



**Departamento de farmacología y fisiología
Facultad de medicina**

TRABAJO FIN DE GRADO

Curso 2014-15

ENVEJECIMIENTO DEL SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO DUODENAL

Autor:

Laura López Gómez

Tutores:

José Joaquín García García

Laura López Pingarrón.

ÍNDICE

1. Resumen-Palabras clave.....	2
2. Abstract-Keywords.....	3
3. Introducción.....	4
3.1. Estructura histológica funcional del duodeno.....	4
3.2. Sistema nervioso entérico.....	7
3.2.1. Plexos Nerviosos.....	7
3.2.2. Control Nervioso de la función gastrointestinal	8
3.3. Envejecimiento.....	9
3.3.1. Concepto.....	9
3.3.2. Teorías del envejecimiento.....	9
3.3.3. Envejecimiento del tubo digestivo.....	12
3.3.4. Edad y sistema nervioso.....	13
4. Planteamiento y objetivos del trabajo.....	16
5. Material y métodos.....	17
5.1. Inmunohistoquímica.....	17
5.1.1. Fundamento.....	17
5.1.2. Técnica inmunohistoquímica.....	18
5.1.2.1. Desenmascaramiento antigénico.....	19
5.1.2.2. Inhibición de la actividad enzimática.....	19
5.1.2.3. Exposición a los anticuerpos primarios	19
5.1.2.4. Exposición a los anticuerpos secundarios.....	20
5.1.2.5. Revelado y contratinción.....	20
5.2. Estudio morfométrico.....	20
5.2.1. Protocolo del estudio morfométrico. Variables.....	20
5.2.2. Elaboración de las imágenes mosaico.....	21
5.2.3. Estudio de las áreas de las tunicas submucosa y muscular.....	21
5.2.4. Cálculo de las áreas de los plexos submucoso y mientérico.....	23
6. Resultados.....	25
7. Discusión.....	31
8. Conclusiones.....	33
9. Bibliografía.....	34

1. RESUMEN / PALABRAS CLAVE

El envejecimiento se caracteriza por una disminución progresiva de la capacidad funcional de todos los tejidos del organismo. Numerosas teorías han propuesto mecanismos para explicar dicho fenómeno, siendo una de la más aceptada la que responsabiliza a los radicales libres producidos a nivel celular. El estrés oxidativo altera la función y la estructura de las células, afectando a lípidos, proteínas e hidratos de carbono en todos los sistemas y aparatos. Cabe destacar que los sistemas nerviosos central y entérico son especialmente sensibles al estrés oxidativo, donde inducen cambios en su estructura y función.

Para estudiar el efecto del envejecimiento, se han utilizado cortes de duodeno en ratas de 3, 12 y 24 meses de edad, marcados mediante inmunohistoquímica con anticuerpos frente a la proteína S-100. Se ha realizado un estudio morfométrico calculando las áreas de las túnica submucosa y muscular, y la superficie que ocupa el plexo submucoso, situado en la pared submucosa y el plexo mientérico, entre las capas musculares circular y longitudinal del duodeno, en los tres grupos de edad.

Los resultados obtenidos sugieren un marcado descenso tanto del plexo submucoso como del mientérico, a medida que aumenta la edad de las ratas. Estos datos, coincidentes con estudios realizados por otros autores, apoyan la hipótesis de que con la edad, se producen alteraciones en el sistema nervioso entérico, que pueden ser responsables de la mayor susceptibilidad de trastornos de la motilidad intestinal, como el estreñimiento.

Palabras clave: envejecimiento, radicales libres, estrés oxidativo, sistema nervioso entérico, plexo mientérico, plexo submucoso.

2. ABSTRACT / KEYWORDS

Aging is characterised by a progressive decrease in the functional capacity of every tissue in our body. Many theories have suggested several processes in order to explain this phenomenon, being the theory of free radicals produced in cells the most accepted one. Oxidative stress alters the function and the structure of cells by affecting lipids, proteins and carbohydrates in every organ. It should be noted that central and enteric nervous system are particularly sensitive to oxidative stress, which induces changes in its function and structure.

In order to study the effect of aging, sections of 3, 12 and 24-month-old rat duodenum marked by immunohistochemistry with antibodies against S-100 protein. A morphometric study was carried out calculating the submucosa and muscularis areas and the surface occupied by the submucosal plexus, located on the submucosal wall, and myenteric plexus, between the circular and longitudinal muscle layers of duodenum, in three age groups.

