



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

*Mudanças relacionadas à idade nos neurônios mioentéricos miosina
V, CGRP e VIP imunoreativos do íleo de ratos suplementados com
ácido ascórbico*

ANA PAULA TONON VEIT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jacqueline Nelisis Zanoni

MARINGÁ

2010

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos...

À minha orientadora, Jacqueline Nelisis Zanoni, para quem não há agradecimentos que cheguem. As notas dominantes da sua orientação foram à utilidade das suas recomendações e a cordialidade com que sempre me recebeu. Estou grata por ambas e também pela liberdade de ação que me permitiu que fosse decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal. Abriu-me horizontes, ensinou-me principalmente a pensar. Foi, e é fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e nos meus grandes sucessos.

Aos meus pais pelo amor, vida e educação, aos meus irmãos pelo incentivo e exemplo e, ao meu namorado pelo companheirismo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

A Helena, secretária do Programa de Pós-graduação, pelo auxílio e paciência constantes.

As Professoras Doutoras Ângela Maria Pereira Alves e Rúbia Maria Weffort de Oliveira, por terem aceitado participar como membros das bancas de qualificação do Mestrado, e por suas idéias e sugestões, que contribuíram para os ajustes necessários.

A todos os funcionários do Departamento de Ciências Morfológicas, em especial, Maria Euride e Maria dos Anjos, técnicas do Laboratório de Histologia, pelo auxílio técnico.

Apresentação e Resumo

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de Mestrado é composta por uma introdução ampliada, seguindo a NBR 6027/2003 e a NBR 14724/2005 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e por um artigo científico completo, redigido em português e inglês, na forma exigida pela revista científica *Autonomic Neuroscience*, escolhida visando a sua publicação.

1 Introdução Ampliada.....	15
Referências.....	23
2 Ana Paula Tonon Veit, Jacqueline Nelisis Zanoni. Mudanças relacionadas à idade nos neurônios mioentéricos miosina V, CGRP e VIP imunoreativos do íleo de ratos suplementados com ácido ascórbico. <i>Autonomic Neuroscience</i>	30
3 Ana Paula Tonon Veit, Jacqueline Nelisis Zanoni. Age-related changes in myosin-V myenteric neurons, calcitonin gene-related peptide immunoreactivity, and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the ileum of rats supplemented with ascorbic acid. <i>Autonomic Neuroscience</i>	58

RESUMO

O Sistema Nervoso Entérico é formado por uma variedade de neurônios que se organizam em dois plexos ganglionados principais, mioentérico e submucoso, responsáveis pelo controle de diversas funções gastrointestinais: motilidade, secreção, fluxo sanguíneo, crescimento mucosal e aspectos do sistema imune local. O envelhecimento é um processo complexo influenciado pela estrutura genética do indivíduo, estilo de vida e ambiente. É o resultado da danificação de moléculas, células e tecidos os quais gradativamente perderam a capacidade de se adaptarem ou de repararem um dano. Várias doenças gastrointestinais estão associadas ao envelhecimento, resultando em alterações na função da mucosa e/ou na motilidade do trato gastrointestinal, que dependendo da região afetada, podem levar a distúrbios, como disfagia, desordens de refluxo gastroesofágico, dificuldade de relaxamento do fundo gástrico durante a ingestão de alimentos, gastrite atrófica, retardamento do período digestivo, divertículos intestinais, diarreia e incontinência fecal. O trabalho teve como objetivo investigar o efeito da suplementação com ácido ascórbico da população geral de neurônios mioentéricos (miosina-V imunoreativos) e sub-populações de neurônios inibitórios (Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina-CGRP e Peptídeo Vasoativo Intestinal-VIP imunoreativos) em ratos em processo de envelhecimento. Oitenta e cinco ratos machos Wistar, com 90 dias de idade foram divididos nos grupos: ratos com 90 dias (E90), ratos controle com 345 dias (E345), ratos controle com 428 dias (E428), ratos tratados com ácido ascórbico do 90° ao 345° dia de idade (EA345) e ratos tratados com ácido ascórbico do 90° ao 428° dia de idade (EA428). O tratamento com o ácido ascórbico foi realizado durante 255 dias (grupo EA345) e 338 dias (grupo EA428), sendo adicionada diariamente à água dos animais (1g/L) de forma *ad libitum*. Após esse período, os íleos dos animais foram submetidos às técnicas imunohistoquímicas. As imagens dos neurônios do plexo mioentérico foram capturadas em objetiva de 20X. Para a análise das varicosidades dos neurônios que expressam para o CGRP e VIP, foi mensurada a área (μm^2) de 400 varicosidades em cada animal (2400/grupo). Dez imagens de neurônios miosina V foram quantificadas por animal. A morfometria foi realizada através da mensuração dos corpos celulares dos neurônios (500/grupo). O envelhecimento promoveu uma redução do número de neurônios miosina V imunoreativos e alterou o tamanho das varicosidades dos neurônios VIP-IR e CGRP-IR. A suplementação com ácido ascórbico apresentou um efeito neurotrófico sobre todos os neurônios estudados, sugerindo um papel neuroprotetor.

Palavras-chave: envelhecimento, ácido ascórbico, neurônios mioentéricos, CGRP, VIP, miosina V.

ABSTRACT

The Enteric Nervous System is composed by a variety of neurons organized in two ganglionated main plexus, myenteric and submucous, responsible for the control of several gastrointestinal functions: motility, secretion, blood flow, mucosal growth and aspects of the local immune system. Aging is a complex process influenced by genetic structure of the individual, lifestyle and environment. It results from damage to molecules, cells and tissues which gradually lost their ability to adapt or repair damage. Several gastrointestinal diseases are associated to the aging, resulting in impaired function of the mucosa and/or motility of the gastrointestinal tract, which depending on the affected area, can lead to disorders such as dysphagia, gastroesophageal reflux disorders, difficulty in relaxation of gastric fundus during the food intake, atrophic gastritis, delaying the digestive period, intestinal diverticula, diarrhea and fecal incontinence. The objective of this study was to investigate the effect of ascorbic acid supplementation on general myenteric neurons population (myosin-V immunoreactive) and sub-populations of inhibitory neurons (Calcitonin Gene Related Peptide-CGRP and vasoactive intestinal peptide VIP-immunoreactive) in rats aging process. Eighty-five male rats 90 days-old were divided in two groups: rats with 90 days-old (E90), control rats with 345 days-old (E345), control rats with 428 days-old (E428), rats treated with ascorbic acid of 90° to 345° day-old (EA345) and rats treated with ascorbic acid of 90° to 428° day-old (EA428). Treatment with ascorbic acid was conducted for 255 days (group EA345) and 338 days (group EA428), water being added daily to the animals (1g / L) on an *ad libitum*. After this period, the ileums of the animals were subjected to immunohistochemistry techniques (myosin-V and nNOS). The images were captured in a 20X objective. For the analysis of varicosities of neurons that express CGRP and to the VIP area was measured (μm^2) 400 varicosities in each animal (2400/grupo). Ten images of myosin neurons were quantified per animal. The morphometry was performed by measuring the cell bodies of neurons (500/grupo). Aging promoted a reduction the numbers of neurons immunoreactive myosin V and changed the size of the varicosities of VIP-IR neurons and CGRP-IR. Supplementation with ascorbic acid had a neurotrophic effect on all neurons studied, suggesting a neuroprotective role.

Key words: aging, ascorbic acid, myenteric neurons, CGRP, VIP, Myosin V.

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo Científico

- Tabela 1 - Peso inicial (PI), Peso final (PF) e Comprimento cauda-nasal do íleo pertencentes aos grupos de ratos jovens (E90), ratos envelhecidos sem tratamento (E345 e E428) e ratos envelhecidos tratados com ácido ascórbico (EA345 e EA428). n= 6 para cada grupo analisado.....52
- Tabela 2 - Área do corpo celular dos neurônios mioentéricos miosina V imunoreativos (μm^2) e área das varicosidades (μm^2) de fibras nervosas que expressam para CGRP e VIP nos grupos de ratos jovens (E90), ratos envelhecidos sem tratamento (E345 e E428) e ratos envelhecidos tratados com ácido ascórbico (EA345 e EA428). n= 6 para cada grupo analisado.....53
- Figura 1 - Número de neurônios mioentéricos miosina-V imunoreativos por gânglio em objetiva de 20X na região intermediária do íleo pertencentes aos grupos de ratos jovens (E90), ratos envelhecidos sem tratamento (E345 e E428) e ratos envelhecidos tratados com ácido ascórbico (EA345 e EA428). n= 5 para cada grupo analisado.....54
- Figura 2 - Neurônios imunoreativos a miosina V (A, B, C, D, E) da região intermediária do íleo dos ratos dos grupos: (A) E90 - jovens; (B) E345 - envelhecidos com 345 dias de idade; (C) EA345 - envelhecidos com 345 dias de idade tratados com ácido ascórbico; (D) E428 - envelhecidos com 428 dias de idade; (E) EA428 - envelhecidos com 428 dias de idade tratados com ácido ascórbico e distribuição de frequências relativas do perfil celular dos neurônios mioentéricos miosina V imunoreativos do íleo dos animais (F). Barra de calibração: 50 μm55
- Figura 3 - Fotomicrografia das varicosidades do plexo mioentérico do íleo de ratos jovens e em envelhecimento, com imunoreatividade ao CGRP pertencentes aos grupos: (A) E90 - jovens; (B) E345 - envelhecidos com 345 dias de idade; (C) EA345 – envelhecidos com 345 dias de idade tratados com ácido ascórbico; (D) E428 - envelhecidos com 428 dias de idade; (E) EA428 – envelhecidos com 428 dias de idade tratados com ácido ascórbico e distribuição de frequências relativas às

varicosidades dos neurônios mioentéricos CGRP do íleo dos animais (F). Barra de calibração: 50µm.....56

Figura 4 - Fotomicrografia das varicosidades do plexo mioentérico do íleo de ratos jovens e em envelhecimento, com imunoreatividade ao VIP pertencentes aos grupos: (A) E90 - jovens; (B) E345 - envelhecidos com 345 dias de idade; (C) EA345 – envelhecidos com 345 dias de idade tratados com ácido ascórbico; (D) E428 - envelhecidos com 428 dias de idade; (E) EA428 - envelhecidos com 428 dias de idade tratados com ácido ascórbico e distribuição de frequências relativas às varicosidades dos neurônios mioentéricos VIP do íleo dos animais (F). Barra de calibração: 50µm.....57

Journal Article

Table 1 - Inicial weight (PI), final weight (PF) and e nasal-caudal length in the groups of young rats (E90), aged rats without treatment (E345 e E428) and aged rats treated with ascorbic acid (EA345 e EA428). n= 6 animals per group.....78

Table 2 - Area of the cell body of myenteric neurons immunoreactive myosin V (µm²) and area of varicosities (µm²) of nerve fibers that express CGRP and VIP in the groups of young rats (E90), aged rats without treatment (E345 e E428) and aged rats treated with ascorbic acid (EA345 e EA428). n= 6 animals per group.....79

Figure 1 - Number of myenteric neurons immunoreactive for myosin-V ganglia using a 20× objective in the intermediate region of the ileum in young rats (E90), aged rats with no supplementation (E345 and E428), and aged rats supplemented with ascorbic acid (EA345 and EA428). n = 5 animals per group. **p* < 0.05, compared with E428 group.....82

Figure 2 - Myosin-V-immunoreactive neurons of the intermediate region of the ileum of rats in the following groups: (A) E90 (young), (B) E345 (aged 345-day-old rats), (C) EA345 (aged 345-day-old rats supplemented with ascorbic acid), (D) E428 (aged 428-day-old rats), and (E) EA428 (aged 428-day-old rats supplemented with

ascorbic acid). (F) Relative frequency distribution of cellular profile of myosin-V-immunoreactive myenteric neurons in the ileum. Calibration bar = 50 μm83

Figure 3 - Photomicrograph of varicosity of CGRP immunoreactivity in the myenteric plexus of the ileum in young and aged rats: (A) E90 (young), (B) E345 (aged 345-day-old rats), (C) EA345 (aged 345-day-old rats supplemented with ascorbic acid), (D) E428 (aged 428-day-old rats), and (E) EA428 (aged 428-day-old rats supplemented with ascorbic acid). (F) Relative frequency distribution of varicosity of CGRP-immunoreactive myenteric neurons in the ileum. Calibration bar = 50 μm84

Figure 4 - Photomicrograph of varicosity of VIP immunoreactivity in the myenteric plexus of the ileum in young and aged rats: (A) E90 (young), (B) E345 (aged 345-day-old rats), (C) EA345 (aged 345-day-old rats supplemented with ascorbic acid), (D) E428 (aged 428-day-old rats), (E) EA428 (aged 428-day-old rats supplemented with ascorbic acid). (F) Relative frequency distribution of varicosity of VIP-immunoreactive myenteric neurons in the ileum. Calibration bar = 50 μm85

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO AMPLIADA	15
	REFERÊNCIAS.....	23
2	ARTIGO CIENTÍFICO	30
	RESUMO.....	31
	INTRODUÇÃO.....	32
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
	<i>Obtenção dos grupos de estudo</i>	34
	<i>Coleta e processamento do material</i>	35
	<i>Neurônios mioentéricos imunoreativos ao CGRP e VIP</i>	35
	<i>Análise das varicosidades dos neurônios CGRP-IR e VIP-IR</i>	36
	<i>Imunolocalização da miosina V neural: estudo da população geral dos neurô- mioentéricos</i>	37
	<i>Análise quantitativa dos neurônios mioentéricos miosina V imunoreativos</i>	38
	<i>Análise morfológica dos neurônios mioentéricos miosina V imunoreativos</i>	39
	<i>Análise estatística</i>	39
	RESULTADOS.....	39
	DISCUSSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS.....	47
	TABELAS E FIGURAS.....	52
3	JOURNAL ARTICLE	58
	ABSTRACT.....	59
	INTRODUCTION.....	60
	MATERIALS AND METHODS.....	62
	<i>Study groups</i>	62
	<i>Material resection and processing</i>	63
	<i>Myenteric neurons immunoreactive for CGRP and VIP</i>	63
	<i>Analysis of CGRP-IR and VIP-IR neuron varicosities</i>	64
	<i>Immunolocalization of neuronal myosin-V: study of general myenteric neu- population</i>	64
	<i>Quantitative analysis of myosin V immunoreactive myenteric neurons</i>	65

<i>Morphometric analysis of myosin V immunoreactive myenteric neurons</i>	66
<i>Statistical analysis</i>	66
RESULTS.....	66
DISCUSSION.....	68
REFERENCES.....	73
TABLES AND FIGURES.....	78

Introdução Ampliada

INTRODUÇÃO AMPLIADA

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) é o componente nervoso que se localiza nas camadas que formam a parede do trato gastrointestinal (TGI), estendendo-se desde as porções iniciais do esôfago até o esfíncter anal interno (BREHMER, 2006). Apresenta a habilidade de funcionar independentemente do Sistema Nervoso Central (SNC) e é formado por uma variedade de neurônios distintos funcionalmente (neurônios aferentes, interneurônios e neurônios motores), que se organizam principalmente em dois plexos nervosos: mioentérico (de Auerbach) e o submucoso (de Meissner) (KUNZE; FURNESS, 1999). O plexo mioentérico, localizado entre as camadas musculares longitudinal e circular, tem um importante papel na contração e no relaxamento do músculo liso gastrointestinal (WESTFALL; WESTFALL, 2006). O plexo submucoso está envolvido com as funções secretórias e absorptivas do epitélio gastrointestinal, com o fluxo sanguíneo local e com atividades neuroimunes (COOK, 1998; BENARROCH, 2007).

