maringá.

We used male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), distributed in two groups:

Control: fed a standardized diet for rodents - NUVILAB-NUVITAL® (recommended by the National Research Council & National Health Institute - USA) with proteic value of 22%;

Proteic Restriction: fed a diet with a proteic value of 8%, obtained with the addition of corn starch to the NUVILAB® chow (Natali et al., 2000), for 150 days, starting at the 210th day of life. This diet was supplemented with Complex B water-soluble vitamins and a saline mixture (American Institute of Nutrition, 1977; Natali and Miranda-Neto, 1996; Natali et al., 2000, 2003, 2005). The animals were kept in individual cages with a photo-period of 12 hours and temperature of 22 ± 2 °C. Water and chow were offered *ad libitum*.

The animals' body weight was verified monthly and the food intake was controlled during a week/month. This control consisted in daily offering 100 grams of chow to each animal and weighing the leftovers, thus, obtaining the daily consumption of each animal.

At the 360 days of age, the animals were weighed and anesthetized intraperitoneally with sodic Tiopental (Thionembutal®) (40mg/kg of body weight), followed by blood collection by heart puncture to assess the total of proteins (Method of Biureto - LABTEST®), albumin (Green of Bromocresol - LABTEST®) and globulins. After performing a laparotomy and perfusion with a saline and fixing solution, the proximal colon (characterized by the end of the ileum-cecum-colic vial to the oblique mucosa folds disappearance) was collected, measured and weighed. Part of the samples was used to prepare whole-mount preparations and part to routine histological processing.

2.2. Immunohistochemistry of the myenteric plexus

The antibody we chose, anti-myosin-V, recently described for the immunostaining of neurons from the enteric nervous system (Drengk et al., 2000), is specific and it has the advantage of staining only neurons (sensorial, motor or interneuron) and their

processes.

The animals were perfused with saline solution (1 ml/g body weight) followed fixative solution containing 10 mM sodium periodate, 75 mM lysine, 1% paraformaldehyde in 37 mM phosphate buffer, pH 7.4. Immediately after perfusion, each proximal colon was removed and the fixative solution was gently injected into the lumen, distending the muscular layer. After applying ligatures to maintain the distension, the samples were postfixed in the same solution as above for 1 hr, dehydrated in ethanol (50%, 70%, 80%, 90%, 95% and 100%), cleared in xylol, rehydrated in ethanol (100%, 95%, 90%, and 80%) and stored in ethanol 70%. The colon fragments were open the mesocolic border and dissected under a stereomicroscope with trans-illumination through the removal of the mucosa and submucosa layer, thus, obtaining whole-mount muscular layer preparations containing the myenteric plexus. The tissues were washed four times in PBS (0.1M, pH 7.4) and blocked for 1 hr in PBS with 2% BSA, 2% goat serum and 0.5% Triton X-100 at room temperature. Immunostaining proceeded with the incubation of tissues in 0.89 µg/ml of affinity-purified antibody specific to the myosin-V medial tail domain (Espreafico et al., 1992; Buttow et al., 2003) diluted in the PBS with 2% BSA, 2% goat serum and 0.1% Triton X-100 at room temperature and under shaking (48 h). After incubation, the fragments were washed twice in PBS with 0.1% Triton X-100 and twice in PBS with 0.05% Tween 20. Soon after, the tissues were incubated with 10 µg/ml secondary antibody conjugated with peroxidase for 24 hours at room temperature under agitation and washed four times during 15 min in PBS with 0.05% Tween 20. The immunoreaction was developed with 0.75 mg/ml Diaminebenzidine in PBS and 0.03% H₂O₂ for 10 min. Samples were placed in a gel mounting medium containing 50% glycerol, 0.07 g/ml gelatin in PBS and 2 µl/ml phenol.

2.3. Quantitative analysis and neuronal morphometry

The quantification of myosin-V immunoreactive myenteric neurons was performed in 80 randomly microscopic fields of each animal, from the intermediate and antimesocolic regions (Miranda-Neto et al., 2001), with aid of the light microscope (Olympus BX41) and 40X objective. The half-neurons found were counted in alternate fields. The area of each microscopic field was 0.2123 mm^2 , with a total area of 16.98 mm^2 . The results were shown in cm^2 .

We randomly measured the cellular body of 800 immunoreactive myosin-V cell of the proximal colon (400 cells per group) from the whole-mount preparations with aid of a image analysis system (Image-Pro Plus[®] 4.5 - Media Cibernetics). The neurons were classified for their size in class intervals of $100 \mu\text{m}^2$.