The results of these studies suggest a marked decline of these areas, both submucosal and myenteric, with increasing age in rats. These data, consistent with other studies carried out by different authors, support the hypothesis that alterations in enteric nervous system caused by aging may be responsible for the increased susceptibility to gut motility disorders, such as constipation in old age.

Keywords: aging, free radicals, oxidative stress, enteric nervous system, myenteric plexus, submucosal plexus.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ESTRUCTURA HISTOLÓGICA FUNCIONAL DEL DUODENO

El intestino delgado es un órgano tubular de unos 3-4 metros de longitud que conecta el estómago con el intestino grueso. Es aquí donde se produce la parte fundamental del proceso de absorción de los principios inmediatos resultantes del proceso de digestión realizado en estómago. Esta función es asistida por las secreciones del páncreas y del hígado, que se encuentran conectados con el intestino delgado a través de sistemas de conductos. El intestino delgado se divide a su vez, en tres segmentos según su estructura y funciones: el duodeno es la primera parte y la más corta, de unos 15 centímetros de longitud, separado del estómago por el píloro y finaliza en el ángulo duodenoyeyunal, el yeyuno supone 2/5 partes del intestino y se convierte sin un límite definido en el tercer segmento, el íleon, que es la parte final y acaba en la válvula ileocecal (Guyton, 2012).

A nivel histológico, la pared del intestino delgado está formada por una serie de capas bien definidas que desde la luz hacia afuera son: mucosa, submucosa, capa muscular, interna y externa, y serosa (Figura 1).

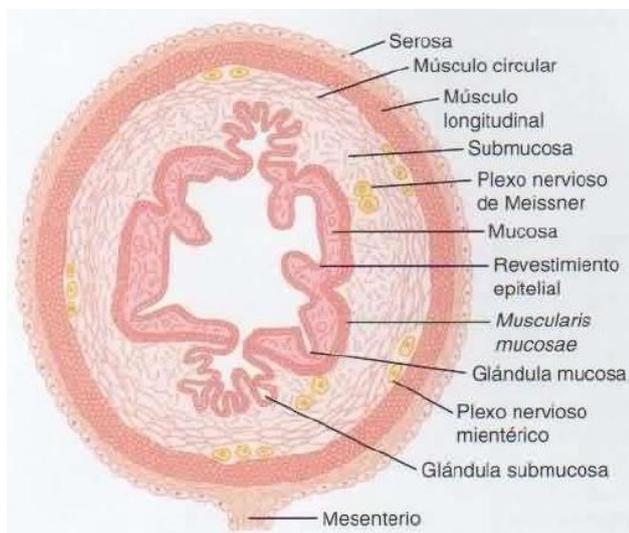


Figura 1. Corte transversal típico del intestino (Guyton, 2012)

La mucosa del intestino delgado está formada por un epitelio de revestimiento, epitelio cilíndrico simple, lámina propia subyacente al epitelio que es tejido conectivo laxo y muscular de la mucosa formada por dos capas delgadas, una circular interna y otra longitudinal externa de fibras musculares lisas. La mucosa intestinal presenta

vellosidades que son evaginaciones que sobresalen en la luz intestinal y criptas de Lieberkühn que son invaginaciones tubulares que atraviesan toda la lámina propia hasta la *muscularis mucosae* (Welsch, 2014).

La submucosa está formada por tejido conjuntivo denso con fibras colágenas que permiten el alargamiento y ampliación del tubo intestinal. En ella, se encuentran abundantes vasos sanguíneos y linfáticos. La capa muscular externa se compone, como regla general, de una capa interna de músculo circular y una capa externa de músculo longitudinal. Por último, la serosa de epitelio simple plano o cúbico (mesotelio) que es primariamente de ubicación intraperitoneal (Welsch, 2014; Ross, 2008).

Los tres segmentos de intestino delgado, tienen en común que la superficie de su mucosa está muy ampliada por pliegues circulares, conocidos como válvulas de Kerckring, que afectan a la mucosa y la submucosa y que se proyectan hacia la luz, por vellosidades; pliegues más pequeños que los circulares, que sólo afectan a la mucosa; y por microvellosidades, que se sitúan en las superficies apicales de las células cilíndricas de absorción y aumentan el área de superficie de absorción de la mucosa (Dongmei Cui, 2011).

Aunque las estructuras histológicas de la pared del duodeno, yeyuno e íleon son semejantes, hay algunas características que permiten distinguirlos. En el primer segmento del intestino delgado, el duodeno, la mucosa (Figura 2) tiene un aspecto vellosito característico, con vellosidades cortas y anchas, y con criptas de Lieberkühn que se localizan entre las vellosidades y crecen hacia la muscular de la mucosa (Dongmei Cui, 2011).