Histologicamente, o TGI é composto por quatro túnicas distintas: a túnica mucosa, a tela submucosa, a túnica muscular e a túnica serosa. Nos segmentos do TGI, a túnica mucosa possui três partes: o epitélio, a lâmina própria (tecido conjuntivo) e a muscular da mucosa. A camada mucosa é altamente vascularizada e apresenta glândulas e também vasos e nódulos linfáticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A tela submucosa é formada por tecido conjuntivo fibro elástico, com vasos sanguíneos e linfáticos, e apresenta o plexo nervoso submucoso, responsável pelo controle da motilidade da mucosa e da atividade secretora de suas glândulas. A túnica muscular compreende a musculatura lisa disposta em duas camadas: uma interna (a circular) e outra externa (a longitudinal). Entre estas duas camadas está localizado o plexo

mioentérico que regula a atividade da túnica muscular, ou seja, a atividade peristáltica. A camada mais externa é a túnica serosa. Esta é formada por tecido conjuntivo frouxo, no qual há numerosas células adiposas e vasos sanguíneos e linfáticos e, também, pelo mesotélio constituído por epitélio simples (BREHMER, 2006; GARTNER; HIATT, 2007).

O SNE humano contém cerca de 100 milhões de neurônios e compreende vários tipos de neurônios, que são distribuídos de maneira diferente, dependendo do segmento e da espécie. A densidade de neurônios é alta no plexo mioentérico e, menor, no plexo submucoso (WOOD et al.,1999).

Os neurônios entéricos exercem suas funções de acordo com a expressão de marcadores químicos. Cada neurônio expressa uma combinação de diferentes neurotransmissores, fenômeno conhecido como código químico. Normalmente, uma dessas várias substâncias expressas pelo mesmo neurônio entérico atua como transmissor primário, enquanto as demais atuam como neuromoduladores e/ou transmissores subsidiários (TIMMERMANS et al., 1997).

O SNE está conectado com o SNC por uma inervação extrínseca, que consiste de nervos simpáticos e parassimpáticos. Por meio destas conexões neurais, as informações são transmitidas para o gânglio pré e paravertebral, a medula espinal e por fim, para o cérebro. Por ser relativamente independente do SNC, o SNE ajuda a coordenar funções complexas como a motilidade, a secreção e o fluxo sanguíneo do TGI, respondendo, portanto pela inervação intrínseca. Estes neurônios constituem uma complexa e variada população que deve ser conhecida para a compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiologia digestiva (SCHÄFER et al., 1999; WADE; COWEN, 2004).

Os neurônios entéricos são heterogêneos quanto a papéis fisiológicos e neurotransmissores (SAFFREY, 2004). Estudos químicos, histoquímicos, imunohistoquímicos e fisiológicos comprovam a diversidade morfológica do SNE. Em relação aos neurotransmissores, as células nervosas intestinais podem expressar um número variado deste tipo de substâncias, além dos clássicos acetilcolina (ACh) e adrenalina/noradrenalina. Várias sub-populações neuronais podem ser distinguidas de acordo com o tipo de neurotransmissor que expressam, destacando-se: neurônios colinérgicos (ACh); noradrenérgicos (noradrenalina); serotoninérgicos (serotonina - 5-HT); purinérgicos (adenosina trifosfato - ATP); peptidérgicos (peptídeos como polipeptídeo vasoativo intestinal – VIP, substância P, somatostatina e/ou encefalinas) e nitrérgicos (óxido nítrico) (GERSHON; ERDE, 1981; OLSSON; HOLMGREN, 2001).

As células nervosas do SNE podem sofrer mudanças estruturais e/ou funcionais como resultado de respostas adaptativas a diferentes estímulos, na tentativa de manter a homeostase das funções intestinais (GIARONI et al, 1999; LOMAX et al, 2005). Algumas condições patológicas também estão envolvidas com alterações dos neurônios entéricos e outros neurônios autonômicos, incluindo doenças intestinais (colite ulcerativa ou doença de Crohn), doenças extra-intestinais (doença de Parkinson), neuropatias entéricas (GIARONI et al., 1999; MICIELI et al., 2003; VINIK et al., 2003) e também no processo de envelhecimento (SCHNEIDER et al., 2007).

A heterogeneidade da população neuronal mioentérica tem sido confirmada por estudos histoquímicos e imunohistoquímicos, que tem identificado sub-populações de neurônios neuroquimicamente diferentes, possuindo diferentes projeções (STERNINI, 1988).

Recentemente, a técnica imunohistoquímica para detectar Miosina V tem sido utilizada como marcador geral da população neuronal (DRENGK et al., 2000;

BUTTOW et al., 2003; ZANONI et al., 2003; SCHOFFEN et al., 2005). A proteína miosina V está presente especificamente no citoplasma neuronal, o que confere especificidade à técnica, permitindo a visualização dos corpos celulares e suas projeções (DRENGK et al., 2000; ZANONI et al., 2003). Está relacionada com a dinâmica de membranas (endocitose e exocitose), transporte axoplasmático e liberação de neurotransmissores, graças a sua capacidade de converter energia química, na forma de ATP, em energia motora, gerando movimento através dos filamentos de actina (HASSON; MOOSEKER, 1997; LANGFORD; MOLYNEAUX, 1998).

O peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) é um neuropeptídeo constituído de 37 aminoácidos, está distribuído nos gânglios com maior densidade no duodeno e colo, possui ação biológica potente como inibição do ácido gástrico e vasodilatação, produz relaxamento da musculatura lisa intestinal, aumenta o fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e estimula a liberação de somatostatina a partir de células antral D. Tem importante papel como neuromodulador, presente tanto em neurônios sensoriais quanto motores, são semelhantes aos neurônios Dogiel tipo II. (STERNINI, 1988; HOLZER; GUTH, 1991; MAGGI et al., 1997 apud KOJIMA; SHIMO, 1995; CHIOCHETTI et al., 2006; PHILIPS; POWLEY, 2007).

O peptídeo vasoativo intestinal (VIP) contém 28 aminoácidos e é membro da mesma família a qual também pertencem a secretina, glucagon, gastrina, polipeptídeo ativador da adenilato-ciclase pituitária (PACAP) e peptídeo inibidor gástrico (MISERY, 1997).

O VIP distribui-se de maneira ampla pelos SNC e periférico dos seres humanos e de várias espécies animais, locais onde atua como um neurotransmissor ou neuromodulador (SAID; MUTT, 1970). Em nível de SNE, são encontrados no plexo mioentérico e submucoso da maioria dos mamíferos. Regula a motilidade da

musculatura lisa e a secreção de água intestinal e tem importante relação com o óxido nítrico (NO) sendo que ambos têm importante efeito no trato digestivo e também nos vasos sanguíneos. A diminuição ou ausência dos mesmos pode ocasionar contrações espásticas dessas estruturas causando transtornos circulatórios do aparelho digestivo, dentre os quais, a constipação (SANTOS, 2007).

O VIP provoca o relaxamento das células musculares lisas GI. Além disso, o VIP é responsável pelo relaxamento das células musculares lisas vasculares sendo, portanto, um agente vasodilatador. Está também presente em neurônios colinérgicos do SNA, potencializando a ação da ACh nas glândulas salivares. Contudo, o VIP e a ACh não coexistem em outros neurônios do TGI. O VIP também tem ações comuns com moléculas de estrutura semelhante, como a secretina ou o peptídeo gástrico inibitório (GIP). Logo, estimula a secreção pancreática, inibe a secreção gástrica e estimula a secreção intestinal (BORNSTEIN et al., 2004; EKBLAD; BAUER, 2004).

Fatores genéticos, imunológicos e fatores relacionados com estresse oxidativo são apontados como as principais causas do processo de envelhecimento celular (GUTIERREZ ROBLEDO, 1998).

Várias doenças gastrointestinais estão associadas ao envelhecimento (TALLEY et al., 1992; MAJUMDAR et al., 1997), resultando em alterações na função da mucosa e/ou na motilidade do TGI, que dependendo da região afetada, podem levar a distúrbios, como disfagia, desordens de refluxo gastroesofágico, dificuldade de relaxamento do fundo gástrico durante a ingestão de alimentos, gastrite atrófica, retardamento do período digestivo, divertículos intestinais, diarreia e incontinência fecal (WADE; COWEN, 2004; PHILLIPS; POWLEY, 2007).

O envelhecimento pode ser definido como um processo deteriorativo progressivo e irreversível, característico da maioria dos sistemas e que, por ser

progressivo, há uma grande probabilidade de morte, seja de uma célula, um tecido, um órgão ou mesmo de um indivíduo (ALVAREZ; JAVIER, 1999; ESBÉRARD, 1999). É um processo muito complexo, influenciado pela estrutura genética do indivíduo, estilo de vida e o meio ambiente (LEME, 2002).

As alterações genéticas estão relacionadas com o envelhecimento da codificação do DNA, provocando falhas na transcrição e na síntese de moléculas protéicas e outras macromoléculas. Os fatores imunológicos são decorrentes do ataque do sistema imune. Segundo Caldeira et al. (1989), a diminuição das respostas imunológicas com a idade aumenta as manifestações auto-ímmunes, tornando este sistema cada vez menos eficiente para diferenciar elementos próprios dos estranhos ao organismo.

O principal fator associado com a morte neuronal é a geração de radicais livres, uma vez que este tecido apresenta elevado consumo de oxigênio, sendo bastante suscetível ao dano oxidativo, provocado principalmente pelos radicais superóxido (O_2^-), hidroxil (OH), peroxil (RO_2), NO e pelo não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL, 1992; KUYVENHOVEN; MEINDERS, 1999). As espécies reativas ao oxigênio, geradas principalmente nas mitocôndrias durante o processo de respiração celular, apresentam elétrons desemparelhados, o que as torna altamente reativas para reagir com as demais substâncias biológicas do organismo (KUYVENHOVEN; MEINDERS, 1999).

Os radicais livres são responsáveis por danos celulares cumulativos e irreversíveis, podendo provocar perda das funções das células e até morte por necrose ou apoptose (IMAI; NAGAKAWA, 2003). Além disso, estas espécies estão envolvidas na oxidação catalítica dos compostos endógenos e xenobióticos pelo citocromo P-450, na regulação do tônus da musculatura lisa via radical NO, na redução do oxigênio da água na cadeia respiratória durante a síntese de prostaglandinas e leucotrienos, e na

morte de microorganismos (KUYVENHOVEN; MEINDERS, 1999). Segundo Sayre et al. (1997) os radicais livres e outros produtos do metabolismo oxidativo também exercem efeito neurotóxico, sendo responsáveis por desordens degenerativas presentes na doença de Alzheimer, por exemplo.

As substâncias antioxidantes, que permitem a manutenção do equilíbrio interno do organismo, impedindo a formação dos radicais livres ou neutralizando as espécies já formadas, sofrem redução durante o processo de envelhecimento, favorecendo ainda mais a ocorrência do estresse oxidativo (KUYVENHOVEN; MEINDERS, 1999). O nível modesto de antioxidantes, associado com o aumento da concentração de ferro (BENKOVIC; CONNOR, 1993) e de ácidos graxos polinsaturados (RICE-EVANS; BURDON, 1993) tornam o tecido neural ainda mais suscetível às espécies reativas ao oxigênio.

Drogas que reduzem o estresse oxidativo podem ter um papel relevante na prevenção das complicações intestinais provocadas com a idade, como é o caso do ácido ascórbico, à medida que possa prevenir a redução do número de neurônios mioentéricos decorrente da ação dos radicais livres (ZANONI et al., 2005).

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel que apresenta efeito antioxidante comprovado na neutralização de radicais livres, assim como as vitaminas A e E (CALDEIRA et al., 1989; DEPLABOS; GONZÁLEZ, 2000). É uma lactona insaturada com anel de cinco membros onde cada carbono está ligado à uma hidroxila, exceto o carbono carbonílico, que se encontra envolvido em uma ligação éster (CAMPBELL, 2000).

A síntese de ácido ascórbico é realizada, na maioria das espécies, pelo metabolismo hepático da glicose, entretanto o homem não dispõe desse mecanismo, devido à ausência da enzima gulonolactona oxidase, responsável pela conversão da 1-

gulonolactona para 2-ceto-1-gulonolactona. Portanto, é recomendada a ingestão diária de 60 mg de ácido ascórbico tanto por homens como por mulheres, para prevenir doenças como, por exemplo, o escorbuto (LEVINE, 1986).

O ácido ascórbico ingerido da dieta sofre de 70 a 90 % de absorção no íleo de pessoas normais, por meio de transporte ativo dependente de sódio. Nas células intestinais, o ácido ascórbico é convertido em dihidroascórbico (DHAA), que por sua vez é transportado por difusão facilitada e penetra mais facilmente nas células (SCHORAH, 1992; WILL; BYERS, 1996).

O efeito protetor do ácido ascórbico por meio de seus mecanismos antioxidantes é relatado inclusive em células do SNC. Esta vitamina é apontada como uma esperança promissora na redução dos danos provocados por doenças degenerativas como o mal de Alzheimer, podendo evitar a perda de memória em ratos envelhecidos, reduzindo os danos provocados pelo efeito oxidativo nas células cerebrais (PARLE; DHINGRA, 2003). Entretanto, O'Donnell e Lynch (1998) relataram a diminuição significativa na concentração de ácido ascórbico no córtex cerebral de ratos envelhecidos. Sendo assim, o mesmo pode ser utilizado também para evitar a ocorrência das complicações intestinais provocadas com a idade, à medida que previne a diminuição do número de neurônios mioentéricos decorrente da ação dos radicais livres.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, L., JAVIER, F. Biología celular y molecular Del envejecimiento neural: estado actual y perspectivas. *Salud. Ment.* v. 22, p. 6-16, 1999.
- BENARROCH, E.E. Enteric nervous system. *Neurol.* v. 69, p. 1953-1967, 2007.
- BENKOVIC, S. A.; CONNOR, J. R. Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J. Comp. Neurol.* v. 338, 97-119, 1993.
- BORNSTEIN, J.C. et al. Enteric motor and interneuronal circuits controlling Motility. *Neurogastroenterol. Motil.* v. 16, p. 34–38, 2004.
- BREHMER, A., 2006. Structure of Enteric Neurons. *Springer*, Berlin Heidelberg New York, 5 – 106.
- BUTTOW, N.C. et al. Substance P enhances neuronal area and epithelial cell proliferation after colon denervation in rats. *Dig. Dis. Sci.* v. 48, p. 2069-2076, 2003.
- CALDEIRA, A.M.L. et al. As bases biológicas do envelhecimento. *Rev. Fol. Méd.* v. 99, p. 107-118, 1989.
- CAMPBELL, M. K. *Bioquímica*. 3 ed. São Paulo: Artmed Editora, 2000.
- CHIOCCHETTI, R. et al. Extrinsic and intrinsic sources of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the lamb ileum: a morphometric and neurochemical investigation. *Cell Tissue Res.* v. 323, p.183–196, 2006.
- COOKE, H.J. “Enteric tears”: Chloride secretion and its neural regulation. *News Physiol. Sci.* v. 13, p. 269-274, 1998.
- DEPLABOS, B.G.; GONZÁLEZ, A.E. Envejecimiento vs. radicales libres. *Rev. Fac. Farm.* v. 38, p. 20-26, 2000.
- DRENGK, A.C. et al. Immunolocalisation of myosin-V in the enteric nervous system of the rat. *J Auton. Nerv. Syst.* v. 78, p. 109-112, 2000.