2.4. Intestinal wall histological procedure and morphometric analysis

After washed in saline solution, the proximal colon samples of the animals from each group were fixed in buffered formol at 10% (pH 7.3), dehydrated in ascending series of alcohols, diaphanized in xylol and mounted in paraffin, to obtain the $7\mu\text{m}$ -thick histological sections, which were stained by the hematoxylin-eosin method (H.E.).

The sections were used in the morphometric assessment of the mucosa layer (from the crypt apex to the mucosa muscle) and external muscular layer (40 measurements per animal), through the system of image analysis (Image-Pro Plus[®] 4.5 - Media Cibernetics), with the results expressed in μm .

2.5. Statistical analysis

The obtained quantitative data were analyzed by the test "t" of Student, with a significance level of 5%. The statistical analysis was accomplished in the statistical program GraphPad Prism[®] (GraphPad Software, Inc.).

3. Results

3.1. Animal treatment

Regardless the nutritional group, there was maintenance of the rats' mean body weight after 150 days of experiment (control: 465.8 ± 40.52 g; proteic restriction: 443.3 ± 54.28 g), despite the significant reduction in the food intake by the animals from the proteic restriction group. These values are shown in Table 1 and they correspond to the average consumption for 7 days in every month for 5 months, starting at 210 days.

As for the blood parameters appraised, we observed that the total proteins level was significantly reduced in the proteic restriction group (6.29 ± 0.23 g/dl) when compared to the control (7.21 ± 0.60 g/dl). However, the albumin level (control: 3.39 ± 0.37 g/dl; proteic restriction: 3.51 ± 0.54 g/dl) and globulin (control: 3.81 ± 0.71 g/dl; proteic restriction: 2.78 ± 0.56 g/dl) did not present statistically significant differences between both groups.

3.2. Quantification and morphometry of myosin-V immunoreactive myenteric neurons

The use of the myosin-V immunohistochemical method allowed the visualization of myenteric plexus, formed by ganglionary arrangements in different shapes, interconnected to nervous fibers organized in regular nervous networks (predominantly rectangular) in both groups (Fig. 1A). As for the ganglia, they showed a neuronal heterogeneity in the reaction intensity and in the cellular body profile, regardless of the group (Fig. 1B).

The mean number of the proximal colon myosin-V immunoreactive myenteric neurons obtained in 80 microscopic fields at the intermediate and antimesocolic regions, for both groups, showed there were no statistically significant differences between

them. The mean number of neurons as well as their neuronal density is shown in Table 2.

The neuronal cellular profile analysis in both groups revealed a great diversity in the size of the cellular bodies, ranging from 51.12 to 840.43 μm^2 . When comparing the cell profile mean between both groups, we observed no statistically significant differences (Table 2).

The neurons distribution in arbitrary class intervals of 100 μm^2 allowed us to notice there is a higher frequency of neurons in classes from 101 to 200 μm^2 and from 201 to 300 μm^2 (58.8% of neurons in the controls and 67.5% in proteic restriction group) (Fig. 2).

3.3. Proximal colon wall morphometry

The proteic restriction group presented a significant difference in the proximal colon size when compared to the control, with length reduction (control: 8.9 ± 0.89 cm; proteic restriction: 7.62 ± 0.47 cm) and weight reduction (control: 1.47 ± 0.25 g; proteic restriction: 1.01 ± 0.16 g) of this segment.

On the intestinal layers morphometric evaluation, we observed a significant reduction on the mucosa layer thickness for the proteic restriction group (control: 300.00 ± 54.40 μm , proteic restriction: 202.16 ± 8.54 μm). The muscular layer thickness, although smaller in this group, showed no statistically significant difference (control: 178.99 ± 51.16 μm ; proteic restriction: 120.61 ± 10.05 μm) (Fig. 3).

4. Discussion

4.1. Nutritional aspects

The body weight of animals fed the hypoproteic diet (8% of proteins) showed a similar behavior to the controls (22% of proteins), evidencing that the reduced proteic level did not affect this parameter in a significant way. We considered that the 8%

level was enough to maintaining their body weight, and that the 22% level could be considered excessive, since these animals were aging (360 days) and consequently had a smaller metabolic rate (Stump, 1999).

Mattson et al. (2003) pointed out that the dietary restriction can increase the longevity and the resistance to several age-related illnesses and considered that the excessive feeding for a long period may lead to metabolic insults in the cells and the incidence of disorders such as cancers, cardiovascular problems, type 2 diabetes and immunity deficits.

