

ANÁLISE MORFOLÓGICA DA PAREDE INTESTINAL (JEJUNO) E ULTRAESTRUTURA DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS DE RATOS WISTAR EM PROCESSO DE ENVELHECIMENTO E TRATADOS COM DIETA COM DIFERENTES NÍVEIS CALÓRICOS

Luiz Arthur Nunes da SILVA (1); Any Kelly Gomes de LIMA (2); Jodonai Barbosa da SILVA (3); Elaine Silva do NASCIMENTO (4); Naianne Kelly CLEBIS (5)

(1) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, email: arthur_nunes@hotmail.com

(2) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, email: any_saopaulina@hotmail.com

(3) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, email: elaine_christie@hotmail.com

(4) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, email: jodonai@hotmail.com

(5) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, email: naianne@usp.br

RESUMO

O último século foi caracterizado por aumento significativo na população idosa como um todo. Com o envelhecimento há aumento da incidência de problemas gastrointestinais relacionados com a motilidade intestinal. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da restrição calórica nos aspectos ultraestruturais dos neurônios mioentéricos do jejuno de ratos Wistar. Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*), divididos em 4 grupos (n=10): C6 (06 meses com ração normal); C18 (18 meses com ração normal); RCI (18 meses com restrição calórica de 12%) e RCII (18 meses com restrição calórica de 31%). Após período experimental (12 meses) os animais foram eutanasiados. De cada jejuno destinado a técnica de NADPH-diforase foi coletado um fragmento proximal destinado à microscopia eletrônica de transmissão (MET). Verificamos que os gânglios mioentéricos encontravam-se entre as camadas musculares longitudinal e envolvidos por tecido conjuntivo denso. Já a integridade da membrana basal estava preservada. Neurópilo e membrana plasmática íntegra, núcleos grandes e ovalados envoltos por membrana nuclear também íntegra, nucléolo e cromatina; elevado número de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. Desta forma, podemos concluir que nem o processo inicial de envelhecimento nem a restrição calórica em diferentes níveis interferiram na ultraestrutura neuronal.

Palavras-chave: Envelhecimento, Restrição calórica, Plexo mioentérico, Ultraestrutura.

1 INTRODUÇÃO

O século XX foi caracterizado por aumento na longevidade do ser humano, sendo que a expectativa de vida equivale a quase o dobro da idade alcançada no início do século (CARVALHO; GARCIA, 2003).

O envelhecimento é um processo progressivo caracterizado pela diminuição dos mecanismos envolvidos na manutenção da homeostase, levando as alterações nos diferentes tecidos corpóreos (RUTTEN et al., 2003; SWEDA et al., 2003; TIMIRAS, 1994). Entre as atividades corporais que se encontram comprometidas com a idade, têm-se as funções neuroendócrinas, hepáticas, gastrointestinais, renais dentre outras (TIMIRAS, 1994).

Sabe-se que as alterações morfológicas e/ou quantitativas nos neurônios mioentéricos são responsáveis por disfunções significativas no sistema digestório. Assim, por exemplo, durante o envelhecimento verifica-se diminuição da densidade neuronal em diversas espécies animais nas diferentes regiões do TGI (EL-SALLY et al., 1999; GABELLA, 1989; GOMES et al., 1997; PHILLIPS; POWLEY, 2001; SANTER; BAKER, 1988; SOUZA et al., 1993). Além da baixa funcionalidade e resistência do organismo ao estresse, diversos outros fatores são responsabilizados pelas alterações que caracterizam o envelhecimento, inclusive o comportamento alimentar que envolve tanto a quantidade de calorias ingeridas quanto à composição da dieta (SHEPHARD, 1998). Desta forma, se faz necessário o conhecimento de alternativas alimentares que contribuam para um envelhecimento bem sucedido, ou seja, com qualidade de vida.

Dentre as manipulações dietéticas encontra-se, com destaque, a restrição calórica (RC) que quando oferecida a roedores desde o nascimento, é capaz de promover aumento no tempo de vida (HOLLOSZY, 1992; MASORO, 1992; WEINDRUCH, 1996; WEINDRUCH; SOHAL, 1997; ROTH et al., 2001), uma vez que tem sido demonstrado que a RC aumenta a capacidade do organismo de resistência aos estresses (SOHAL; WEINDRUCH, 1996).