EKBLAD, E.; BAUER, A.J. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. *Neurogastroenterol. Motil.* v. 16, p. 123–128, 2004.

ESBÉRARD, C.A. As bases gerais e celulares da fisiologia médica. In: Gonong WF Fisiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. v. 32, 1999.

GARTNER, L.P., HIATT, J.L. Tratado de Histologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 387- 417. 2007.

GERSHON, M. D.; ERDE, S. M. The nervous system of the gut. *Gastroenterol.* v. 80, p. 1571-1594, 1981.

GIARONI, C. et al. Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterol.* v. 117, p. 1438-1458, 1999.

GUTIERREZ ROBLEDO, L.M. El proceso de envejecimiento humano: implicaciones clínicas y asistenciales. *Rev. Fac. Med.* v. 41, p. 198-206, 1998.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* v. 59, p. 1609-1623, 1992.

HASSON, T.; MOOSEKER, M.S. The growing family of myosin motors and their role in neurons and sensory cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* v. 7, p. 615-623, 1997.

HOLZER, P.; GUTH, P.H. Neuropeptide control of rat gastric mucosal blood flow. Increase by calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal polypeptide, but not substance P and neurokinin. *A. Circ. Res.* v. 68, p. 100-105, 1991.

IMAI, H.; NAGAKAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* v. 34, p. 145-169, 2003.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. *Histologia Básica*; 10ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KOJIMA, S.; SHIMO, Y. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) - enhanced non-adrenergic non-cholinergic contraction of guinea-pig proximal colon. *Br. J. Pharmacol.* v. 115, p. 1290-1294, 1995.

KUNZE, W. A.; FURNESS, J.B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu. Rev. Physiol.* v. 61, p. 117–142, 1999.

KUYVENHOVEN, J. P.; MEINDERS, A. E. Oxidative stress and diabetes mellitus – Pathogenesis of long-term complications. *Eur. J. Intern. Med.* v. 10, p. 9-19, 1999.

LANGFORD, G.M.; MOLYNEAUX, B.J. Myosin V in the brain: mutations lead to neurological defects. *Brain Res. Rev.* v. 28, p. 1-8, 1998.

LEME, L.E.G. Por quê e como envelhecemos? Acesso em 11 de agosto de 2009. Disponível em URL: http://www.sosdoutor.com.br/sosortopedia/ortopediageral_envelhecemos.asp, 2009.

LEVINE, M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N. Engl. J. Med.* v. 314, p. 892-902, 1986.

LOMAX, A. E. et al., 2005. Plasticity of the enteric nervous system during inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 17, 4-15.

MAJUMDAR, A.P. et al. Effect of aging on the gastrointestinal tract and the pancreas. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v. 215, p. 134–144, 1997.

MICIELI, G. et al. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurol. Sci.* v. 24, p. 32-34, 2003.

MISERY, L. Skin, Immunity and the nervous system. *BR. J. Dermatol.* v. 137, p. 843-850, 1997.

O'DONNELL, E.; LYNCH, M. A. Dietary antioxidant supplementation reverses age-related neuronal changes. *Neurobiol. Aging.* v. 19, p. 461-467, 1998.

OLSSON, C.; HOLMGREN, S. The control of gut motility. *Comparative Biochemistry and Physiology: CBP. Part A. Mol. Integr. Physiol.* v. 128, p. 481-503, 2001.

PARLE, M.; DHINGRA, D. Ascorbic acid: a promising memory-enhancer in mice. *J. Pharmacol. Sci.* v. 93, p. 129-135, 2003.

PHILLIPS, R.J.; POWLEY, T.L. Inervation of the gastrointestinal tract: Patterns of aging. *Autonom. Neurosc. Basic & Clinical*, 2007.

RICE-EVANS, C.; BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid. Res.* v. 32, p. 71-110, 1993.

SAFFREY, M. J. Ageing of the enteric nervous system. *Mech. Ageing Dev.* v. 125, p. 899-906, 2004.

SAID, S.; MUTT, V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Sci.* v. 169, p. 1217-1218, 1970.

SANTOS, C.H.M. et al. Síndrome do ceco móvel: manifestações clínicas e avaliação radiológica da mobilidade do ceco e cólon ascendente em pacientes com queixa de constipação crônica. *Rev. bras. Coloproct.* Rio de Janeiro. v. 27, p. 2, 2007.

SAYRE, L.M. et al. Mechanisms of neurotoxicity associated with amyloid beta deposition and the role of free radicals in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a critical appraisal. *Chem. Res. Toxicol.* v. 10, p. 518-526, 1997.

SCHÄFER, K.H. et al. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *Anat. Rec.* v. 256, p. 20-28, 1999.

SCHNEIDER, L. C. et al. Evaluation of the ginkgo biloba extract (EGb 761) on the myenteric plexus of the small intestine of wistar rats. *J. Gastroenterol.* v. 42, p. 624-630, 2007.

SCHOFFEN, J.P. et al. Effects of hipoproteic diet on myosin-V immunostained myenteric neurons and the proximal colon wall of aging rats. *Auton. Neurosc.* v. 12, p. 77-83, 2005.

SCHORAH, C. J. The transport of vitamin C and effects of disease. *Proc. Nutr. Soc.* v. 51, p. 189-198, 1992.

STERNINI, C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. *Rev. Physiol.* v. 50, p. 81-93, 1988.

TALLEY, N.J. et al. Prevalence of gastrointestinal symptoms in the elderly: a populationbasedstudy. *Gastroenterol.* v. 102, p. 895-901, 1992.

TIMMERMANS, J.P. et al. Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp. Biochem. Physiol. A.* v. 118, p. 331-340, 1997.

VINIK, A. I. et al. Diabetic autonomic neuropathy. *Semin. Neurol.* v. 23, p. 365-372, 2003.

WADE, P.R.; COWEN, T. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. *Neurogastroenterol. Motil.* v. 16, p. 19-23, 2004.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D.P. Neurotransmissão: os sistemas nervoso autônomo e somático motor. IN:GOOGMAN & GILMAN. 11 edição, Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil. v. 6, p. 127-163, 2006.

WILL, J. C.; BYERS, T. Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C ? *Nutr. Rev.* v. 54, p. 193-202, 1996.

WOOD, J.D. et al. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut.* v. 45, p. 6-16, 1999.

ZANONI, J.N. et al. 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.* v. 104, p. 32-38, 2003.

ZANONI, J. N.; FREITAS, P. Effects of ascorbic acid on the vasoactive intestinal peptide synthesis in the ileum submucous plexus of normal rats. *Arq. Gastroenterol.* v. 42, p. 186-190, 2005.

Mudanças relacionadas à idade nos neurônios mioentéricos miosina V, CGRP e VIP imunoreativos do íleo de ratos suplementados com ácido ascórbico.

Ácido ascórbico e envelhecimento

Ana Paula Tonon Veit¹, Jacqueline Nelisis Zanoni¹

¹Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, nº 5790 Bloco H-79 – CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

Autor para correspondência: Telefone: +55 44 30115944; Fax: +55 44 30114340; E-mail: jnzanoni@uem.br

RESUMO

Objetivo. Investigar o efeito da suplementação com ácido ascórbico sobre os neurônios mioentéricos miosina V, CGRP e VIP imunoreativos de ratos em processo de envelhecimento. **Métodos.** Oitenta e cinco ratos machos Wistar, com 90 dias de idade, foram distribuídos nos grupos: ratos com 90 dias (E90), ratos controle com 345 dias (E345), ratos controle com 428 dias (E428), ratos tratados com ácido ascórbico do 90° ao 345° dias de idade (EA345) e ratos tratados com ácido ascórbico do 90° ao 428° dias de idade (EA428). O tratamento com o ácido ascórbico foi realizado durante 255 dias (grupo EA345) e 338 dias (grupo EA428), sendo adicionado diariamente à água dos animais (1g/L em água) que foi oferecida de forma *ad libitum*. Após esse período, o fêto dos animais foram adequadamente retirados e submetidos às técnicas imunohistoquímicas. As imagens obtidas a partir dos preparados totais foram capturadas em objetiva de 20X. Para a análise das varicosidades dos neurônios que expressam para o CGRP e VIP, foi mensurada a área (μm^2) de 400 varicosidades em cada animal (2400/grupo). Dez imagens de neurônios miosina V foram quantificadas por animal. A morfometria foi realizada através da mensuração dos corpos celulares dos neurônios imunoreativos à miosina V (500/grupo). **Resultados.** O envelhecimento promoveu uma redução do número de neurônios miosina V imunoreativos e alterou o tamanho das varicosidades dos neurônios VIP-IR e CGRP-IR. A suplementação com ácido ascórbico apresentou um efeito neurotrófico sobre todos os neurônios estudados, sugerindo um papel neuroprotetor.

Palavras-chave: envelhecimento, ácido ascórbico, neurônios mioentéricos, CGRP, VIP, miosina V.

1. Introdução

O Sistema Nervoso Entérico (SNE) é o componente nervoso que se localiza nas camadas que formam a parede do trato gastrointestinal (TGI) e apresenta a habilidade de funcionar independentemente do Sistema Nervoso Central (SNC) (Brehmer, 2006). Os neurônios entéricos são heterogêneos quanto a papéis fisiológicos e neurotransmissores (Saffrey, 2004). Estudos químicos, histoquímicos, imunohistoquímicos e fisiológicos comprovam a diversidade morfológica do SNE. Em relação aos neurotransmissores, as células nervosas intestinais podem expressar um número variado destes tipos de substâncias além dos clássicos acetilcolina e adrenalina/noradrenalina. As células nervosas do SNE podem sofrer mudanças estruturais e/ou funcionais como resultado de respostas adaptativas a diferentes estímulos, na tentativa de manter a homeostase das funções intestinais (Giaroni et al., 1999; Lomax et al., 2005). Algumas condições patológicas também estão envolvidas com alterações dos neurônios entéricos e outros neurônios autonômicos, incluindo doenças intestinais (colite ulcerativa ou doença de Crohn), doenças extra-intestinais (doença de Parkinson), neuropatias entéricas (Giaroni et al., 1999; Micieli et al., 2003; Vinik et al., 2003) e também no processo de envelhecimento (Schneider et al., 2007).

O envelhecimento está associado com uma variedade de doenças gastrointestinais (Talley et al., 1992; Majumdar et al., 1997). Por exemplo, com o avanço da idade vem aumentando a incidência de problemas relacionados à motilidade, incluindo atrasos no esvaziamento gástrico e maior tempo de trânsito intestinal associado com a estase fecal (Jost, 1997; O'Mahony et al., 2002; Hays; Roberts, 2006; Norton, 2006). Estes problemas gastrointestinais relacionados com a idade podem ter um impacto significativo tanto no bem-estar de indivíduos em envelhecimento como nos custos dos

cuidados da saúde. As causas dos distúrbios gastrointestinais dos idosos não são claras, mas os sintomas que sugerem uma etiologia subjacente poderia ser a perda ou a distorção funcional dos mecanismos neurais do intestino que normalmente contribuem para a função gastrointestinal e da saúde.

Várias doenças gastrointestinais estão associadas ao envelhecimento (Talley et al., 1992; Majumdar et al., 1997), resultando em alterações na função da mucosa e/ou na motilidade do TGI, que dependendo da região afetada, podem levar a distúrbios, como disfagia, desordens de refluxo gastroesofágico, dificuldade de relaxamento do fundo gástrico durante a ingestão de alimentos, gastrite atrófica, retardamento do período digestivo, divertículos intestinais, diarreia e incontinência fecal (Wade; Cowen, 2004; Phillips; Powley, 2007).

O principal fator associado com a morte neuronal é a geração de radicais livres, uma vez que o tecido nervoso apresenta elevado consumo de oxigênio (Halliwell, 1992; Kuyvenhoven; Meinders, 1999). As espécies reativas ao oxigênio, geradas principalmente nas mitocôndrias durante o processo de respiração celular, apresentam elétrons desemparelhados, o que as torna altamente reativas para reagir com as demais substâncias biológicas do organismo (Kuyvenhoven; Meinders, 1999).

Drogas que reduzem o estresse oxidativo podem ter um papel relevante no tratamento das complicações intestinais provocadas com a idade, como é o caso do ácido ascórbico, à medida que podem prevenir a redução do número de neurônios mioentéricos decorrente da ação dos radicais livres (Zanoni et al., 2005). As substâncias antioxidantes, que permitem a manutenção do equilíbrio interno do organismo, impedindo a formação dos radicais livres ou neutralizando as espécies já formadas, sofrem redução durante o processo de envelhecimento, favorecendo ainda mais a ocorrência do estresse oxidativo (Kuyvenhoven; Meinders, 1999). O nível

modesto de antioxidantes, associado com o aumento da concentração de ferro (Benkovic; Connor, 1993) e de ácidos graxos poliinsaturados (Rice-Evans; Burdon, 1993) tornam o tecido neural ainda mais suscetível às espécies reativas ao oxigênio.

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel que apresenta efeito antioxidante comprovado na neutralização de radicais livres, assim como as vitaminas A e E (Caldeira et al., 1989; Deplabos; González, 2000). O'Donnell e Lynch (1998) relataram a diminuição significativa na concentração de ácido ascórbico no córtex cerebral de ratos envelhecidos. Sendo assim, o ácido ascórbico pode ser utilizado também para evitar a ocorrência das complicações intestinais provocadas com a idade, à medida que previne a diminuição do número de neurônios mioentéricos decorrente da ação dos radicais livres.

O objetivo deste trabalho foi de estudar a população geral de neurônios mioentéricos (miosina V imunoreativos) e sub-populações de neurônios inibitórios: CGRP imunoreativos (CGRP-IR) e VIP imunoreativos (VIP-IR) em ratos em processo de envelhecimento submetidos à suplementação com ácido ascórbico.

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção dos grupos de estudo

Foram utilizados segmentos intestinais provenientes de 85 ratos machos albinos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar, com 90 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Esta pesquisa foi submetida à análise pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, com o protocolo número 024/2004 e obteve parecer favorável em 27/05/2004. Todas as

técnicas estão de acordo com princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram pesados e posteriormente distribuídos em cinco grupos: E90 (ratos com 90 dias); E345 (ratos controle com 345 dias), E428 (ratos controle com 428 dias), EA345 (ratos suplementados com ácido ascórbico do 90° ao 345° dia de idade) e EA428 (ratos suplementados com ácido ascórbico do 90° ao 428° dia de idade).

A suplementação com o ácido ascórbico foi realizada durante 255 dias (grupo EA345) e 338 dias (grupo EA428), sendo este adicionado diariamente à água dos animais (1g/L em água), em garrafas pintadas de preto e foi oferecida de forma *ad libitum*. Durante esse período, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, sob fotoperíodo (06:00 - 18:00 horas) e temperatura ($24^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) constantes. A suplementação foi realizada sempre no período da tarde (15:00 horas às 18:00 horas).

2.2. Coleta e processamento do material

Ao final do período experimental os animais foram mortos sob anestesia com tiopental (40mg/kg de peso corporal) por via intraperitoneal e após foi mensurado o comprimento nasal-caudal. Duas horas antecedendo a morte, os animais foram injetados com sulfato de vincristina (0,5mg/kg) para estabilizar os microtúbulos do citoesqueleto.