Studies have shown that in young rats (21, 60, 90 days), the diet proteic level is a key factor to a significant reduction in their body weight (Natali and Miranda-Neto, 1996; Sant'ana et al., 1997; Fiorini et al., 1999). However, the 8% level in the diet was not able to reduce this parameter in a significative way in aging rats (345 days) (Natali et al., 2005).

As for the food intake, we verified that the animals from proteic restriction group consumed significantly smaller amounts of chow when compared to the controls, throughout the whole experiment. The smallest ingesta, however, was not enough to cause a reduction in their body weight, suggesting they used the nutrients in a better way, since the smaller consumption and the proteic level reduction led them to the same conditions of the controls.

The gross fibers content in the chow is also a factor to be considered (4.81% for the control and 1.59% for the proteic restriction group). This could lead to a slower intestinal traffic causing an increase in the nutrients absorption and, consequently, guaranteeing the body weight maintenance.

The changes in the plasmatic protein level are one of the most important biochemical aspects when we use models with variation in the proteic level present in diets. In our work we observed that the level of total proteins in the animals fed the hypoproteic diet

was significantly reduced, but there were no differences in the albumin and globulins between both groups.

Similar results were obtained with adult rats fed hypoproteic diets (8%) for long periods, where only the total proteins level was significantly reduced (Natali et al., 2000; Sant'ana et al., 2001; Natali et al., 2005). A reduction in the albumin plasmatic level was observed in rats fed non-proteic diets (Campana et al., 1975; Maffei et al., 1980).

The weight and length of the proximal colon of rats from the proteic restriction group was significantly smaller. This result is quite common in experiments with proteic restriction, being observed in the small intestine (Younoszai and Ranshaw, 1973; Shrader et al., 1977; Natali et al., 2005) and in the colon of rats (Sant'ana et al., 1997; Sant'ana et al., 2001; Castelucci et al., 2002; Araújo et al., 2003).

The increase in the intestinal length is considered as an effect of the aging process by several authors (Gabella, 1989; Santer, 1994; Johnson et al., 1998; Cowen et al., 2000; Phillips and Powley, 2001; Phillips et al., 2003, 2004). Therefore, the smaller size of the proximal colon found in our work may be considered as an adaptational response to the imposed nutritional condition and not to the animals' aging process.

4.2. Quantitative and morphometric analysis of myosin-V immunoreactive myenteric neurons

Among the different existing techniques for the staining myenteric populations, the use of the myosin-V motor protein immunolocalisation method is standing out now in the literature (Drengk et al., 2000; Buttow et al., 2003; Zanoni et al., 2003; Buttow et al., 2004; Zanoni et al., 2005).

According to Hasson and Mooseker (1997) and Langford and Molyneaux (1998), in the nervous cells this protein can be found in the pre-synaptic terminals, in organellas enveloped by membrane and close to the plasmatic membrane. The protein seems

to be related to the membrane dynamics (endocytoses and exocytoses), axoplasm transport and neurotransmitters release, thus, being considered a useful and precise element for the neuronal morphoquantitative demarcation and investigation.

The neuronal density observed for the proximal colon in our study was $14,922.25 \pm 2,807.60$ neurons/cm² for the control and $17,654.00 \pm 2,715.40$ neurons/cm² for the proteic restriction group, a non-significant difference.

An experiment conducted in our laboratory (unpublished data) showed a neuronal density of $22,733.19$ neurons/cm² in the proximal colon of rats at 210 days of age. When comparing this value to the density found for the controls ($14,922.25$ neurons/cm²) at 360 days of age, we observe a reduction in the neuronal population.

The value found for the controls (360 days) is similar to results obtained with animals in advanced ages. The reduction in the number of myenteric neurons is quite common in experimental models of aging (Santer and Baker, 1988; Cowen et al., 2000; A1(r)-7.232).

proximal colon of the animals from proteic restriction group. This allow us to infer that a diet with 8% of protein may be enough to maintaining the density and the normal functions of neurons at 360 days of age.

Regarding the size of neurons, the mean value of the neuronal cell body obtained for the control was $286.63 \mu\text{m}^2$ and $247.57 \mu\text{m}^2$ for the proteic restriction group. Similar values were observed in the proximal colon of rats at different ages, Buttow et al. (2003) in animals at 45 days ($263.70 \mu\text{m}^2$) and Furlan et al. (2002) at 210 days ($219.20 \mu\text{m}^2$).