No sistema nervoso central a RC aumenta a plasticidade nos neurônios, assim como, a expressão de repressores anti-apoptóticos no córtex cerebral de ratos idosos (SHELKE; LEEUWENBURGGH, 2003). Já, no sistema nervoso entérico, a RC além de apresentar efeito neuroprotetor nos neurônios mioentéricos durante o envelhecimento, é responsável pela diminuição da apoptose neuronal, processo este que se acentua com o envelhecimento (COWEN et al., 2000).

Assim o presente estudo teve como objetivo principal avaliar os efeitos da restrição calórica na plasticidade dos neurônios mioentéricos do jejuno de ratos Wistar.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Material

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar (Comissão de Bioética da FMVZ/USP nº1132/2007). Os animais foram separados em quatro grupos, com 10 animais em cada grupo:

- C - 6: animais de 06 meses com ração normal;
- C - 18: animais de 18 meses com ração normal;
- RCI: animais de 18 meses com restrição calórica de 12%;
- RCII: animais de 18 meses com restrição calórica de 31%.

2.2 Métodos

Os animais de todos os grupos, exceto o grupo C-6, aos seis meses de idade foram transferidos para o Biotério setorial da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, onde permaneceram até os 18 meses. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro, mantidas em condições ambientais controladas de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro) e receberam ração e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos quatro grupos (10 animais por grupo). Para os animais do grupo C-6 e C-18 foi administrada ração normal para animais de laboratório (Nuvital®). Os animais dos grupos RC1 e RC2 receberam rações com diferentes níveis calóricos, conforme determinado para cada grupo.

2.2.1 Elaboração da dieta

A dieta A foi à dieta normal referência fornecida aos animais do grupo C-6 e C-18. As dietas B e C foram fornecidas aos animais dos grupos RCI e RCII, respectivamente.

A dieta B teve energia bruta reduzida em 12% enquanto que a dieta C teve redução de 31% em relação a energia bruta calculada para a dieta normal (Nuvital®).

2.2.2 Eutanásia dos animais

Após período experimental (12 meses) os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e eutanasiados com dose letal de anestésico (Tiopental® 40mg/kg de peso corpóreo) via endovenosa. Posteriormente, foram laparatomizados e de cada jejuno foi coletado um fragmento proximal destinado à microscopia eletrônica de transmissão.

2.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Da extremidade proximal dos jejunos destinados a técnica da NADPH-diaforase foram retirados fragmentos de 1 cm que foram fixados por imersão em solução fixadora de Karnovsky modificada.

Após fixadas as amostras foram seccionadas em fragmentos menores, lavadas em de sódio a solução tampão de cacodilato 0,125M e pH 7,4 e imersos em uma solução aquosa de tetróxido de ósmio a 2%. As amostras permaneceram nesta solução durante 60 minutos, no escuro e sob agitação constante. Em seguida, foram lavadas nesta mesma solução de tampão de cacodilato, seguido de água destilada, para serem contrastados

em blocos com a solução aquosa saturada de acetato de uranila durante 60 minutos sob agitação constante e em recipiente escuro.

Os fragmentos foram lavados com água destilada e desidratados em série crescente de alcoóis de 50% ao absoluto, sendo depois desidratados em óxido de propileno por 10 minutos. As amostras foram embebidas com uma solução de óxido de propileno e resina araldite, sempre em constante agitação e diferentes proporções. Após estas etapas, os fragmentos foram inclusos em resina araldite pura e mantidos em estufa (60°C), por um período mínimo de dois dias.

Os blocos de resina formados foram trimados e seccionados com 70-90 nm de espessura por navalha de diamante. As secções foram colocadas em placas de cobre e coradas com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo e, posteriormente analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão.

3 RESULTADOS

Na microscopia eletrônica de transmissão (Figura 1A-G) verificamos em todos os grupos que os neurônios mioentéricos encontravam-se entre as camadas longitudinal e circular da túnica muscular envolvidos por tecido conjuntivo denso. A região periganglionar apresentou-se preenchida por tecido conjuntivo denso e situada entre as fibras musculares.