2.3. Neurônios mioentéricos imunoreativos ao CGRP e VIP

O íleo foi retirado, lavado com tampão fosfato salinado (PBS) 0,1 M pH 7,4, amarrado em uma das extremidades do segmento e injetado com fixador de Zamboni e fechado na outra extremidade. Os segmentos foram armazenados na mesma solução

fixadora por 18 horas. Foram cortadas as extremidades, aberto na borda mesentérica, desidratados em série crescente de álcoois (80, 95 e 100%), diafanizados em xilol e reidratados em série decrescente de álcoois (100, 95 e 80%), permanecendo por 30 minutos em cada solução e armazenados em PBS acrescido de azida sódica (0,08%) a 4°C. Posteriormente, os segmentos foram dissecados sob estereomicroscópio, através da remoção da túnica mucosa e tela submucosa, obtendo-se para cada animal dois preparados totais da túnica muscular. Um preparado foi utilizado para a técnica imunohistoquímica para o CGRP e o outro para o VIP.

Os preparados de membrana foram inicialmente lavados por três vezes com PBS 0,1M + Triton 0,3% por 5 minutos, incubados em solução de bloqueio de soro de cabra 10% por 2 horas. Em seguida foram incubados em solução contendo anticorpo primário anti-CGRP (1:200, Península labs, EUA) e /ou VIP (1:200, Península Labs, EUA) permanecendo em temperatura ambiente por 24 horas. Depois deste período os preparados foram lavados três vezes em PBS 0,1M por 5 minutos e incubados com o anticorpo secundário (*anti-rabbit* conjugado a fluoresceína, Península Labs, USA) 1:200 a temperatura ambiente protegidos da luz durante 2 horas. A seguir estes foram lavados três vezes em PBS 0,1M por 5 minutos, e montados em lâminas com glicerol tamponado (9:1) e armazenados na geladeira. O controle negativo foi realizado com a omissão do anticorpo primário.

2.4. *Análise das varicosidades dos neurônios CGRP-IR e VIP-IR*

As imagens das fibras nervosas imunoreativas ao CGRP-IR e VIP-IR foram capturadas por câmera de alta resolução AxioCam (Zeiss, Jena, Alemanha) acoplada ao

microscópio de luz Axioskop Plus (Zeiss), transferidas para microcomputador por meio do programa AxioVision 4 versão 4.1 e gravadas em pen drive.

Em cada preparado foram capturados 10 campos microscópicos, obtidos por amostragem, obtendo um total de 300 imagens em todo o experimento.

Através do programa de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) foi mensurada a área (μm^2) de 400 varicosidades em cada animal estudado, perfazendo um total de 2400 varicosidades por grupo.

2.5. Imunolocalização da miosina V neuronal: estudo da população geral de neurônios mioentéricos

Os ratos foram perfundidos com solução salina 1,1% gelada, seguida de solução fixadora contendo periodato de sódio (10mM), lisina (75mM) e paraformaldeído (1%) em tampão fosfato pH 7,4 (37mM). Imediatamente após a perfusão, o íleo de cada animal foi removido, lavado com solução salina até a remoção completa das fezes, inflado com a mesma solução fixadora e amarrado nas extremidades com linha de algodão. Após este procedimento, os segmentos intestinais foram mantidos no fixador por uma hora, sendo na seqüência desidratados em álcool (50%, 70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e reidratados em série descendente de álcoois (100%, 95%, 90%, 80% e 70%). Os íleos foram dissecados sob estereomicroscópio com trans-illuminação para a obtenção de preparados totais da túnica muscular, através da remoção das telas mucosa e submucosa. Os preparados de membrana obtidos foram submetidos à técnica para localização dos neurônios mioentéricos miosina V imunoreativos, como descrito a seguir.

Os preparados foram lavados quatro vezes em PBS (0,1M) pH 7,4 e bloqueados por uma hora e meia em solução contendo albumina soro bovina (BSA; Sigma) (2%), soro de cabra (1:50), Triton X-100 (Sigma) (0,5%) e PBS. Sequencialmente, foram incubados em temperatura ambiente em solução contendo o anticorpo primário anti-miosina V cauda medial purificado. Após quarenta e oito horas, foram lavados duas vezes em solução de PBS e Triton X-100 (0,1%), e duas vezes em solução de PBS acrescida de Tween-20 (0,05%). A seguir, os tecidos foram incubados em anticorpo secundário, por vinte e quatro horas em temperatura ambiente. Por último, foram lavados quatro vezes com PBS acrescido de Tween-20 (0,05%). A imunorreação foi revelada com diaminobenzidina (DAB; Sigma) e as amostras foram montadas em meio de glicerol-gel. O controle negativo foi realizado com a omissão do anticorpo primário.

2.6. Análise quantitativa dos neurônios mioentéricos miosina V imunoreativos

A quantificação dos neurônios mioentéricos miosina V imunoreativos foi realizada através de imagens obtidas por amostragem da região intermediária (60° - 120°; 240° - 300°) da circunferência do íleo de cada animal, considerando-se 0° como a inserção do mesentério. As imagens foram capturadas por câmera de alta resolução AxioCam (Zeiss, Jena, Alemanha) acoplada ao microscópio de luz Axioskop Plus (Zeiss), transferidas para microcomputador por meio do programa AxioVision 4 versão 4.1 e gravadas em pen drive. O software de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) foi utilizado para a realização da quantificação neuronal nas imagens gravadas em pen drive. Para cada animal foram quantificados os neurônios de dez gânglios do plexo mioentérico.

2.7. *Análise morfométrica dos neurônios mioentéricos miosina V imunoreativos*

A mensuração das áreas dos corpos celulares dos neurônios mioentéricos miosina V imunoreativos foi realizada nas mesmas imagens, capturadas em objetiva de 20X, utilizadas para a análise quantitativa. Através do Image-Pro Plus foram mensuradas as áreas em μm^2 de 100 corpos celulares de neurônios para cada animal estudado, totalizando 500 por grupo.

2.8. *Análise Estatística*

Os resultados obtidos foram submetidos às análises estatísticas através dos programas Statistica e GraphPad Prism. Foi realizado o delineamento em blocos dos dados morfométricos, seguido de Teste de Tukey. Para os demais resultados, foi realizada análise de variância One-way ANOVA, seguida de Tukey. O nível de significância usado foi de 5%. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão.

3. Resultados

Os dados na Tabela 1 indicam valores médios do peso corporal inicial, peso corporal final e o comprimento nasal-caudal dos ratos de todos os grupos estudados. O peso inicial médio de todos os grupos estudados foi de $328,5 \pm 13,6$ g. Nos animais envelhecidos sem suplementação, grupos E345 e E428, houve um aumento de peso na proporção 41,24 % e 59,2% respectivamente, quando comparados com a média de peso inicial ($p < 0,05$). O envelhecimento após um período de 83 dias promoveu um

incremento de peso corporal em 12,12% entre os grupos E345 e E428 ($p < 0,05$). A suplementação com ácido ascórbico nos grupos EA345 e EA428 não alterou o peso corporal quando comparados aos seus controles ($p > 0,05$).

O comprimento nasal-caudal aumentou nos grupos E345 e E428 em relação ao grupo E90 ($p < 0,05$). Os grupos suplementados (EA345 e EA428) apresentaram comprimento nasal-caudal semelhante ao grupo de animal jovem (E90) ($p > 0,05$). O consumo médio de ácido ascórbico ingerido durante o experimento pelos animais dos grupos EA345 e EA428 foi de $39,98 \pm 1,456$ e $41,7 \pm 1,362$ mg/L/dia.

Os resultados quantitativos mostraram que o envelhecimento promoveu uma redução do número de neurônios miosina V em relação aos animais jovens (E90) ($p < 0,05$) (Figura 01). A suplementação com ácido ascórbico não atuou na recuperação da perda neuronal ($p > 0,05$).

As fotomicrografias mostrando os neurônios miontéricos imunoreativos à miosina V, VIP e CGRP estão evidenciadas nas figuras 2, 3 e 4 respectivamente.

A condição de envelhecimento não alterou o tamanho da área dos neurônios miosina V imunoreativos ($p > 0,05$). A suplementação com ácido ascórbico nos grupos EA345 e EA428 promoveu um aumento da área média em 24,6% e 24,1% quando comparados aos grupos E345 e E428 respectivamente ($p < 0,05$) (Tabela 2). O aumento da área nos grupos EA345 e EA428 também foram observados através do deslocamento para a direita da curva de frequência relativa (Figura 2F).

A área das varicosidades (μm^2) de fibras nervosas que expressam para CGRP e VIP está demonstrada na Tabela 2. Quando todos os grupos foram comparados entre si, observamos diferenças significativas ($p < 0,05$) para os dois neurotransmissores. Nos grupos E345 e E428 houve uma redução no tamanho da área das varicosidades das fibras nervosas dos neurônios CGRP imunoreativos em relação ao grupo jovem (E90).

Nos neurônios VIP imunoreativos houve uma redução inicial do tamanho das varicosidades no grupo E345 e posteriormente o tamanho das áreas foram recuperadas no grupo E428 apresentando valores superiores aos dos animais jovens.

O tratamento com ácido ascórbico (EA345 e EA428) promoveu um aumento da área das varicosidades dos neurônios CGRP e VIP imunoreativos em relação aos grupos E345 e E428, também observados através do deslocamento para a direita da curva de frequência relativa (Figura 3F e 4F).

4. Discussão

Neste estudo quando foi comparado o peso corporal dos animais envelhecidos (E345 e E428) com o de animais jovens, foi verificado um aumento significativo neste parâmetro, constatado também pela análise do comprimento nasal-caudal, os quais podem ser justificados pelo crescimento normal do animal. Segundo Phillips e Powley (2001) o peso do corpo varia com a idade, no entanto, os animais mantêm o ganho de peso até aproximadamente 21 meses de idade, depois disso eles perdem peso muito rápido. O tratamento com ácido ascórbico não influenciou no ganho de peso dos animais.

O método escolhido para a determinação do número dos neurônios mioentéricos foi a quantificação de neurônios por gânglio. Desta maneira não houve a necessidade de utilizar fator de correção da densidade neuronal, uma vez que o intestino aumenta de tamanho com o decorrer da idade, e o resultado obtido poderia ser consequência da diluição neuronal e não da morte dos mesmos em consequência do envelhecimento.

A técnica utilizada para a evidência da população geral de neurônios mioentéricos foi a miosina V. Esta é uma proteína motora encontrada nos corpos

celulares e prolongamentos dos neurônios (Drengk et al., 2000), estando presente especificamente no citoplasma neuronal, o que confere especificidade à técnica, permitindo a visualização dos corpos celulares e de suas projeções (Drengk et al., 2000; Zanoni et al., 2003).

Quando foi analisada a densidade neuronal foi verificada uma redução gradativa do número de neurônios mioentéricos no decorrer do envelhecimento, sendo significativa para os animais do grupo E428. O envelhecimento é uma patologia que promove alterações no SNE, em especial, afetando os neurônios do plexo mioentérico. Na literatura consultada há vários trabalhos relatando a redução do número de neurônios em consequência da idade em ratos, cobaias e camundongos (Santer, 1994; Johnson et al., 1998; Schafer et al., 1999; Wade, 2002; Phillips et al., 2003; Schoffen et al., 2005), e no tubo digestório de humanos (Meciano Filho et al., 1995; Gomes et al., 1997). Santer e Baker (1988) estudaram o intestino delgado e grosso de ratos com 6 e 24 meses e verificaram uma perda neuronal de 40% no jejuno, 43% no íleo, 64% no colo e 42% no reto em ratos idosos. Os autores ressaltaram que esta perda seria acompanhada de uma concomitante reorganização dos elementos restantes, e por esta razão não poderia ser considerada um processo degenerativo, já que os elementos ganglionares remanescentes teriam sua eficiência aumentada. Em consequência da redução da densidade neuronal são observadas alterações na função da mucosa e/ou na motilidade do trato gastrointestinal podendo gerar distúrbios que, dependendo da região afetada, incluem disfagia, desordens de refluxo gastroesofágico, dores abdominais, diarreia, constipação e incontinência fecal (Wade; Cowen, 2004).

A morte neuronal em decorrência do envelhecimento também tem sido atribuída à grande quantidade de oxidantes produzidos em detrimento da queda dos agentes antioxidantes em virtude da idade. O envelhecimento ocorre na maioria dos casos

devido a reações, tais como exposição das células e de suas organelas a radiações ionizantes, reações não-enzimáticas e também de reações enzimáticas que proporcionam a redução de O₂ e de água, com conseqüente produção de radicais livres (Caldeira et al., 1989). Os neurônios mioentéricos são bastante susceptíveis aos radicais livres que são eletronicamente instáveis e altamente reativos e são produzidos em condições de envelhecimento. Estes radicais podem se ligar a estruturas celulares como lipídios de membrana e nucleotídeos de DNA (Schneider et al., 2007). A sua elevada concentração em situações de isquemia/reperfusão e hiperoxia criam mutações no DNA mitocondrial o que vai acelerar a produção de mais radicais livres criando um ciclo vicioso de mais mutações que levam à catástrofe celular, senescência e falência de múltiplos órgãos. O acúmulo de mutações genéticas nas células somáticas é a causa específica da senescência celular (Fortunato; Pinheiro, 2007). Muller et al. (2007) relataram que o estado crônico de estresse oxidativo existe em células aeróbicas mesmo sob condições fisiológicas normais devido ao desequilíbrio entre oxidantes e pró-oxidantes. O estresse oxidativo é um aumento não somente pela elevada produção de espécies reativas de oxigênio, mas pode ser também pela acentuada diminuição da eficiência do sistema de defesa enzimática nas células (glutathione peróxidase, catalase, superóxido dismutase, e outras) (Finkel; Holbrook, 2000).

Foi utilizado neste estudo como agente antioxidante o ácido ascórbico, uma vitamina hidrossolúvel que apresenta efeito comprovado na neutralização de radicais livres, assim como as vitaminas A e E (Caldeira et al., 1989; Deplabos; González, 2000). Nos animais em envelhecimento suplementados com ácido ascórbico (EA345 e EA428) houve uma tendência à preservação do número de neurônios, pois foi observado uma proporção superior de 14,34 % e 13,8 % comparados aos animais da mesma idade sem suplementação. Nosso grupo de pesquisa anteriormente realizou um

estudo com neurônios mioentéricos do íleo de ratos após 120 dias de suplementação com ácido ascórbico e a preservação foi de 18 % (Zanoni et al., 2005). Embora não tenha sido significativa a preservação do número de neurônios consideramos positivo este resultado, pois o aumento do número de neurônios por gânglio foi acompanhado por um aumento da área do corpo celular dos neurônios miosina V imunoreativos dos grupos EA345 e EA428 comparado aos seus controles. Estes dois dados associados (número e tamanho neuronal) sugerem uma atividade neuroprotetora e neurotrófica para o ácido ascórbico.