We could, thus, eliminate the possibility that the animal at 360 days of age influenced the size of the neuronal cell body in the proximal colon. According to Amenta (1993), the age could affect the number of nerve cells and also their volume, which could justify the increase of the cellular volume observed in the myenteric neurons of rats (Gabella, 1971; Santer and Baker, 1988; Schäfer et al., 1999; Cowen et al., 2000; Phillips et al., 2003) and of human beings (Meciano-Filho et al., 1995) in the aging process.

The mean area of cell bodies in the animals of the restriction proteic group did not present a significant reduction when compared to the normal fed animals. This result differs from those observed by several authors who submitted their animals to proteic restriction situations and noticed a reduction in the neuronal cell profile in the large intestine (Sant'ana et al., 1997; Castelucci et al., 2002) and small intestine of rats (Torrejais et al., 1995; Natali et al., 2003).

When analyzing the distribution of the neuronal population in arbitrary classes at $100 \mu\text{m}^2$ intervals, we noticed that despite the diversity of cell body sizes found (51.12 to $840.43 \mu\text{m}^2$), the majority of neurons in both groups had an area ranging from 101 to $300 \mu\text{m}^2$. This shows uniformity in the neuronal distribution between both groups.

According to Bogliolo (1981), the neuronal hypotrophy is considered a basic mechanism of cellular response to situations of aggression, such as the reduction of

nutrients. Therefore, as a response to this aggression, the neuron would adapt to it with a metabolism reduction with a consequent reduction of its volume. However, this did not happen to the neurons of the proteic restriction animal group.

Our results allow us to infer that the hypoproteic diet (8%) influenced some nutritional parameters, but it was not enough to cause a reduction in the cellular area. Therefore, it was appropriate both for the neuronal density and also for maintaining the cell body profile of myenteric neurons of the proximal colon of rats in the aging process.

4.3. Proximal colon wall morphometry

The morphometric analysis of the proximal colon wall showed a significant reduction in the thickness of the mucous layer and the thickness conservation of the muscular layer of the animals fed with 8% of proteins.

The reduction in the thickness of the mucosa layer of different gastrointestinal segments of rats is a common result in models of proteic and/or caloric malnutrition (Viteri and Schneider, 1974; Rodrigues et al., 1985; Natali et al., 2000). Despite the morphometric reduction of the mucosa layer, we believe that the proteic restriction level we adopted did not lead to a proximal colon functional damage. If that was the case, it would reveal an important mechanism of intestinal adaptation, for the group fed the hypoproteic diet consumed smaller amounts of chow, had a smaller proximal colon, but maintained their body weight along the 150 days period.

Data from the literature on the effect of proteic restriction diets over the muscular layer (Natali et al., 2000; Brandão et al., 2003; Natali et al., 2005) revealed a reduction in the thickness of this layer, which may be justified by the non-accumulation of proteic material in the smooth muscular fibers of the external muscular layer. This probably did not take place in our study, since the thickness of the muscle layer was kept the same in

both groups, despite their diet.

According to Gabella (1987), the muscular volume, the myenteric neuronal innervation and its plasticity are closely related to each other. Changes in the volume of smooth muscular tissue could cause the increase or decrease of the cellular body of neurons in the myenteric plexus.

Taking this fact in account, we noticed there are very few discussions about the interaction between the neuronal and non-neuronal elements responsible for the neuronal plasticity in proteic restriction models. Our results allow us to infer that offering 8% of proteins to rats undergoing the aging process was enough to preserve the thickness of the muscular layer of the proximal colon and, as a consequence, the number and size of the myenteric neurons innervating them.