A integridade da membrana basal estava preservada em todos os grupos não sendo possível evidenciar alterações decorrentes do envelhecimento ou mesmo da restrição calórica. Em todos os grupos observamos neurópilo com processos neuronais e terminações nervosas contendo vesículas. Podemos observar também muitas sinapses com integridade preservada em todos os grupos. Membrana plasmática íntegra, núcleos grandes e ovalados envoltos por membrana nuclear também íntegra, nucléolo e cromatina foram observados em todos os grupos estudados.

Além disso, no geral, foi verificado elevado número de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, como pode ser observado na Figura 1:

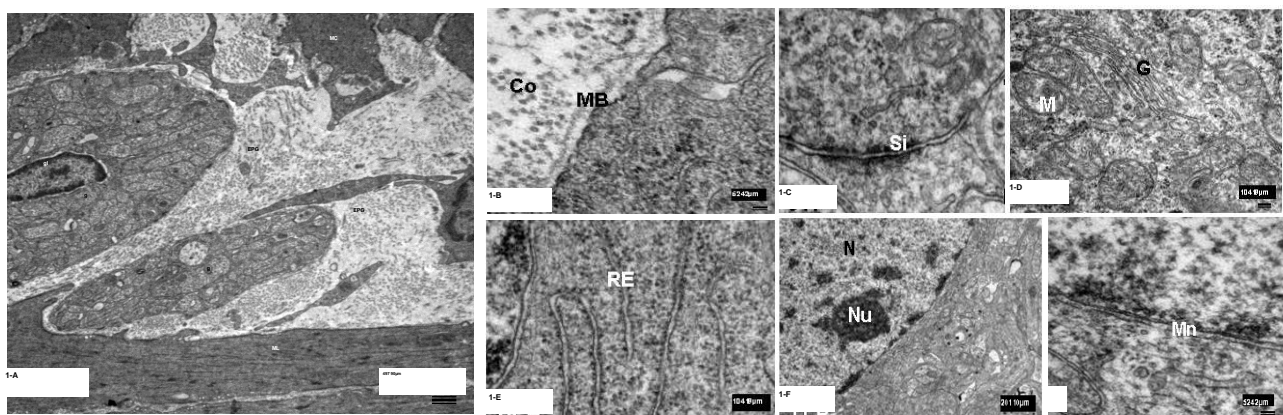


Figura 1 – A) Eletrofotomicrografia do jejunum de ratos de ambos os grupos evidenciando gânglios mioentéricos (g) e células da glia (gl) localizados entre as camadas musculares longitudinal (ML) e circular (MC), na região denominada espaço periganglionar (EPG) B) Fibras colágenas (Co) e membrana basal (MB); C) Neurópilo (Np) com vesículas granulares (cheias) e agranulares (vazias) e sinapses (Si); D-E) Mitocôndria (M), complexo de Golgi (G) e retículo endoplasmático rugoso (RE); F) Núcleo (N) e nucléolo (Nu) G) Membrana nuclear (Mn).

4 DISCUSSÃO

Na análise ultraestrutural, observamos que não houve diferença entre os grupos C-6, C-18, RCI e RCII. Em todos os grupos os neurônios mioentéricos encontravam-se entre as camadas longitudinal (ML) e circular (MC) da túnica muscular envolvidos por tecido conjuntivo denso (Co). A região periganglionar (EPG) apresentou-se preenchida por tecido conjuntivo denso e situada entre as fibras musculares e a membrana basal (Mb). Outros autores também evidenciaram fibras colágenas na região periganglionar (GOMES, SOUZA, LIBERTI, 1997).

A integridade da membrana basal estava preservada em todos os grupos não sendo possível evidenciar alterações decorrentes do envelhecimento ou mesmo da restrição calórica. Os gânglios mioentéricos são envolvidos por uma lâmina basal (GABELLA, 1989; 1995; SAFFREY, 2004). Em animais senis é possível observar degenerações ultraestruturais nos neurônios do plexo mioentérico, porém, estas ocorrem em

neurônios isolados e não no gânglio (GABELLA, 1989). Em todos os grupos observamos neurópilo (Np) com processos neuronais e terminações nervosas contendo vesículas como descrito também por Gabella (1989) e Saffrey (2004). Não foi possível observar se as vesículas eram granulares ou agranulares.