Neste trabalho utilizamos a técnica imunohistoquímica para evidenciação dos neurônios e suas fibras nervosas que expressam para o neurotransmissor VIP e também o CGRP. As camadas musculares apresentam uma grande densidade de fibras nervosas VIP-IR, sugere-se que estas fibras são neurônios motores com um papel importante no controle da atividade do músculo liso gastrointestinal. Foi analisado neste trabalho a área de varicosidades encontradas nas fibras nervosas, estas varicosidades são pequenas dilatações observadas ao longo da fibra nervosa. Existem escassos dados na literatura que relatam o efeito do envelhecimento sobre os neurônios VIP-IR do plexo mioentérico de ratos Wistar associados ao tratamento com antioxidantes. Foi verificado uma redução do tamanho das varicosidades dos neurônios VIP-IR nos animais do grupo E345 em relação aos animais jovens, entretanto não podemos inferir que esta redução da expressão do VIP são resultantes de morte neuronal desta sub população, pois a metodologia empregada não permite obter a densidade neuronal. Uma hipótese seria de que a redução de fatores neurotróficos derivados de algumas células levariam à vulnerabilidade dos neurônios entéricos (Giaroni et al., 1999) como aqueles que expressam para o VIP, e devido à plasticidade neural, estes neurônios poderiam recuperar a sua expressão ao longo do tempo. Esta hipótese é reforçada pelo fato dos

animais E428 possuem áreas maiores de varicosidades que os animais do grupo E345. Após o período de 83 dias poderia ocorrer também um aumento na maquinaria de síntese, pois de acordo com experimentos realizados por Kasperek et al. (2009) no jejuno de ratos Lewis em processo de envelhecimento houve um aumento da liberação de VIP durante experimentos com estimulação elétrica, sendo um indicativo de incremento de síntese.

A suplementação com ácido ascórbico promoveu um aumento do tamanho das varicosidades VIP-IR nos animais dos grupos EA345 e EA428 em relação aos seus controles. O aumento de tamanho das varicosidades pode estar relacionado a uma maior síntese e/ou liberação e pode ser considerado positivo, pois além do papel do VIP como neurotransmissor, trabalhos recentes têm aventado a importância do VIP na neuroproteção de neurônios centrais e entéricos e sua atuação como potente peptídeo antiinflamatório. Fato este, que é comprovado pela presença de fibras nervosas VIP-IR associadas às células do sistema imune da mucosa, participando do controle da imunidade da mucosa do TGI (Brenneman et al., 2003). Zaroni e Freitas (2005) encontraram resultados similares em ratos com 120 dias de suplementação com ácido ascórbico em neurônios VIP-IR do plexo submucoso.

Ao serem estudadas as varicosidades das fibras nervosas imunomarcadas pelo CGRP foi observada uma redução do tamanho em 11,9 % no grupo E345 e 18,9 % no grupo E428 em relação ao grupo de animais jovens (E90). O CGRP é um neuropeptídeo que apresenta um importante papel em muitas funções do SNE de espécies de vertebrados, as quais podem ser elencadas como: regulação da contratilidade da musculatura lisa do trato gastrointestinal (Rasmussen et al., 1992; Grider, 1994), funções sensoriais (Rasmussen et al., 2001), microcirculação intestinal (Kawasaki, 2002) e secreção (Tache, 1992). Recentemente Mitsui (2009) relatou um importante

papel do CGRP expresso por neurônios mioentéricos de porquinhos da índia, na facilitação na liberação de serotonina (5-HT) pelas células enterocromafins presentes na mucosa intestinal em reflexos aferentes primários. Pouco é relatado na literatura consultada sobre outros fenótipos de inervação entérica durante o envelhecimento, incluindo o CGRP, mas possivelmente a redução na sua quantidade evidenciada pela redução do tamanho das varicosidades, promova alterações na homeostasia intestinal. O aumento na produção de outros neurotransmissores inibitórios como o VIP e o óxido nítrico (NO) pode ser uma ação compensatória à redução da expressão do CGRP.

A suplementação com ácido ascórbico aumentou o tamanho das varicosidades das fibras nervosas dos neurônios CGRP imunoreativos em 7,8 % no grupo EA345 e 25% no grupo EA428. Acreditamos que o ácido ascórbico apresentou um efeito neuroprotetor sobre estes neurônios, pois as varicosidades observadas no grupo EA345 foram similares ao observado nos animais jovens e ao do grupo EA428 apresentaram tamanho superior aos do grupo E90.

Nossos resultados permitiram concluir que o envelhecimento promoveu uma redução do número de neurônios miosina V imunoreativos e alterou o tamanho das varicosidades dos neurônios VIP-IR e CGRP-IR. A suplementação com ácido ascórbico apresentou um efeito neurotrófico sobre todos os neurônios estudados, sugerindo um papel neuroprotetor.

REFERÊNCIAS

- Benkovic, S. A.; Connor, J. R., 1993. Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J. Comp. Neurol.* 338, pp.97-119.
- Brehmer, A., 2006. *Structure of Enteric Neurons*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp.5 – 106.
- Brenneman, D.E. et al., 2003. Complex array of cytokines released by vasoactive intestinal peptide. *Neuropeptides*. 37, pp. 111–9.
- Caldeira, A. M. L. et al., 1989. As bases biológicas do envelhecimento. *Rev. Fol. Miserad.* 99, pp. 107-118.
- Deplabos, B. G.; González, A. E., 2000. Envejecimiento vs. radicales libres. *Rev. Fac. Farm.* 38, pp. 20-26.
- Drengk, A.C. et al., 2000. Immunolocalisation of myosin-V in the enteric nervous system of the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 78, pp. 109-112.
- Finkel, T., Holbrook, N. J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Insight review articles.* 408, pp. 239-246.
- Fortunato, J.S; Pinheiro, M. J.P., 2007. Envelhecimento. In: PINTO, A. M. *Fisiopatologia: Fundamentos e Aplicação*. Lisboa: Lidel.
- Giaroni, C. et al., 1999. Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterol.* 117, pp. 1438-1458.
- Gomes, O.A. et al., 1997. A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. *Gerontol.* 43, pp. 210–217.
- Grider, J.R., 1994. CGRP as a transmitter in the sensory pathway mediating peristaltic reflex. *Am. J. Physiol.* 266, pp. 1139–1145.

- Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59, pp. 1609-1623.
- Hays, N.P, Roberts, S.B., 2006. The anorexia of aging in humans. *Physiol. Behav.* 88, pp. 257–266.
- Johnson, R. J. R. M. et al., 1998: The effects of age on the overall population and on subpopulations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J. Anat.* 192, pp. 470–488.
- Jost, W.H., 1997. Gastrointestinal motility problems in patients with Parkinson's disease. Effects of antiparkinsonian treatment and guidelines for management. *Drugs Aging.* 10, pp. 249–258.
- Kasperek, M.S. et al., 2009. Age-related changes in functional NANC innervation with VIP and substance P in the jejunum of Lewis rats. *Auton. Neurosci.* 3, pp. 127-34.
- Kawasaki, H. 2002 Regulation of vascular function by perivascular calcitonin gene-related peptide-containing nerves. *Jpn. J. Pharmacol.* 88, pp. 39–43.
- Kuyvenhoven, J.P.; Meinders, A.E. 1999. Oxidative stress and diabetes mellitus – Pathogenesis of long-term complications. *Eur. J. Intern. Med.* 10, pp. 9-19.
- Lomax, A. E. et al., 2005. Plasticity of the enteric nervous system during inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 17, pp. 4-15.
- Majumdar, A. P. et al., 1997. Effect of aging on the gastrointestinal tract and the pancreas. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 215, pp. 134-144.
- Meciano Filho, J. et al., 1995. Nerve cell loss in the myenteric plexus of the human esophagus in relation to age: a preliminary investigation. *Gerontol.* 41, pp. 18–21.
- Micieli, G. et al., 2003. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurol. Sci.* 24, pp. 32-34.

- Mitsui, R. 2009. Characterisation of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of rat colon. *Cell. Tissue Res.* 337, pp. 37–43.
- Muller, F. L. et al., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* 43, pp. 477–503.
- Norton, C., 2006. Constipation in older patients: effects on quality of life. *Br. J. Nurs.* 15, pp. 188–192.
- O'Donnell, E.; Lynch, M. A., 1998. Dietary antioxidant supplementation reverses age-related neuronal changes. *Neurobiol. Aging.* 19, pp. 461-467.
- O'Mahony, D. et al., 2002. Aging and intestinal motility: a review of factors that affect intestinal motility in the aged. *Drugs Aging.* 19, pp. 515–527.
- Phillips, R.J.; Powley, T.L., 2001. As the gut ages: timetables of aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J. Comp. Neurol.* 434, pp. 358-377.
- Phillips, R. J. et al., 2003. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. *Autonom. Neurosc. Basic. & Clinical.* 106, pp. 69– 83
- Phillips, R.J., Powley, T.L., 2007. Inervation of the gastrointestinal tract: Patterns of aging. *Autonom. Neurosc. Basic & clinical.*
- Rasmussen, T.N. et al., 1992. Calcitonin gene-related peptide: Effect on contractile activity and luminal cross-sectional area in the isolated, perfused porcine ileum. *Scand. J. Gastroenterol.* 27, pp. 787-792.
- Rasmussen, T.N. et al., 2001. Effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on motility and on the release of substance P, neurokinin A, somatostatin and gastrin in the isolated perfused porcine antrum. *Neurogastroenterol. Mot.* 13, pp. 353-359.
- Rice-Evans, C.; Burdon, R., 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid. Res.* 32, pp. 71-110.

Saffrey, M. J., 2004. Ageing of the enteric nervous system. *Mechanisms of Ageing and Development*. 125, pp. 899-906.

Santer, R. M.; D. M. Baker, 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, pp. 59-67.

Santer, R.M., 1994. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 49, pp. 115-121.

Schafer, K.H. et al., 1999. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *Anat. Rec.* 256, pp. 20-28.

Schneider, L. C. et al., 2007. Evaluation of the ginkgo biloba extract (EGb 761) on the myenteric plexus of the small intestine of Wistar rats. *J. Gastroenterol.* 42, pp. 624-630.

Schoffen, J.P. et al., 2005. Effects of hypoproteic diet on myosin-V immunostained myenteric neurons and the proximal colon wall of aging rats. *Auton. Neurosc.* 12, pp. 77-83.

Tache, Y. 1992. Inhibition of gastric acid secretion and ulcers by calcitonin gene-related peptide. *Ann. NY. Acad. Sci.* 657, pp. 240-247.

Talley, N.J. et al., 1992. Prevalence of gastrointestinal symptoms in the elderly: a population-based study. *Gastroenterol.* 102, pp. 895-901.

Vinik, A. I. et al., 2003. Diabetic autonomic neuropathy. *Semin. Neurol.* 23, pp. 365-372.

Wade, P.R., 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, pp. 489-495.

Wade, P.R., Cowen, T., 2004. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. *Neurogastroenterol. Motil.* 16, pp. 19-23.

Zanoni, J.N. et al., 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, pp. 32-38.

Zanoni, J. N.; Freitas, P., 2005. Effects of ascorbic acid on the vasoactive intestinal peptide synthesis in the ileum submucous plexus of normal rats. *Arq. Gastroenterol.* 42, pp. 186-191.

Tabela 1. Peso inicial (PI), Peso final (PF) e Comprimento nasal-caudal pertencentes aos grupos de ratos jovens (E90), ratos envelhecidos sem suplementação (E345 e E428) e ratos envelhecidos suplementados com ácido ascórbico (EA345 e EA428). n= 6 animais por grupo.

	PI (g)	PF (g)	CNC (cm)
E90	-	367.7 ± 6.8 ^a	42.83 ± 0.3 ^{a,b}
E345	314.3 ± 10.6 ^a	464.0 ± 11.3 ^{b,c}	45.50 ± 0.6 ^{a,c}
EA345	336,1 ± 14.1 ^a	490.7 ± 13.5 ^b	45.58 ± 1.0 ^a
E428	335.5 ± 17.4 ^a	523.0 ± 15.6 ^{b,d}	45.75 ± 0.5 ^{a,c}
EA428	328.1 ± 12.3 ^a	497.9 ± 21.5 ^b	45.33 ± 0.7 ^a

Letras diferentes na mesma coluna p < 0,05.

Tabela 2. Área do corpo celular dos neurônios mioentéricos miosina V imunoreativos (μm^2) e área das varicosidades (μm^2) de fibras nervosas que expressam para CGRP e VIP nos grupos de ratos jovens (E90), ratos envelhecidos sem suplementação (E345 e E428) e ratos envelhecidos suplementados com ácido ascórbico (EA345 e EA428). n= 6 animais por grupo.

	E90	E345	EA345	E428	EA428
Miosina V	202.4 ± 3.5^a	192.1 ± 4.3^a	255.0 ± 2.63^b	201.6 ± 3.5^a	265.5 ± 2.97^b
CGRP	3.77 ± 0.02^a	3.37 ± 0.02^b	3.65 ± 0.02^c	3.17 ± 0.02^d	4.23 ± 0.02^e
VIP	3.82 ± 0.02^a	3.72 ± 0.02^b	5.24 ± 0.03^c	4.01 ± 0.02^d	4.57 ± 0.02^e

Letras diferentes na mesma linha $p < 0,05$.

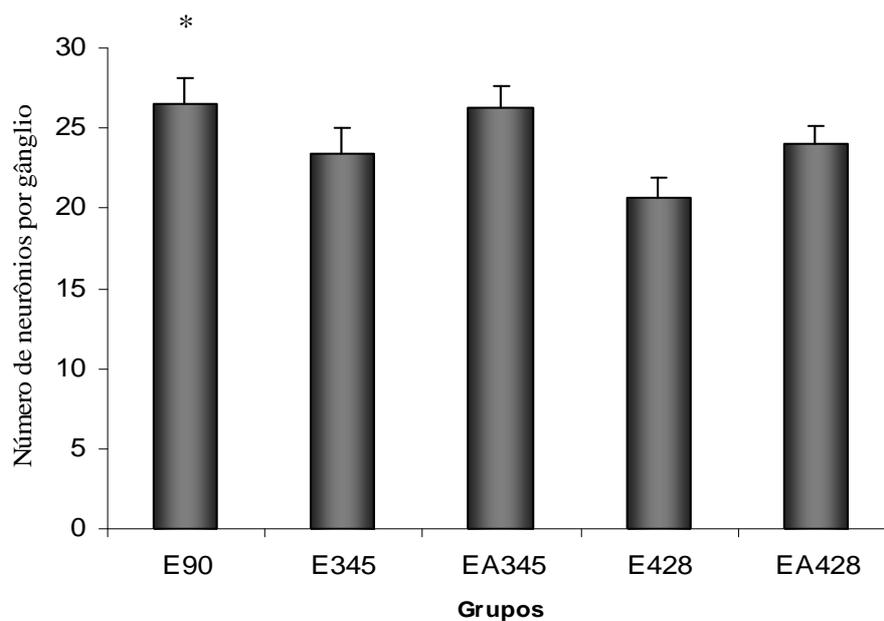


Figura. 1. Número de neurônios mioentéricos miosina V imunoreativos por gânglio em objetiva de 20X na região intermediária do íleo pertencentes aos grupos de ratos jovens (E90), ratos envelhecidos sem suplementação (E345 e E428) e ratos envelhecidos suplementados com ácido ascórbico (EA345 e EA428). n= 5 para cada grupo analisado. * $p < 0.05$ quando comparado com o grupo E428