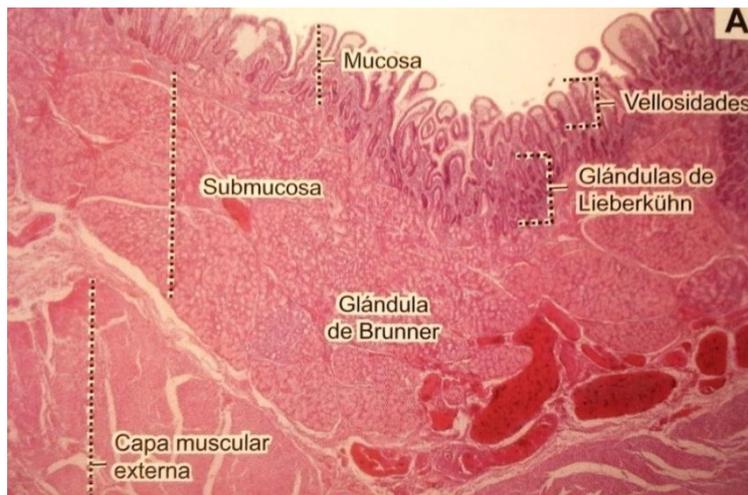


Figura 2. Mucosa, submucosa y capa muscular externa del duodeno. En la mucosa se aprecian vellosidades y glándulas de Lieberkühn y en la submucosa, las glándulas de Brunner. Tinción hematoxilina-eosina x20 (Dongmei Cui, 2011).

La submucosa posee también una característica única del duodeno, la presencia de las glándulas de Brunner (Figura 3). Estas glándulas forman cúmulos pequeños sin conductos excretores típicos y están compuestas por túbulos enrollados y ramificados, cuya pared está formada por un epitelio simple cúbico y producen mucus e iones bicarbonato para proteger la pared del duodeno del jugo gástrico ácido procedente del estómago. Se extienden hasta la flexura duodenoyeyunal y faltan en yeyuno e íleon. Y la última diferencia, es la presencia de capa adventicia en lugar de serosa (Young, 2014).

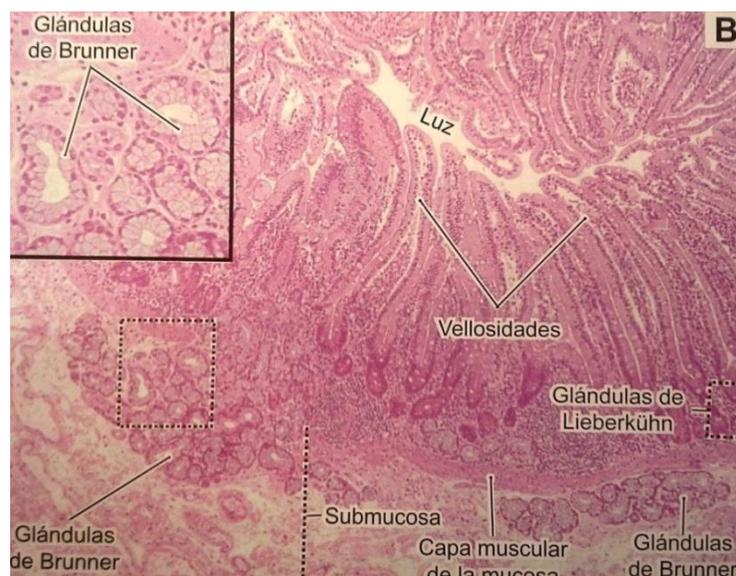


Figura 3. Glándulas de Brunner en la submucosa del duodeno. Tinción hematoxilina eosina x40 (Dongmei Cui, 2011).