Além disso, como relatado por Gabella (1989), podemos observar muitas sinapses com integridade preservada em todos os grupos. Membrana plasmática íntegra, núcleos grandes e ovalados envoltos por membrana nuclear também íntegra, nucléolo e cromatina foram observados em todos os grupos estudados. Presença de elevado número de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso evidenciados por Natali (1999) também se apresentaram constantes em todos os grupos caracterizam a grande atividade metabólica destas células.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os dados encontrados neste estudo, podemos verificar que a restrição calórica em 12% e 31% em relação à dieta normal de ratos não alterou a estrutura celular dos neurônios mioentéricos analisados pela MET. Tal fato talvez possa ser explicado pelo período experimental realizado de apenas 12 meses. Além disso, por ter sido utilizado ratos com 18 meses de idade, início do processo de envelhecimento, também não foi evidenciadas alterações decorrentes do envelhecimento.

Assim para os próximos estudos seria importante se analisar animais com maior idade do que aqueles utilizados neste estudo, ou seja, com idade superior a 18 meses, para poder se observar às alterações neuronais do processo de envelhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, J.A.M.; GARCIA, R.A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. Cad. Saúde Pública, v.19, n. 3, p.725-733, 2003.

COWEN, T.; JOHNSON, R.J.R.; SOUBEYRE, V. SANTER, R.M. Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. Gut. v.47, p.653-660, 2000.

EL-SALHY, M; SANDSTRÖM, O.; HOLMLUND, F. Age-induced changes in the enteric nervous system in the mouse. Mechanisms of Ageing and Development, v. 107, p. 93-103, 1999.

GABELLA, G. Fall in the number of myenteric neurons in agian guinea-pigs. Gastroenterology. v. 96, p.1487-1493, 1989.

GOMES, O. A.; SOUZA, R. R.; LIBERTI, E. A. A preliminary investigation of the effects of ageing on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. Gerontology, v. 43, p. 210-217, 1997.

HOLLOSZY, J.O. Exercise and food restriction in rats. Journal of Nutrition. v.122, p.774-7, 1992.

MASSORO, E.J. Potential role of the modulation of fuel use in the antiaging action of dietary restriction. Annals of the New York academy of Sciences. V.663, n.21, p.403-11, 1992.

PHILLIPS, R. J.; POWLEY, T. L: As the gut ages: Timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. J. Comp. Neurol., v. 434, p. 358-377, 2001.

ROTH, G.S.; INGRAM, D.K.; LANE, M.A. Caloric restriction in primates and relevance to humans. Ann. N. Y. Acad. Sci. v. 928, p. 305-315, 2001.

RUTTEN, B. P. F.; KORR, H.; STEINBUSCH, H. W. M.; SCHMITZ, C. the agingbrain: less neurons could be better. Mechanisms of Ageing and Development, v. 124, p. 349-355, 2003.

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

SANTER, R.M.; BAKER, D.M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. J. Autonom. Nerv. Syst., v. 25, p. 59-67, 1988.

SHELKE, R.R.; LEEUWENBURGH, C. Lifelong caloric restriction increases expression of apoptosis repressor with a caspase recruitment domain (ARC) in the brain. *FASEB J.* v. 17, p.494-496, 2003.

SHEPHARD, R.J. Aging and Exercise. In: FHEY, T.D., ed. *Encyclopedia of sports medicine and science*. Internet Society for sport science: <http://www.sporsci.org>, 1998.

SOHAL, R.S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. v. 273, p. 59-63.

SOUZA, R. R.; MORATELLI, H. B.; BORGES, N.; LIBERTI, E. A. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. ***Intentional Journal of Experimental Clinical of Gerontology***, v. 39, p.138-188, 1993.

SZWEDA, P. A.; CAMOUSE, M.; LUNDBERG, K. C.; OBERLEY, T. D.; SZWEDA, L. I. Aging, lipofuscin formation, and free radical-mediated inhibition of cellular proteolytic systems. *Ageing Research Reviews*, v. 2, p. 383-405, 2003.

TIMIRAS, P.S. *Physiological basis of aging and geriatrics*. Boca Raton, CRC press, 2 ed., 1994.

WEINDRUCH, R. Caloric restriction and aging. *Sci. American*. p. 32-38, 1996.