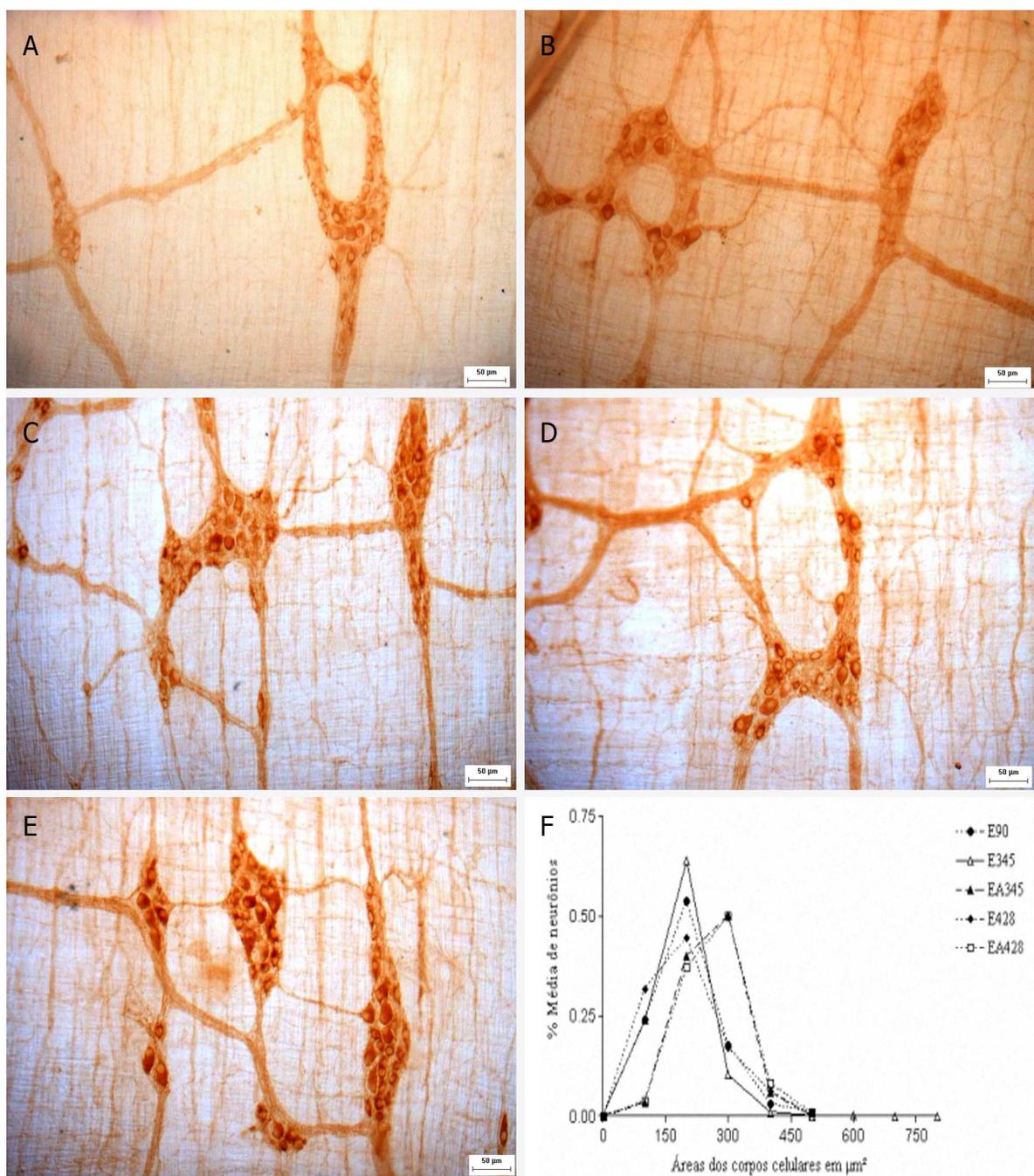


Figura. 2. Neurônios imunoreativos a miosina V (A, B, C, D, E) da região intermediária do íleo dos ratos dos grupos: (A) E90 - jovens; (B) E345 - envelhecidos com 345 dias de idade; (C) EA345 - envelhecidos com 345 dias de idade suplementados com ácido ascórbico; (D) E428 - envelhecidos com 428 dias de idade; (E) EA428 - envelhecidos com 428 dias de idade suplementados com ácido ascórbico e distribuição de freqüências relativas do perfil celular dos neurônios mioentéricos miosina V imunoreativos do íleo dos animais (F). Barra de calibração: 50µm.

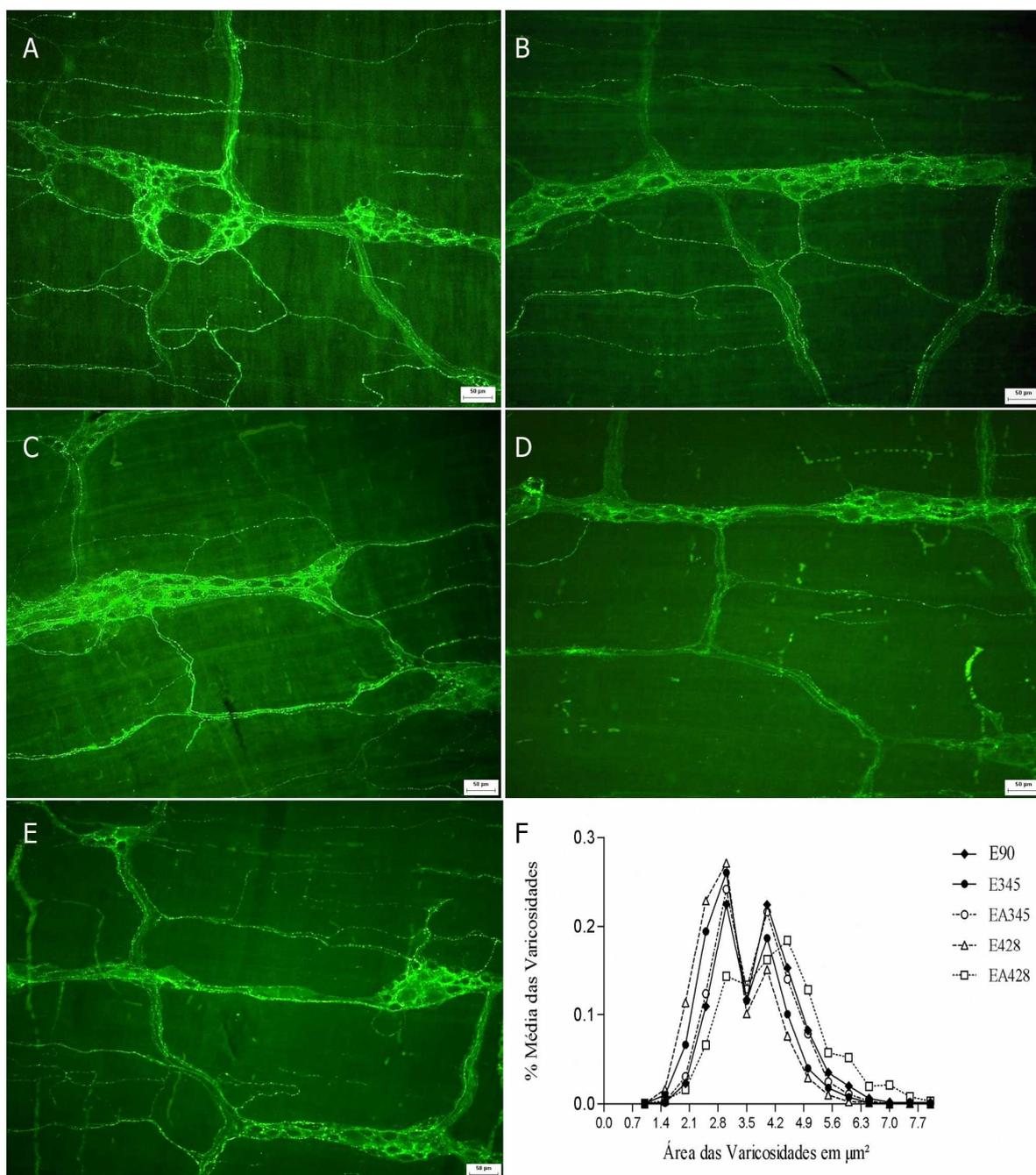


Figura 3. Fotomicrografia das varicosidades do plexo mioentérico do íleo de ratos jovens e em envelhecimento, com imunoreatividade ao CGRP pertencentes aos grupos: (A) E90 - jovens; (B) E345 - envelhecidos com 345 dias de idade; (C) EA345 – envelhecidos com 345 dias de idade suplementados com ácido ascórbico; (D) E428 - envelhecidos com 428 dias de idade; (E) EA428 – envelhecidos com 428 dias de idade suplementados com ácido ascórbico e distribuição de freqüências relativas às varicosidades dos neurônios mioentéricos CGRP do íleo dos animais (F). Barra de calibração: 50 μm .

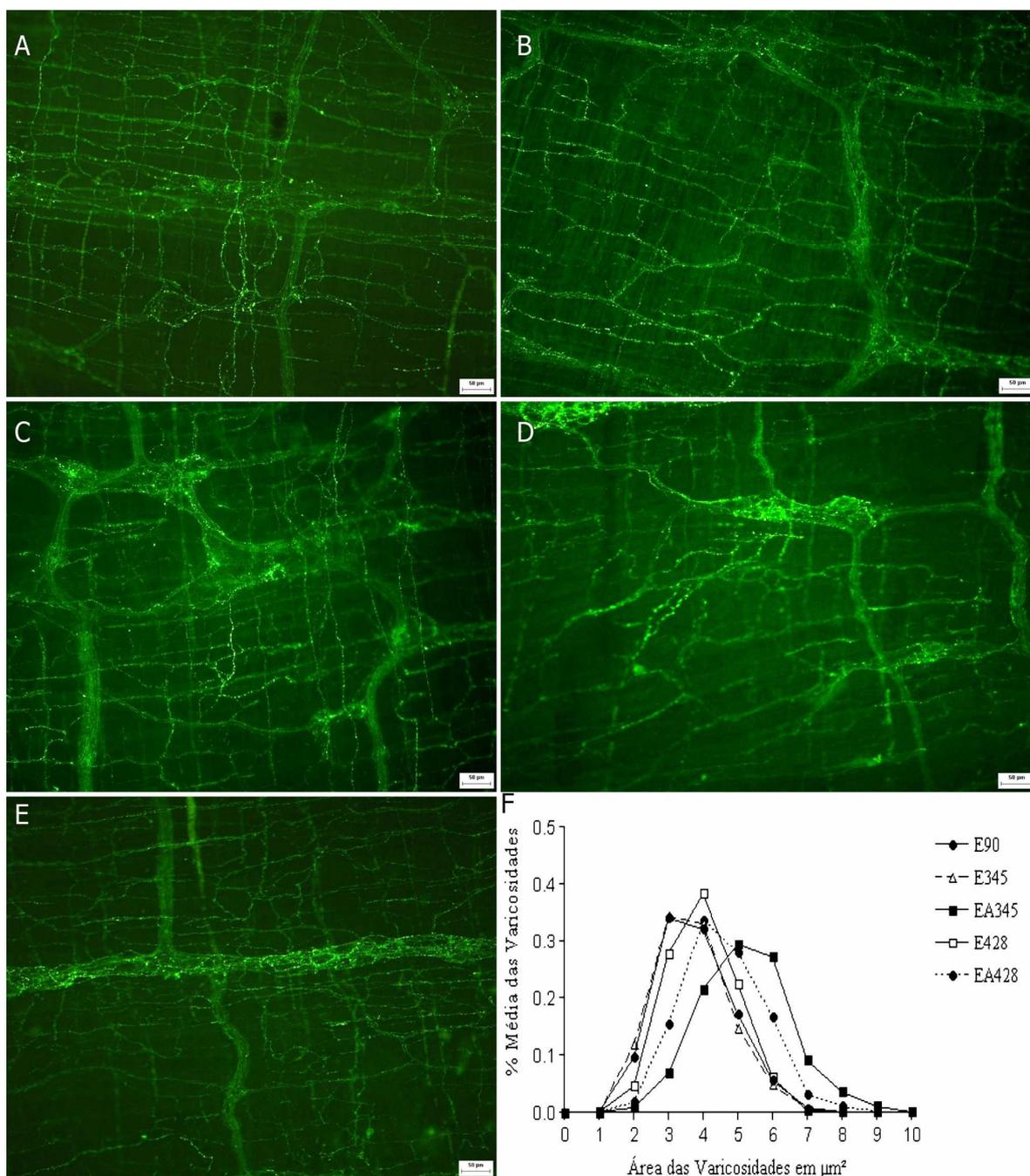


Figura 4. Fotomicrografia das varicosidades do plexo mioentérico do íleo de ratos jovens e em envelhecimento, com imunoreatividade ao VIP pertencentes aos grupos: (A) E90 - jovens; (B) E345 - envelhecidos com 345 dias de idade; (C) EA345 – envelhecidos com 345 dias de idade suplementados com ácido ascórbico; (D) E428 - envelhecidos com 428 dias de idade; (E) EA428 - envelhecidos com 428 dias de idade suplementados com ácido ascórbico e distribuição de freqüências relativas às varicosidades dos neurônios mioentéricos VIP do íleo dos animais (F). Barra de calibração: 50μm.

Age-related changes in myosin-V myenteric neurons, calcitonin gene-related peptide immunoreactivity, and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in the ileum of rats supplemented with ascorbic acid

Ana Paula Tonon Veit¹, Jacqueline Nelisis Zanoni^{1*}

¹Departament of Morphological Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, nº 5790 Bloco H-79 – CEP 87020-900, Maringá, PR, Brazil.

Running title: Ascorbic acid and aging

*Corresponding author. Phone: +55 44 30114705; Fax: +55 44 30114340; E-mail:

jnzanoni@uem.br

Abstract

Objective. To investigate the effects of ascorbic acid supplementation on myosin-V-, calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, and vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-immunoreactive myenteric neurons in aging rats. **Methods.** Eighty-five male rats, 90 days old, were divided into two groups: young 90-day-old rats (E90), 345-day-old control rats (E345), 428-day-old control rats (E428), 90- to 345-day-old rats treated with ascorbic acid (EA345), and 90- to 428-day-old rats treated with ascorbic acid (EA428). Ascorbic acid supplementation was conducted for 255 days (EA345 group) and 338 days (EA428 group) by adding it to the animals' water daily (1 g/l) in bottles painted black. The solution was offered *ad libitum*. The ileum was then subjected to myosin-V and neuronal nitric oxide synthase immunohistochemistry. Images were captured with a 20× objective. The varicosity of neurons that express CGRP and VIP was measured in 400 areas (μm^2) in each animal (2400/group). Ten images of myosin neurons were quantified per animal. Morphometry was performed by measuring neuron cell bodies (500/group). **Results.** Aging reduced the number of myosin V-immunoreactive neurons and changed the size of VIP-IR and CGRP-IR neuron varicosities. Ascorbic acid supplementation had a neurotrophic effect on all neurons studied, suggesting a neuroprotective role.