3.2. SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO

3.2.1. Plexos nerviosos

El tubo digestivo tiene un sistema nervioso propio, llamado sistema nervioso entérico (SNE), que se encuentra en la totalidad de su pared, desde el esófago hasta el ano. El tracto gastrointestinal está inervado por neuronas intrínsecas del SNE y por nervios extrínsecos parasimpáticos, simpáticos y sensoriales, los cuales tienen un papel esencial en las funciones gastrointestinales. Las neuronas entéricas son las encargadas del control neuronal de la función gastrointestinal, se localizan en pequeños ganglios unidos por fibras nerviosas, formando una red, que discurre a lo largo del tracto gastrointestinal. El sistema nervioso entérico se compone de un gran número de neuronas y células gliales agrupadas en ganglios, interconectados e intercalados en la pared del intestino. Dichos ganglios entéricos se organizan en dos plexos principales: 1) plexo submucoso o de Meissner, situado a nivel de la submucosa y formado por fibras nerviosas amielínicas y células ganglionares, y su principal función es la regulación de secreciones gastrointestinales y el control de la función celular epitelial y 2) plexo mientérico o de Auerbach, localizado entre las capas musculares longitudinal y circular, el cual, contiene los somas de neuronas parasimpáticas postganglionares y de neuronas del sistema nervioso entérico, y ejerce un control fundamental sobre la motilidad del tracto digestivo (Welsch, 2014). Ambos plexos pueden funcionar de manera independiente, pero el parasimpático (fibras estimuladoras preganglionares) y el simpático (fibras inhibitorias postganglionares), con regularidad, ejercen influencia sobre ellos (Guyton, 2012).

El plexo mientérico está formado en su mayor parte por cadenas lineales de muchas neuronas interconectadas que se extienden a lo largo de todo el tubo digestivo. Este plexo interviene sobre todo en el control de la actividad motora de todo el tubo digestivo y contiene tanto neuronas excitadoras (colinérgicas) como inhibitorias (peptidérgicas). Tanto unas neuronas como otras son estimuladas por el parasimpático (en el caso del tubo digestivo, por el nervio vago). Al contrario que el plexo mientérico, el plexo submucoso se ocupa, sobre todo, de regular la función glandular (Phillips and Powley, 2007).

3.2.2. Control nervioso de la función gastrointestinal

A nivel del intestino delgado, la motilidad es controlada por el sistema nervioso autónomo. El sistema nervioso autónomo intrínseco del intestino delgado, que comprende los plexos de Meissner y Auerbach, se parece al gástrico. Las neuronas del plexo reciben aferencias intrínsecas de la mucosa y la pared muscular del intestino delgado, así como aferencias extrínsecas del sistema nervioso central a través de los troncos parasimpáticos y simpáticos (Guyton, 2012). La contracción de la muscular se coordina para conseguir dos objetivos: 1) mezclar y movilizar el contenido de un segmento intestinal (movimiento de mezcla) y 2) propulsar el contenido intestinal cuando se produce una contracción proximal (oral) coordinada con una relajación distal (movimientos propulsivos: peristaltismo) (Kierszenbaum y cols, 2012).

Los movimientos de mezcla (segmentación) se refieren a constricciones musculares de la luz, que suceden de manera simultánea en diferentes segmentos intestinales para mezclar el quimo de la forma más completa posible. El peristaltismo es el movimiento básico propulsivo del tubo digestivo que permite el desplazamiento del contenido intestinal, y para que se lleve a cabo, es necesario un plexo mientérico activo. Alrededor del intestino, se crea un anillo de contracción que se desplaza hacia delante, de tal forma que cualquier material situado delante del anillo se desplazará hacia adelante. En el intestino delgado, las ondas peristálticas empujan el quimo a lo largo de todo el intestino delgado. Estas ondas se producen ante la presencia de quimo en cualquier punto del intestino delgado y en condiciones normales son muy débiles, por lo que el movimiento hacia delante del quimo es muy lento (se necesitan de 3 a 5 horas para que llegue desde el píloro a la válvula íleocecal). Estas ondas lentas son producidas por un tipo celular exclusivo, con frecuencia relacionado con terminaciones nerviosas autónomas. Estas células marcapaso que no son tipificadas como neuronas, sino como unas células especializadas en la génesis de las ondas peristálticas son células identificadas como células intersticiales de Cajal (ICCs). Estas células constituyen alrededor de 5% de las células de la capa muscular y tienen largas prolongaciones que unen a las diferentes ICCs entre sí y a las células de músculo liso por uniones comunicantes. Las uniones comunicantes permiten que la despolarización se propague de una célula a la siguiente. Las contracciones de segmentación del intestino son una consecuencia de esto (Ira Fox, 2012).

El sistema nervioso entérico está considerado como un sistema integrado comparable al sistema nervioso central (SNC), capaz de mediar actividades reflejas independientemente del SNC. Las células gliales entéricas representan el equivalente

morfológico y funcional de los astrocitos del SNC, con los que comparten funciones como, por ejemplo, sostén estructural y metabólico y protección de las neuronas entéricas. Sin embargo, algunos estudios recientes indican que las células gliales entéricas también participan en la neurotransmisión entérica junto con las ICCs y contribuirían a coordinar las actividades de los sistemas nervioso e inmunitario intestinales (Yan-Bo, 2014).