We came to the conclusion, therefore, that the mucosa layer, the muscular layer and the neuronal population of the proximal colon of rats aged 360 days adapted to the 150 days offer hipoproteic diet, guaranteeing the maintenance of their functions.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Enilza Maria Espreafico (USP – Ribeirão Preto, Brazil) for supplying the antibody anti-myosin-V, Maria Euride do Carmo Cancino, Maria dos Anjos Moreira Fortunato, Valdir Trombelli and José Antônio de Souza for their superb technical support. This work was financed by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- Amenta, F., 1993. Aging of the autonomic nervous system. Library of Congress, United States, 354 pp.
- American Institute of Nutrition, 1977. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr.* 107, 1340-1348.
- Araújo, E.J.A., Sant'ana, D.M.G., Molinari, S.L., Miranda-Neto, M.H., 2003. Effect of protein and vitamin B deficiency on the morphoquantitative aspects of the myenteric plexus of the descending colon of adults rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 61, 226-233.
- Bogliolo, L., 1981. Patologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1236 pp.
- Brandão, M.C.S., De Angelis, R.C., De Souza, R.R., Froes, 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 wealing rats. *Nutr. Res.* 75, 7-15.
- Buttow, N.C., Santin, M.S., Macedo, L.C., Teixeira, A.C.N., Novakowski, G.C., Armelin, T.R.B., Assmann, K., 2004. Study of the myenteric and submucous plexuses after BAC treatment in the intestine of rats. *Biocell* 28, 135-142.
- Buttow, N.C., Zucoloto, S., Espreafico, E.M., Gama, P., Alvares, E.P., 2003. Substance P enhances neuronal area and epithelial cell proliferation after colon denervation in rats. *Dig. Dis. Sci.* 48, 2069-2076.
- Campana, A.O., Burini, C.R., Outa, A.Y., Camargo, L.V., 1975. Experimental protein deficiency in adult rats. *Rev. Bras. Pesqui. Méd. Biol.* 8, 221-226.
- Castelucci, P., Souza, R.R.De., Angelis, R.C., Furness, J.B., Liberti, E.A., 2002. Effects of pre- and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative study. *Cell Tissue Res.* 310, 1-7.
- Cowen, T., Johnson, R.J.R., Soubeyre, V., Santer, R.M., 2000. Restricted diet recues rat enteric motor neurons from age related cell death. *Gut* 47, 653-660.

- Deo, M.G., 1978. Cell biology of protein-calorie malnutrition. *World. Rev. Nutr. Diet.* 32, 49-95.
- Drengk, A.C., Kajiwara, J.K., Garcia, S.B., Carmo, V.S., Zucoloto, S., Larson, R.E., Espreafico, E.M., 2000. Immunolocalisation of myosin-V in the rat enteric nervous system. *J. Aut. Nerv. Syst.* 78, 109-112.
- Espreafico, E.M., Cheney, R.E., Matteoli, M., Nascimento, A.A.C., De Camilli, P., Larson, R.E., Mooseker, M.S., 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell. Biol.* 119, 1541-1557.
- Fiorini, A., Molinari, S.L., Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., 1999. Quantitative morphological analysis of the myenteric neurons of the ileum in rats under experimental desnutrition. *Acta Scientiarum* 21, 409-413.
- Firmansyah, A., Sunoto, S., 1989. Effect of malnutrition during different periods on the small intestine of the rat. *Jpn. J. Exp. Med.* 59, 1-7.
- Furlan, M.M.D.P., Molinari, S.L. Miranda-Neto, M.H., 2002. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 60, 576-581.
- Gabella, G., 1971. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J. Anat.* 109, 81-94.
- Gabella, G., 1987. Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In: Johnson, L.R. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 2nd edition. Raven Press, New York, pp. 335-381.
- Gabella, G., 1989. Fall in the number of myenteric neurons in aging guinea pigs. *Gastroenterology* 96, 1487-1493.
- Hasson, T., Mooseker, M.S., 1997. The growing family of myosin motors and their role in

- neurons and sensory cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 615-623.
- Johnson, R.J.R., Schemann, M., Santer, R.M., Cowen, T., 1998. The effects of age on the overall population and on subpopulations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J. Anat.* 192, 479-488.
- Langford, G.M., Molyneaux, B.J., 1998. Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. *Brain Res. Rev.* 28, 1-8.
- Maffei, H.V.L., Rodrigues, M.A.M., Camargo, J.L.V., Campana, A.O., 1980. Intraepithelial lymphocytes in the jejunal mucosa of malnourished rats. *Gut* 21, 32-36.
- Mattson, M.P., Duan, W., Guo, Z., 2003. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease cellular and molecular mechanisms. *J. Neurochem.* 84, 417-431.
- Meciano-Filho, J., Carvalho, V.C., De Souza, R.R., 1995. Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: a preliminary investigation. *Gerontology* 41, 18-21.
- Miranda-Neto, M.H., Molinari, S.L., Stabille, S.R., Sant'ana, D.M.G., Natali, M.R.M., 1999. Morphologic and quantitative study of the myenteric neurons of the jejunum of malnourished rats (*Rattus norvegicus*). *Arq. Neuropsiquiatr.* 57, 387-391.
- Miranda-Neto, M.H.; Molinari, S.L.; Natali, M.R.M; Sant'ana, D.M.G., 2001. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 59, 54-59.
- Mitchell, S.H., Rynbergen, H.J., Anderson, L., Dibble, M.V., 1978. Nutrição. 16^a edição. Interamericana, Rio de Janeiro, 1246 pp.
- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., 1996. Effect of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of the duodenum of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 54, 273-279.

- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., Orsi, A.M., 2000. Effect of hypoproteic diet supply on adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Acta Scientiarum* 22, 567-571.
- Natali, M.R.M., Miranda-Neto, M.H., Orsi, A.M., 2003. Morfometry and quantification of the myenteric neurons of the duodenum of adult rats fed with hypoproteic chow. *Int. J. Morphol.* 21, 273-277.
- Natali, M.R.M., Molinari, S.L., Valentini, L.C., Miranda-Neto, M.H., 2005. Morphoquantitative evaluation of the duodenal myenteric neuronal population in rats fed with hypoproteic ration. *Biocell* 29, 39-46.
- Phillips, R.J., Kieffer E.J., Powley T.L., 2003. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Auton. Neurosci.* 106, 69-83.
- Phillips, R.J., Kieffer E.J., Powley T.L., 2004. Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. *Anat. Embryol.* 209, 19-30.
- Phillips, R.J., Powley T.L., 2001. As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J. Comp. Neurol.* 434, 358-377.
- Rodrigues, M.A.M., De Camargo, J.L.V., Coelho, K.I.R., Montenegro, M.R.G., Angeleli, A.Y.O., Burini, R.C., 1985. Morphometric study of the small intestinal mucosa in young, adult, and old rats submitted to protein deficiency and rehabilitation. *Gut* 26, 816-821.
- Saffrey, M.J., Burnstock, G., 1994. Growth factors and the development and plasticity of enteric nervous system. *J. Auton. Nerv. Syst.* 49, 183-196.
- Sant'ana, D.M.G., Miranda-Neto, M.H., Souza, R.R., Molinari, S.L., 1997. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of subjected to proteic desnutrition. *Arq. Neuropsiquiatr.* 55, 687-695.
- Sant'ana, D.M.G., Molinari, S.L., Miranda-Neto, M.H., 2001. Effects of protein and vitamin B deficiency on blood parameters and myenteric neurons of the colon of rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 59, 493-498.

- Santer, R.M., 1994. Survival of population of NADH-diaforase stained myenteric neurons in small intestine of aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 49, 115-121.
- Santer, R.M., Baker, D.M., 1988. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 25, 59-67.
- Schäfer, K.H., Hänsgen, A., Mestres, P., 1999. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *Anat. Rec.* 256, 20-28.
- Shrader, R.E., Ferlatte, M.I., Zeman, F.J., 1977. Early postnatal development of the intestine in progeny of protein-deprived rats. *Biol. Neonate* 31, 181- 198.
- Stump, S.E., 1999. Nutrição relacionada ao diagnóstico e tratamento. 4^a edição. Manole, São Paulo, 760 pp.
- Torrejais, M.M., Natali, M.R.M., Conegero, C.I., Miranda-Neto, M.H., 1995. Effect of proteic

Table 1

Food intake (grams) by animals from control and proteic restriction groups. Means \pm standard deviation

Group	Month					Mean
	1 st month	2 nd month	3 rd month	4 th month	5 th month	
Control (n=5)	32.18a ⁽¹⁾	29.30a	30.40a	26.54a	29.08a	29.50 \pm 2.06a
Proteic restriction (n=4)	20.88b	19.93b	20.23b	19.85b	20.68b	20.31 \pm 0.45b

⁽¹⁾ Means followed by the same letter, do not differ statistically (test t of Student, p> 5%).

Table 2

Number of myosin-V immunoreactive myenteric neurons, neuronal density (neurons/cm²) and neuronal cell profile area (μm^2) of animals from the control and proteic restriction groups. Means \pm standard deviation

Group	Number	Density	Cell profile
Control (n=5)	$2,533.87 \pm 476.70\text{a}^{(1)}$	$14,922.25 \pm 2,807.60\text{a}$	$286.63 \pm 54.66\text{a}$
Proteic restriction (n=4)	$2,997.75 \pm 461\text{a}$	$17,654.00 \pm 2,715.40\text{a}$	$247.57 \pm 20.04\text{a}$

⁽¹⁾ Means followed by the same letter, do not differ statistically (test t of Student, p> 5%).