Keywords: aging, ascorbic acid, myenteric neurons, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide, myosin V

1. Introduction

The enteric nervous system (ENS) is located in the layers that form the wall of the gastrointestinal tract and functions independently of the central nervous system (CNS) (Brehmer, 2006). Enteric neurons are heterogeneous with regard to their physiological roles and neurotransmitters (Saffrey, 2004). Chemical, histochemical, immunohistochemical, and physiological studies have confirmed the morphological diversity of the ENS. Nerve cells can express various neurotransmitters in the intestine, such as acetylcholine and epinephrine/norepinephrine. ENS nerve cells may undergo structural or functional changes as a result of adaptive responses to different stimuli in an attempt to maintain homeostasis of intestinal function (Giarona et al., 1999; Lomax et al., 2005). Some pathological conditions also involve changes in enteric neurons and other autonomic neurons, including bowel disease (e.g., ulcerative colitis or Crohn's disease), extraintestinal disease (e.g., Parkinson's disease), and enteric neuropathy (Giarona et al. 1999; Micieli et al., 2003; Vinik et al., 2003). The aging process can also induce such changes (Schneider et al., 2007).

Aging is associated with a variety of gastrointestinal disorders (Talley et al., 1992; Majumdar et al., 1997). For example, advancing age is associated with an increased incidence of problems related to motility, including delayed gastric emptying and increased intestinal transit time associated with fecal stasis (Jost, 1997; O'Mahony et al., 2002; Hays and Roberts, 2006; Norton, 2006). These gastrointestinal problems related to aging may significantly impact the well-being of aging individuals. The causes of gastrointestinal disorders in the elderly are not clear, but the symptoms suggest an underlying etiology involving a loss or distortion of functional neural mechanisms of the intestine that normally contribute to gastrointestinal function and health.

Several gastrointestinal diseases are associated with aging (Talley et al., 1992; Majumdar et al., 1997), resulting in impaired function of the mucosa or motility of the TGI, which can lead to dysphagia, gastroesophageal reflux disorders, difficulty in relaxing gastric fundus during food intake, atrophic gastritis, delays in the digestive period, intestinal diverticula, diarrhea, and fecal incontinence, depending on the affected area (Wade and Cowen, 2004; Phillips and Powley, 2007).

The main factor associated with neuronal death is the generation of free radicals. Nervous tissue has high oxygen consumption (Halliwell, 1992; Kuyvenhoven and Meinders, 1999). Reactive oxygen species, generated mainly in mitochondria during the cellular respiration process, have unpaired electrons, rendering them highly reactive to other biological substances (Kuyvenhoven and Meinders, 1999).

Drugs that reduce oxidative stress, such as ascorbic acid, may play a significant role in the treatment of intestinal complications caused by aging. Ascorbic acid can prevent the reduction in the number of myenteric neurons resulting from the action of free radicals (Zanoni and Freitas, 2005). Antioxidants maintain internal balance in the body, prevent the formation of free radicals, neutralize species that have already formed, and undergo a reduction during the aging process, further promoting the occurrence of oxidative stress (Kuyvenhoven and Meinders, 1999). The modest level of antioxidants associated with increased iron concentration (Benkovic and Connor, 1993) and polyunsaturated fatty acids (Rice-Evans and Burdon, 1993) render the neural tissue more susceptible to reactive oxygen species.

Ascorbic acid is a water-soluble vitamin that has shown antioxidant effects in neutralizing free radicals, as well as vitamins A and E (Caldeira et al. 1989; Deplabos and González, 2000). O'Donnell and Lynch (1998) reported a significant decrease in ascorbic acid concentration in the cerebral cortex in aged rats. Thus, ascorbic acid may

also be used to prevent the occurrence of intestinal complications caused by aging because it prevents the decrease in the number of myenteric neurons resulting from the action of free radicals.

The objective of the present study was to investigate the general population of myenteric neurons (myosin-V-immunoreactive) and subpopulations of inhibitory neurons (i.e., calcitonin gene-related peptide-immunoreactive [CGRP-IR] and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive [VIP-IR]) in aged rats receiving ascorbic acid supplementation.

2. Materials and Methods

2.1. Study groups

Intestinal segments were obtained from 85 male albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) that were 90 days old and obtained from the Central Biotery of Universidade Estadual de Maringá. All animal procedures were approved by the Committee of Ethics in Animal Experimentation, Universidade Estadual de Maringá (protocol no. 024/2004; approved May 27, 2004). All techniques were in accordance with the ethical principles of the Brazilian Academy of Animal Experimentation.

The animals were weighed and divided into five groups: E90 (90-day-old rats), E345 (345-day-old control rats), E428 (428-day-old control rats), EA345 (90- to 428-day-old rats supplemented with ascorbic acid), and EA428 (90- to 345-day-old rats supplemented with ascorbic acid).

Ascorbic acid supplementation was conducted for 255 days (EA345 group) and 338 days (EA428 group) by adding it to the animals' water daily (1 g/l) in bottles painted black. The solution was offered *ad libitum*. During this period, the rats were

kept in individual cages with lights on from 6:00 h to 18:00 h and constant temperature ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Treatment was always conducted in the afternoon (15:00-18:00 h).

2.2. Material resection and processing

After the experimental period, the animals were sacrificed under thiopental anesthesia (40 mg/kg body weight, i.p.), after which nasal-caudal lengths were obtained. Two hours preceding sacrifice, the animals were injected with vincristina sulfate (0.5 mg/kg) to stabilize the microtubules of the cytoskeleton.

2.3. Myenteric neurons immunoreactive for CGRP and VIP

The ileum was removed, washed with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, tied on one end of the segment, injected with Zamboni fixative, and closed at the other end. The segments were maintained for 18 h in the same solution. The ends were cut, opened on the mesenteric border, dehydrated in an increasing series of alcohol (80, 95, and 100%), clarified in xylol, and rehydrated in a decreasing series of alcohol (100, 95, and 80%). The segments remained in each solution for 30 min and were stored in PBS with the addition of 0.08% sodium azide at 4°C . Subsequently, the segments were dissected under a stereomicroscope by removing the mucosa and submucosa, resulting in two prepared segments for each animal's total muscular layers. Separate preparation techniques were used for CGRP and VIP immunohistochemistry.

The preparations were initially washed three times in 0.1 M PBS Triton X-100 (0.3%) solution for 5 min and incubated in 10% goat serum blocking solution for 2 h. The preparations were then incubated in a solution containing anti-CGRP primary antibody (1:200; Peninsula Labs, USA) or VIP (1:200, Peninsula Labs) at room temperature for 24 h. After this period, the preparations were washed three times in 0.1

M PBS for 5 min and incubated with anti-rabbit conjugated fluoresceína secondary antibody (1:200; Peninsula Labs) at room temperature and protected from light for 2 h. The preparations were then washed three times in 0.1 M PBS for 5 min and mounted in glycerol gel (9:1). A negative control was performed with the omission of the primary antibody.

2.4. Analysis of CGRP-IR and VIP-IR neuron varicosities

The images of CGRP-IR and VI-IR nerve fibers were captured by an AxioCam (Zeiss, Jena, Germany) high resolution camera coupled to an Axioskop Plus (Zeiss) light microscope, digitized on a computer using AxioVision version 4.1 software, and recorded on a flash drive. Ten microscopic fields were captured for each preparation, obtained by sampling, to yield a total of 300 images. The image analysis program Image-Pro Plus version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) was used to measure the area (μm^2) of 400 varicosities in each animal for a total of 2400 varicosities per group.

2.5. Immunolocalization of neuronal myosin V: study of general myenteric neuron population

Another 25 rats were perfused with 1.1% cold saline solution followed by fixative solution containing 10 mM sodium periodate, 75 M lysine, and 1% paraformaldehyde in 37 mM phosphate buffer, pH 7.4. Immediately after perfusion, the ileum from each animal was resected, washed with saline solution until complete removal of feces, carefully inflated with the fixative solution, and tied at the extremities with cotton thread. After this procedure, the intestinal segments were maintained in the fixative solution for 1 h, dehydrated in an increasing series of alcohol (50%, 70%, 80%,

90%, and 100%), clarified in xylol, and rehydrated in a decreasing series of alcohol (100%, 95%, 90%, 80%, and 70%). The ileum was dissected with the aid of a transillumination stereomicroscope to obtain whole-mount muscular layer preparations through the removal of the mucosal and submucosal layers. The whole-mount preparations were subjected to the following technique for detection of myosin-V-immunoreactive myenteric neurons.

The preparations were washed four times in 0.1 M PBS, pH 7.4, and blocked for 1 h in a solution containing 2% bovine serum albumin (BSA; Sigma), goat serum (1:50), 0.5% Triton X-100 (Sigma), and PBS. The preparations were then sequentially incubated at room temperature in a solution containing the primary antibody anti-myosin V medial tail purified (Table 1). After 48 h, the preparations were washed twice in PBS Triton X-100 (0.1%) solution and twice in PBS Tween-20 (0.05%) solution. The tissues were then incubated with secondary antibody (Table 1) for 24 h at room temperature. Finally, the tissues were washed four times with PBS Tween-20 (0.05%) solution. The immunoreaction was revealed by diaminobenzidine (DAB; Sigma), and the preparations were mounted in glycerol gel. A negative control was performed with the omission of the primary antibody.

2.6. Quantitative analysis of myosin-V-immunoreactive myenteric neurons

The count of myosin-V-immunoreactive myenteric neurons was performed using images obtained randomly from the intermediate (60-120°, 240-300°) intestinal circumference in each animal, with 0° as the mesenteric insertion. The images were captured by an AxioCam (Zeiss, Jena, Germany) high resolution camera coupled to an Axioskop Plus (Zeiss) light microscope, digitized on a computer using AxioVision version 4.1 software, and recorded on a flash drive. Image-Pro Plus version 4.5.0.29

image analysis software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) was used for the neuronal quantification of the images recorded on the flash drive. Ten ganglia neurons of the myenteric plexus were quantified per animal.

2.7. Morphometric analysis of myosin-V-immunoreactive myenteric neurons

The measurement of the areas of myosin-V-immunoreactive myenteric neuronal cell bodies was performed using the same images captured using a 20× objective, similar to the quantitative analysis. The area (μm^2) of 100 neuronal cell bodies was measured using Image-Pro Plus for each animal for each technique, yielding 500 areas per group.

2.8. Statistical analysis

The data were analyzed using Statistica and GraphPad Prism software. Morphometric data were set in delineation blocks followed by Tukey's *post hoc* test. For the other data, we used one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test. The significance level was set at 5%. The results are expressed as mean \pm standard error.

3. Results

Table 1 shows the average initial body weight, final body weight, and nasal-caudal length of all groups. The average weight of all groups was 328.5 ± 13.6 g. A 41.24% and 59.2% weight increase was found in aged animals without supplementation (E345 and E428 groups, respectively) compared with the average initial weight ($p < 0.05$). An aging period of 83 days was associated with a 12.12% weight increase

between the E345 and E428 groups ($p < 0.05$). Ascorbic acid supplementation in the EA345 and EA428 groups did not alter body weight compared with controls ($p > 0.05$).

The nasal-caudal length increased in the E345 and E428 groups compared with the E90 group ($p < 0.05$). The supplemented groups (EA345 and EA428) presented a nasal-caudal length similar to the group of young animals (E90; $p > 0.05$). The average ascorbic acid intake during the experiment in the EA345 and EA428 groups was 39.98 ± 1.456 and 41.7 ± 1.362 mg/l/day.

The quantitative results showed that aging reduced the number of myosin-V-immunoreactive neurons compared with young animals (E90; $p < 0.05$) (Fig. 1). Ascorbic acid supplementation did not act in the recovery of neuronal loss ($p > 0.05$). Photomicrographs showing myosin-V-, VIP-, and CGRP-immunoreactive myenteric neurons are shown in Fig. 2, 3, and 4, respectively.

Aging did not alter the size of myosin-V-immunoreactive neurons ($p > 0.05$). Ascorbic acid supplementation in the EA345 and EA428 groups increased the average area of neurons by 24.6% and 24.1% compared with the E345 and E428 groups, respectively ($p < 0.05$) (Table 2). Increases in areas in the EA345 and EA428 groups were also observed, reflected by a shift to the right in the relative frequency curve (Fig. 2F).

The area of varicosities (μm^2) of CGRP-IR and VIP-IR nerve fibers is shown in Table 2. When all groups were compared, we observed significant differences ($p < 0.05$) for the two neurotransmitters. In the E345 and E428 groups, we found a reduction in the area of CGRP-IR nerve fiber varicosities compared with the young group (E90). The initial size of varicosities of VIP-IR neurons was reduced in the E345 group, and subsequently the areas recovered in the E428 group with values higher than those of young animals.

Treatment with ascorbic acid (EA345 and EA428 groups) increased the area of varicosities of CGRP-IR and VIP-IR neurons compared with the E345 and E428 groups, also reflected by a shift to the right in the relative frequency curve (Fig. 3F and 4F).

4. Discussion

In the present study, a significant increase was observed in weight between the aged (E345 and E428) and young animals, which was consistent with nasal-caudal length and reflected normal growth. According to Phillips and Powley (2001), body weight varies with age, but the animals gain weight until they are approximately 21 months old and subsequently quickly lose weight with age. Ascorbic acid supplementation had no effect on weight gain.

The method chosen for determining the number of myenteric neurons was the quantification of neurons per ganglion. Therefore, the use of a correction factor for neuronal density was not necessary because the gut increases in size with age, which could result from dilution and not neuronal death as a consequence of aging.

The technique used for determining the general population of myenteric neurons was myosin-V. Myosin-V is a motor protein found in neuron cell bodies and extensions (Drengk et al., 2000) and is specifically present in neuronal cytoplasm which confers specificity to the technique, allowing visualization of cell bodies and their projections (Drengk et al., 2000; Zanoni et al., 2003).

When neuronal density was analyzed, we found a gradual reduction in the number of myenteric neurons during aging, which was significant for animals in the E428 group. Aging promotes changes in the ENS, particularly affecting neurons in the myenteric plexus. Several studies have reported a reduction in the number of neurons as

a result of aging in rats, guinea pigs, mice (Santer, 1994; Johnson et al., 1998; Schafer et al., 1999; Wade, 2002; Phillips et al., 2003; Schoffen et al., 2005), and the digestive tract of humans (Meciano Filho et al., 1995; Gomes et al., 1997). Santer and Baker (1988) studied the small and large intestine of rats at 6 and 24 months and found neuronal loss of 40% in the jejunum, 43% in the ileum, 64% in the colon, and 42% in the rectum in aged rats. The authors emphasized that this loss may be accompanied by concomitant reorganization of the remaining elements, and therefore cannot be considered a degenerative process because the remaining ganglia increase their efficiency. Reduced neuronal density is associated with changes in the mucosa or motility of the gastrointestinal tract and may cause disturbances that, depending on the affected region, include dysphagia, gastro-esophageal reflux disorders, abdominal pain, diarrhea, constipation, and fecal incontinence (Wade and Cowen, 2004).

Neuronal death caused by aging has also been attributed to the large amount of oxidants produced concomitant with decreased antioxidants associated with aging. Aging occurs in most cases because of exposure of cells and their organelles to ionizing radiation, non-enzymatic reactions, and enzymatic reactions that reduce O₂ and water, with the consequent production of free radicals (Caldeira et al., 1989). Myenteric neurons are very susceptible to free radicals that are electronically unstable, highly reactive, and produced under conditions of aging. These radicals can bind to cellular structures, such as membrane lipids and nucleotides of DNA (Schneider et al., 2007). The high concentration of radicals in situations of ischemia/reperfusion and hyperoxia create mutations in mitochondrial DNA that accelerate the production of additional free radicals, thus creating a cycle of further mutations that lead to detrimental cellular senescence and multiple organ failure. The accumulation of genetic mutations in somatic cells is the specific cause of cell senescence (Fortunato and Pinheiro, 2007).