3.3. ENVEJECIMIENTO

3.3.1. Concepto

El envejecimiento es un proceso multifactorial que comienza al alcanzar la edad adulta y que se caracteriza por la disminución progresiva de la capacidad funcional en todos los tejidos y órganos del cuerpo. Durante el envejecimiento se producen una serie de cambios que afectan tanto al aspecto biológico como al psicológico de la persona, hasta llegar a la detención de nuestros sistemas autorreguladores, llevando inevitablemente a la muerte (Bernis, 2004). El envejecimiento en sí, no es una enfermedad, sino que es un proceso fisiológico que tiene lugar continua y progresivamente hasta la muerte de cada ser vivo. Las enfermedades asociadas a la vejez no son parte del proceso de envejecimiento, sino que son consecuencia del mismo. Las personas de edad avanzada desarrollan ciertas enfermedades, como cáncer, demencias o problemas cardiovasculares, y se trata de enfermedades asociadas al envejecimiento, ya que el proceso de deterioro de la capacidad funcional deja al individuo expuesto a desarrollarlas (Salvador-Carulla, 2003).

3.3.2. Teorías del envejecimiento

Aunque no se conocen los mecanismos moleculares que condicionan el fenómeno del envejecimiento, son numerosas las teorías formuladas que han surgido a lo largo de los años para tratar de analizarlo. Estas teorías se han dividido en dos tipos: teorías deterministas y teorías estocásticas.

En primer lugar, las teorías deterministas proponen que el envejecimiento es algo predeterminado, algo “programado innatamente” dentro del genoma de cada organismo y para estudiarlo no recurren a ningún cálculo probabilístico. Dentro de ellas, se encuentran teorías como la capacidad replicativa finita de las células (Hayflick y Moorhead, 1961) donde se comprobó que las células tenían un límite de replicación

y que a partir de ahí, su capacidad para replicarse empieza a descender. Otras teorías deterministas son las tres teorías evolutivas. La primera de ellas postula que el envejecimiento es una adaptación necesaria y que sin ella la renovación de las poblaciones estaría perjudicada; la segunda propone que las mutaciones perjudiciales son las responsables del envejecimiento; y la tercera sugiere que se trata de un desajuste entre la supervivencia tardía y la fecundidad temprana (Kirkwood, 1991). Por último, otra teoría, la que realiza la hipótesis de los genes determinantes de la longevidad (Cutler, 1975), propone que el envejecimiento no está programado genéticamente, sino que es el resultado de procesos biológicos normales necesarios para la vida.

En segundo lugar, las teorías estocásticas proponen que el envejecimiento es producto del azar y que debe ser estudiado recurriendo a cálculos probabilísticos, o lo que es lo mismo, que el envejecimiento se produce como consecuencia de alteraciones que ocurren de forma aleatoria. Dentro de éstas se estudian un conjunto de teorías que por un lado consideran al genoma como la causa principal de envejecimiento y por otro lado, al entorno celular como responsable del deterioro de la homeostasis (Salvador-Carulla, 2003).

Dentro de este tipo de teorías algunas como las teorías genéticas (Slagboom, 1989), que dan al entorno celular el papel de ser el responsable de todos los daños provocados al azar en el ADN. La teoría de la mutación somática (Szilard, 1959), considera que una acumulación de mutaciones en el ADN nuclear de las células somáticas daría lugar a una disminución de las funciones celulares, y consecuentemente a envejecer.

Otras teorías, como la teoría error-catástrofe (Orgel, 1963) y modificada por el mismo autor en 1970, propone que los errores cometidos al azar en la síntesis de proteínas llevan con el tiempo, a la alteración del propio ADN y otras biomoléculas, causando la producción de "proteínas defectuosas". Según esta teoría, el envejecimiento estaría demostrado por la existencia de estas proteínas, pero se ha demostrado que esto no es así, según afirmó este autor.

Otras teorías como la de las uniones cruzadas de estructuras celulares (Brownlee, 1991), propone la formación de enlaces moleculares entre proteínas o cadenas de ácidos nucleicos, que aumenta con la edad, o la teoría de la acumulación de productos de desecho (Sheldrake, 1974), que propone que el envejecimiento está producido por la acumulación de productos citoplasmáticos, algunos de ellos perjudiciales para la

célula como es el caso de la lipofuscina. Dichos productos de desecho no pueden destruirse, ni transportarse, lo cual hace que se acumulen dando lugar al envejecimiento.