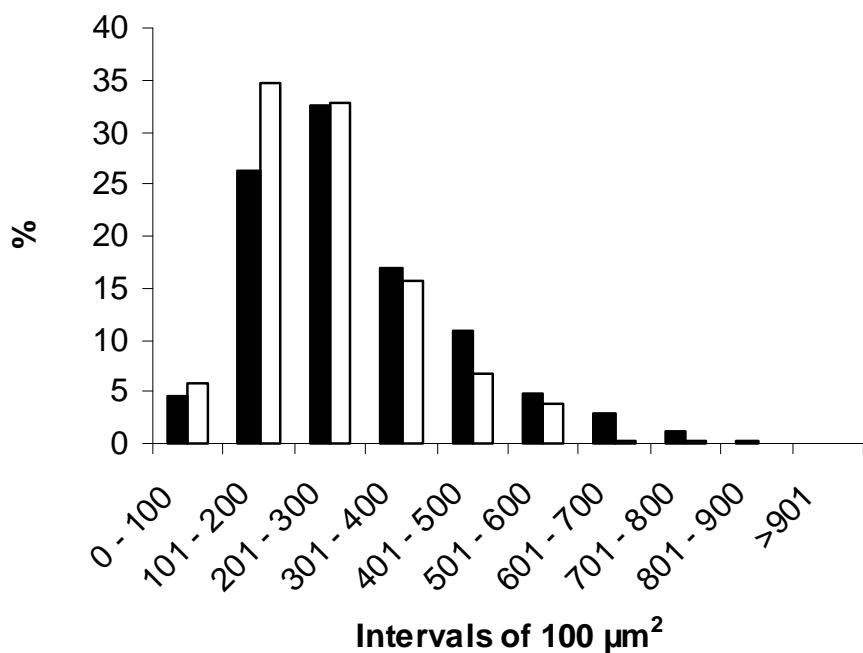
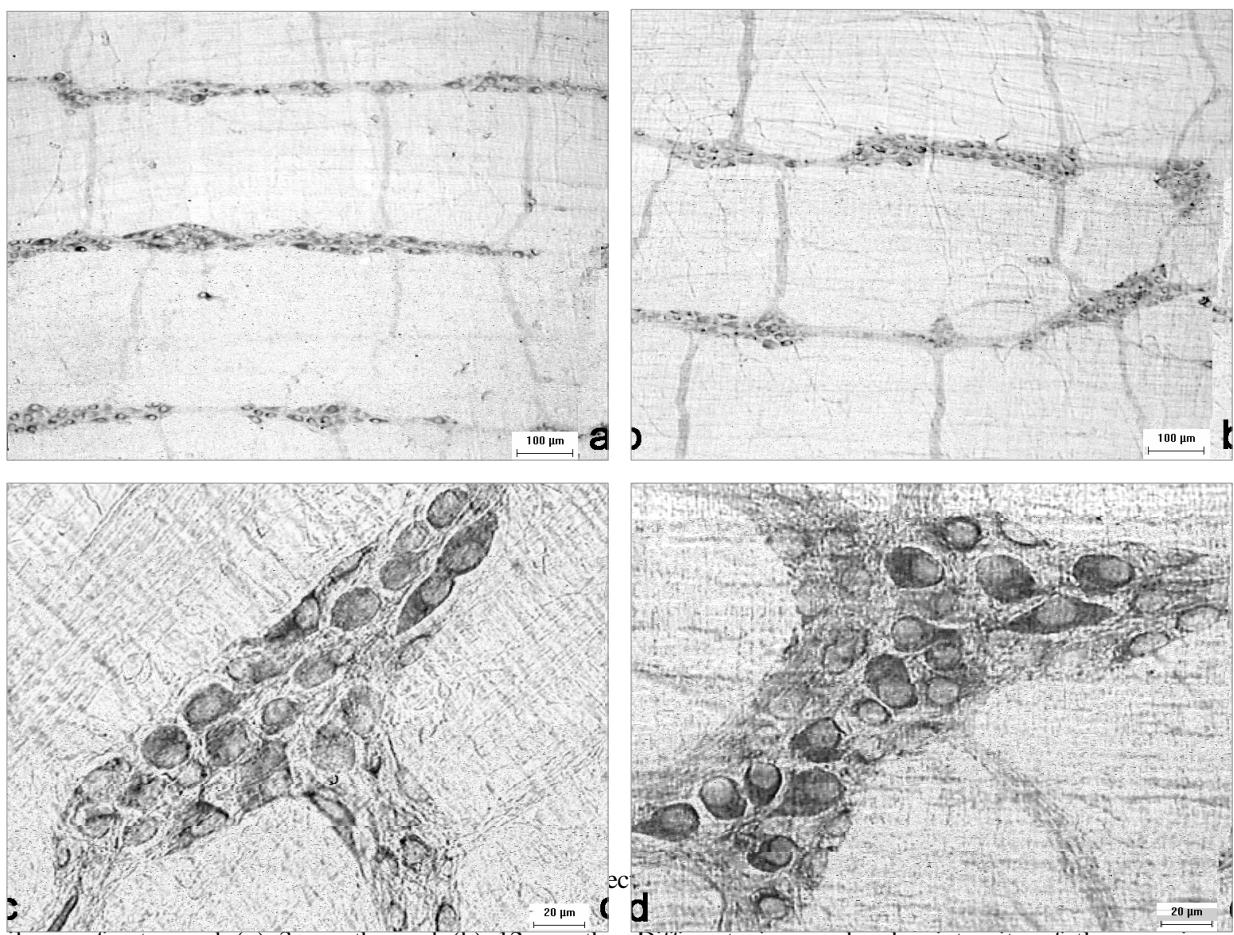