Muller et al. (2007) reported that a chronic state of oxidative stress exists in aerobic cells even under normal physiological conditions, which is attributable to an imbalance between oxidants and prooxidants. Oxidative stress is increased not only by the increased production of reactive oxygen species, but also by a decline in the efficiency of the enzymatic defense system in cells (e.g., glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase, and so on) (Finkel and Holbrook, 2000).

The present study used ascorbic acid as an antioxidant. Ascorbic acid is a water-soluble vitamin that has proven effective in neutralizing free radicals, as well as vitamins A and E (Caldeira et al., 1989; Deplabos and González, 2000). In aged animals supplemented with ascorbic acid (EA345 and EA428 groups), a tendency was observed toward increased preservation of the number of neurons, reflected in an increase of 14.34% and 13.8%, respectively, compared with animals of a similar age without supplementation.

Our research group previously conducted a study of myenteric neurons of the ileum in rats after 120 days of supplementation with ascorbic acid and found myenteric neuron preservation of 18% (Zanoni and Freitas, 2005). Although this was not a significant conservation of the number of neurons, we consider this a positive result because the increased number of neurons per ganglion was accompanied by an increased cell body area of myosin-V-immunoreactive neurons in the EA345 and EA428 groups compared with controls. These related data (i.e., neuron number and neuronal size) suggest the neuroprotective and neurotrophic effects of ascorbic acid.

In the present study, we used an immunohistochemical technique to reveal neurons and nerve fibers that express VIP and CGRP. The muscle layers showed a high density of VIP-IR nerve fibers, suggesting that these fibers are motor neurons that play an important role in controlling the activity of gastrointestinal smooth muscles. The

nerve fiber varicosities found in the present study were determined to be small dilations observed along the nerve fiber. Limited data in the literature have reported the effect of aging on VIP-IR neurons in the myenteric plexus in rats and the effect of treatment with antioxidants. In the present study, we verified a reduction in the size of varicosities of VIP-IR neurons in the E345 group compared with young animals, but we cannot conclude that this reduction in VIP expression is a result of neuronal death in this subpopulation of neurons because the methodology cannot determine neuronal density. One hypothesis is that a reduction of neurotrophic factors derived from some cells leads to the vulnerability of enteric neurons (Giaroni et al., 1999), such as those that express VIP. Additionally, because of neural plasticity, these neurons may recover their expression over time. This hypothesis is supported by the fact that E428 animals have greater areas of varicosities than animals in the E345 group. At 83 days, increased activity of synthesis machinery could also occur. By utilizing electrical stimulation, Kasparek et al. (2009) found increased VIP release in the jejunum of Lewis rats during the aging process and an indication of increased synthesis.

Ascorbic acid supplementation increased the size of VIP-IR varicosities in the EA345 and EA428 groups compared with controls. The increased size of varicosities may be related to increased synthesis and release and can be considered positive because, in addition to the role of VIP as a neurotransmitter, recent studies have suggested the importance of VIP in the neuroprotection of central and enteric neurons and as a potent anti-inflammatory peptide. VIP-IR nerve fibers associated with cells in the mucosal immune system participate in the control of mucosal immunity in the gut (Brenneman et al., 2003). Zaroni and Freitas (2005) found similar results in VIP-IR neurons of the submucous plexus in rats with 120 day ascorbic acid supplementation.

When we studied the varicosities of CGRP-IR nerve fibers, we found a reduction in size of 11.9% in the E345 group and 18.9% in the E428 group compared with young animals (E90). CGRP is a neuropeptide that plays an important role in many ENS functions in vertebrate species, including the regulation of smooth muscle contractility in the gastrointestinal tract (Rasmussen et al., 1992; Grider, 1994), sensory function (Rasmussen et al., 2001), intestinal microcirculation (Kawasaki, 2002), and secretion (Tache, 1992). Recently, Mitsui (2009) reported an important role of CGRP expressed in myenteric neurons in guinea pigs in facilitating the release of serotonin from enterochromaffin cells present in the intestinal mucosa in the primary afferent reflex. Little has been reported in the literature regarding the other phenotypes of enteric innervation, including CGRP, during aging, but possibly a reduction in the size of varicosities induces changes in intestinal homeostasis. Increased production of other inhibitory neurotransmitters, such as VIP and nitric oxide, may be a compensatory mechanism that reduces CGRP expression.

Ascorbic acid supplementation increased the size of varicosities of CGRP-IR nerve fibers by 7.8% in the EA345 group and 25% in the EA428 group. We hypothesize that ascorbic acid has a neuroprotective effect on these neurons. The varicosities in the EA345 group were similar to those in young animals, and the EA428 group had larger varicosities than the E90 group.

In summary, our results showed that aging reduced the density of myosin-V-immunoreactive neurons and changed the size of varicosities of VIP-IR and CGRP-IR neurons. Supplementation with ascorbic acid had a neurotrophic effect on all neurons studied, suggesting a neuroprotective role.

References

- Benkovic, S.A., Connor, J.R., 1993. Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J. Comp. Neurol.* 338, 97-113.
- Brehmer, A., 2006. *Structure of Enteric Neurons*. Springer, Berlin.
- Brenneman, D.E., Phillips, T.M., Hauser, J., Hill, J.M., Spong, C.Y., Gozes, I., 2003. Complex array of cytokines released by vasoactive intestinal peptide. *Neuropeptides* 37, 111-119.
- Caldeira, A.M.L., 1989. As bases biológicas do envelhecimento. *Rev. Fol. Miserad.* 99, 107-118.
- Deplabos, B.G., González, A.E., 2000. Envejecimiento vs. radicales libres. *Rev. Fac. Farm.* 38, 20-26.
- Drengk, A.C., Kajiwara, J.K., Garcia, S.B., Carmo, V.C., Larson, R.E., Zucoloto, S., Espreafico, E.M., 2000. Immunolocalisation of myosin-V in the enteric nervous system of the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 78, 109-112.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Fortunato, J.S., Pinheiro, M.J.P., 2007. Envelhecimento. In: Pinto, A.M. (Ed.), *Fisiopatologia: Fundamentos e Aplicação*. Lidel, Lisboa, pp.568.
- Giaroni, C., De Ponti, F., Cosentino, M., Lecchini, S., Frigo, G., 1999. Plasticity in the enteric nervous system. *Gastroenterology* 117, 1438-1458.
- Gomes, O.A., De Souza, R.R., Liberti, E.A., 1997. A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. *Gerontology* 43, 210-217.
- Grider, J.R., 1994. CGRP as a transmitter in the sensory pathway mediating peristaltic reflex. *Am. J. Physiol.* 266, G1139-G1145.

- Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59, 1609-1623.
- Hays, N.P, Roberts, S.B., 2006. The anorexia of aging in humans. *Physiol. Behav.* 88, 257-266.
- Johnson, R.J.R., Schemann, M., Santer, R.M., Cowen, T., 1998. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. *J. Anat.* 192, 479- 488.
- Jost, W.H., 1997. Gastrointestinal motility problems in patients with Parkinson's disease: effects of antiparkinsonian treatment and guidelines for management. *Drugs Aging* 10, 249-258.
- Kasperek, M.S., Fatima, J., Iqbal, C.W., Duenes, J.A., Sarr, M.G., 2009. Age-related changes in functional NANC innervation with VIP and substance P in the jejunum of Lewis rats. *Auton. Neurosci.* 151, 127-134.
- Kawasaki, H., 2002. Regulation of vascular function by perivascular calcitonin gene-related peptide-containing nerves. *Jpn. J. Pharmacol.* 88, 39-43.
- Kuyvenhoven, J.P., Meinders, A.E., 1999. Oxidative stress and diabetes mellitus: pathogenesis of long-term complications. *Eur. J. Intern. Med.* 10, 9-19.
- Lomax, A.E., Fernandez, E., Sharkey, K.A., 2005. Plasticity of the enteric nervous system during inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 17, 4-15.
- Majumdar, A.P.N., Jaszewski, R., Dubick, M.A., 1997. Effect of aging on the gastrointestinal tract and the pancreas. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215, 134-144.
- 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.

- Micieli, G., Tosi, P., Marcheselli, S., Cavallini, A. 2003. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurol. Sci.* 24 Suppl 1, S32-S34.
- Mitsui, R. 2009. Characterisation of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of rat colon. *Cell. Tissue Res.* 337, 37-43.
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., Van Remmen, H., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 477-503.
- Norton, C., 2006. Constipation in older patients: effects on quality of life. *Br. J. Nurs.* 15, 188-192.
- O'Donnell, E., Lynch, M.A., 1998. Dietary antioxidant supplementation reverses age-related neuronal changes. *Neurobiol. Aging* 19, 461-467.
- O'Mahony, D., O'Leary, P., Quigley, E.M., 2002. Aging and intestinal motility: a review of factors that affect intestinal motility in the aged. *Drugs Aging* 19, 515-527.
- 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., Powley, T.L., 2001. As the gut ages: timetables of aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *J. Comp. Neurol.* 434, 358-377.
- Phillips, R.J., Powley, T.L., 2007. Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. *Autonom. Neurosci.* 136, 1-19.
- Rasmussen, T.N., Gregersen, H., Harling, H., Holst, J.J., 1992. Calcitonin gene-related peptide: effect on contractile activity and luminal cross-sectional area in the isolated, perfused porcine ileum. *Scand. J. Gastroenterol.* 27, 787-792.
- Rasmussen, T.N., Schmidt, P., Poulsen, S.S., Holst, J.J., 2001. Effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on motility and on the release of substance P, neurokinin

- A, somatostatin and gastrin in the isolated perfused porcine antrum. *Neurogastroenterol. Motil.* 13, 353-359.
- Rice-Evans, C., Burdon, R., 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid. Res.* 32, 71-110.
- Saffrey, M.J., 2004. Ageing of the enteric nervous system. *Mech. Ageing Dev.* 125, 899-906.
- Santer, R.M., 1994. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the 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.
- Schafer, K.H., Hansgen, A., Mestres, P., 1999. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *Anat. Rec.* 256, 20-28.
- Schneider, L.C., Perez, G.G., Banzi, S.R., Zanoni, J.N., Natali, M.R., Buttow, N.C., 2007. Evaluation of the *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on the myenteric plexus of the small intestine of Wistar rats. *J. Gastroenterol.* 42, 624-630.
- Schoffen, J.P., Soares, A., de Freitas, P., Buttow, N.C., Natali, M.R., 2005. Effects of hypoproteic diet on myosin-V immunostained myenteric neurons and the proximal colon wall of aging rats. *Auton. Neurosci.* 122, 77-83.
- Tache, Y., 1992. Inhibition of gastric acid secretion and ulcers by calcitonin gene-related peptide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 657, 240-247.
- Talley, N.J., O'Keefe, E.A., Zinsmeister, A.R., Melton, L.J. 3rd, 1992. Prevalence of gastrointestinal symptoms in the elderly: a population-based study. *Gastroenterology* 102, 895-901.

- Vinik, A.I., Freeman, R., Erbas, T., 2003. Diabetic autonomic neuropathy. *Semin. Neurol.* 23, 365-372.
- Wade, P.R., 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.
- Wade, P.R., Cowen, T., 2004. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. *Neurogastroenterol. Motil.* 16 Suppl 1, 19-23.
- Zanoni, J.N., Buttow, N.C., Bazotte, R.B., 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., 2005. Effects of ascorbic acid on the vasoactive intestinal peptide synthesis in the ileum submucous plexus of normal rats. *Arq. Gastroenterol.* 42, 186-190.

Table 1. Initial weight (PI), final weight (PF), and nasal-caudal length (CNC).

	PI (g)	PF (g)	CNC (cm)
E90	-	367.7 ± 6.8 ^a	42.83 ± 0.3 ^{a,b}
E345	314.3 ± 10.6 ^a	464.0 ± 11.3 ^{b,c}	45.50 ± 0.6 ^{a,c}
EA345	336.1 ± 14.1 ^a	490.7 ± 13.5 ^b	45.58 ± 1.0 ^a
E428	335.5 ± 17.4 ^a	523.0 ± 15.6 ^{b,d}	45.75 ± 0.5 ^{a,c}
EA428	328.1 ± 12.3 ^a	497.9 ± 21.5 ^b	45.33 ± 0.7 ^a

$p < 0.05$, significant difference between different letters in the same line. E90, young rats; E345, aged 345-day-old rats; EA345, aged 345-day-old rats supplemented with ascorbic acid; E428, aged 428-day-old rats; EA428, aged 428-day-old rats supplemented with ascorbic acid ($n = 6$ per group).

Table 2. Cell body area (μm^2) of myosin-V-immunoreactive myenteric neurons and area of varicosities (μm^2) of CGRP- and VIP-immunoreactive nerve fibers.

	E90	E345	EA345	E428	EA428
Myosin V	202.4 ± 3.5^a	192.1 ± 4.3^a	255.0 ± 2.63^b	201.6 ± 3.5^a	265.5 ± 2.97^b
CGRP	3.77 ± 0.02^a	3.37 ± 0.02^b	3.65 ± 0.02^c	3.17 ± 0.02^d	4.23 ± 0.02^e
VIP	3.82 ± 0.02^a	3.72 ± 0.02^b	5.24 ± 0.03^c	4.01 ± 0.02^d	4.57 ± 0.02^e

$p < 0.05$, significant difference between different letters in the same line. E90, young rats; E345, aged 345-day-old rats; EA345, aged 345-day-old rats supplemented with ascorbic acid; E428, aged 428-day-old rats; EA428, aged 428-day-old rats supplemented with ascorbic acid ($n = 6$ per group).

Figure Legends

Figure 1. Number of myenteric neurons immunoreactive for myosin-V ganglia using a 20× objective in the intermediate region of the ileum in young rats (E90), aged rats with no supplementation (E345 and E428), and aged rats supplemented with ascorbic acid (EA345 and EA428). $n = 5$ animals per group. $*p < 0.05$, compared with E428 group.

Figure 2. Myosin-V-immunoreactive neurons of the intermediate region of the ileum of rats in the following groups: (A) E90 (young), (B) E345 (aged 345-day-old rats), (C) EA345 (aged 345-day-old rats supplemented with ascorbic acid), (D) E428 (aged 428-day-old rats), and (E) EA428 (aged 428-day-old rats supplemented with ascorbic acid). (F) Relative frequency distribution of cellular profile of myosin-V-immunoreactive myenteric neurons in the ileum. Calibration bar = 50 μm .

Figure 3. Photomicrograph of varicosity of CGRP immunoreactivity in the myenteric plexus of the ileum in young and aged rats: (A) E90 (young), (B) E345 (aged 345-day-old rats), (C) EA345 (aged 345-day-old rats supplemented with ascorbic acid), (D) E428 (aged 428-day-old rats), and (E) EA428 (aged 428-day-old rats supplemented with ascorbic acid). (F) Relative frequency distribution of varicosity of CGRP-immunoreactive myenteric neurons in the ileum. Calibration bar = 50 μm .

Figure 4. Photomicrograph of varicosity of VIP immunoreactivity in the myenteric plexus of the ileum in young and aged rats: (A) E90 (young), (B) E345 (aged 345-day-old rats), (C) EA345 (aged 345-day-old rats supplemented with ascorbic acid), (D) E428 (aged 428-day-old rats), (E) EA428 (aged 428-day-old rats supplemented with

ascorbic acid). (F) Relative frequency distribution of varicosity of VIP-immunoreactive myenteric neurons in the ileum. Calibration bar = 50 μm .