Fig. 2. Distribution by size of myosin-V immunoreactive myenteric neurons, classified at intervals of $100 \mu\text{m}^2$. Group: control (■) and proteic restriction (□).



ileum of rats aged (a) 3 months and (b) 12 months. Different sizes and color intensity of the myosin immunoreactive neurons of a myenteric ganglion in rats aged (c) 3 months and (d) 12 months.

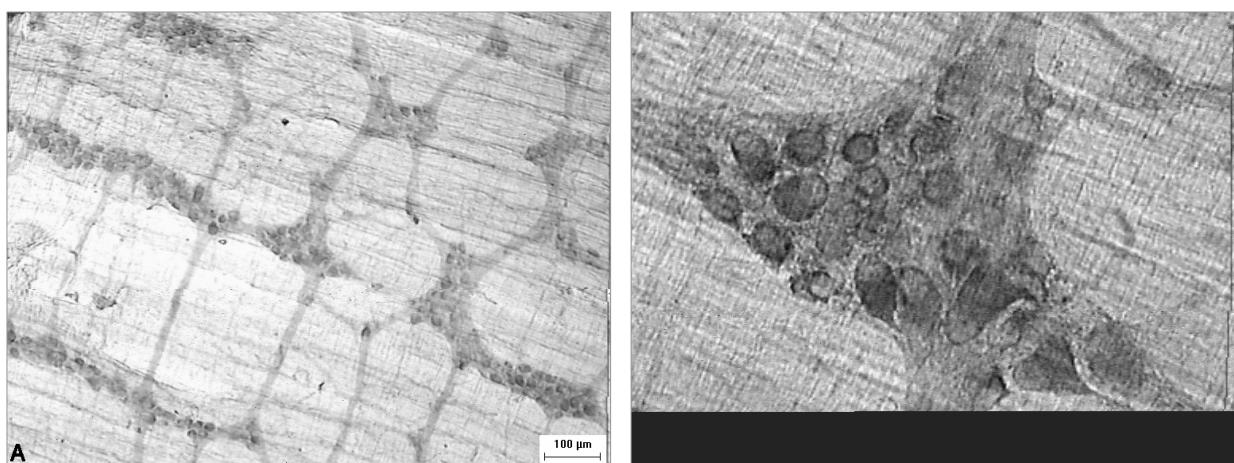


Fig. 1. (A) Myosin-V immunoreactive myenteric neurons in ganglia connected by nerve fibers in the proximal colon. (B) Different sizes and color intensity of neurons of a myenteric ganglion. Control group.

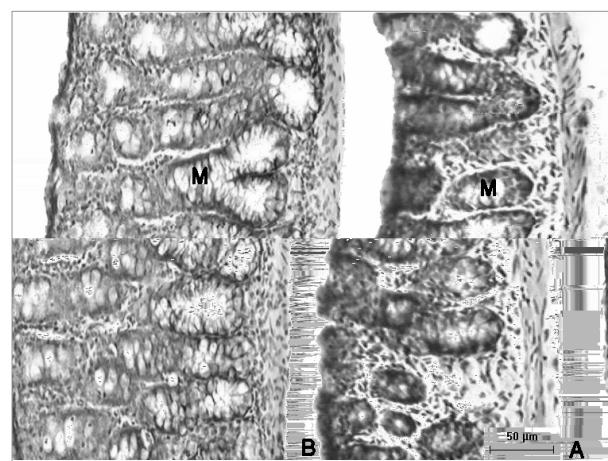


Fig. 3. Proximal colon of rats at 360 days of age staining the mucosa layer (M). Group: control (A) and proteic restriction (B). H.E.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)