Y por último, dentro de las teorías estocásticas, también se encuentra la teoría de los radicales libres (Harman, 1956) que es probablemente la teoría más aceptada. Dicha teoría postula que el envejecimiento ocurre como consecuencia del cúmulo de lesiones moleculares provocadas por reacciones de los radicales libres en las células a lo largo de la vida. Los radicales libres son átomos o moléculas extremadamente reactivas debido a que en el orbital más externo de su estructura tienen uno o más electrones sin aparear. Las reacciones de los radicales libres contribuyen al desarrollo de desórdenes estocásticos observados durante el envejecimiento (Balaban, 2005). El dogma central de la teoría de los radicales libres sostiene que durante el metabolismo aerobio se producen especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO) que una vez generadas, promueven reacciones que dañan las macromoléculas de la célula. Este daño irreversible se acumula con el tiempo, resultando en una pérdida de la capacidad funcional de la célula. Las principales dianas atacadas por los radicales libres son las membranas celulares a nivel de sus moléculas (proteínas, hidratos de carbono y lípidos) y el genoma. La mitocondria es la principal fuente de radicales libres en el organismo y el ADN-mitocondrial es especialmente sensible a la agresión oxidativa porque carece de histonas. Por lo tanto, el genoma nuclear y el mitocondrial son especialmente vulnerables frente al daño producido por la acumulación de radicales, y el envejecimiento resulta, como ya se ha mencionado, por acumulación de este daño no reparado. Una alteración en la función mitocondrial conlleva a un exceso en la formación de especies reactivas de oxígeno que pueden causar alteraciones estructurales y funcionales en todos los tipos de biomoléculas (Cadenas y cols, 2000).

El envejecimiento se ha asociado a un incremento en la concentración de radicales libres, posiblemente por la reducción de la actividad antioxidante o el incremento de factores prooxidantes, lo cual deriva en un descontrol en la producción y eliminación de radicales que se refleja en la elevación del daño oxidativo celular y se manifiesta en diversas afecciones que tienen lugar durante la vejez. Si bien el proceso de envejecimiento depende de varios factores, el estrés oxidativo es un aspecto crucial en el desarrollo del mismo, ya que una vez iniciado el daño por los radicales libres, éste puede generar una reacción en cadena que termina por inducir un daño en esta etapa vital. Las membranas celulares, formadas principalmente por una bicapa lipídica con proteínas intercaladas, son muy sensibles al ataque de los radicales libres,

pudiendo estos interactuar con los lípidos y proteínas de la membrana. Los lípidos, y dentro de ellos los fosfolípidos, representan el grupo más susceptible para sufrir reacciones con los radicales libres, debido a la presencia de dobles enlaces en sus ácidos grasos, lo que se conoce con el nombre de “peroxidación lipídica” (Balaban y cols, 2005).

La peroxidación lipídica comienza con la sustracción de un átomo de hidrógeno del resto acilo, seguida por la formación de un conjugado dieno y posteriormente por la combinación con el oxígeno para formar un nuevo radical libre peroxilo que tiene suficiente potencia como para atacar a un resto acilo de un fosfolípido vecino, propagando así la reacción de la peroxidación por toda la membrana. Debido a esto, la peroxidación lipídica es el mecanismo por el que las membranas celulares pierden su fluidez y permeabilidad y también explica la oxidación de lipoproteínas plasmáticas (LDL) que se convierten en sustancias muy aterogénicas. La aterosclerosis en la vejez y las consecuencias de esta alteración sobre los vasos sanguíneos está más acentuada en situaciones de estrés oxidativo (Cadenas y cols, 2000). Por lo tanto, el deterioro que sufren paulatinamente nuestras moléculas orgánicas y la pérdida de su función biológica por el estrés oxidativo al que están sometidos los seres aeróbicos, es suficiente para explicar el inicio y la progresión de distintos cuadros fisiopatológicos y enfermedades degenerativas del propio proceso de envejecimiento (Balaban y cols, 2005).

3.3.3. Envejecimiento del tubo digestivo

Con el paso de los años, en nuestro organismo se producen cambios fisiológicos importantes que afectan a todos los órganos, sistemas y aparatos. Comúnmente, el tracto digestivo tiene una considerable capacidad de reserva y mantiene una función fisiológica normal o casi normal, incluso al llegar a edades muy avanzadas. Sin embargo, hay un aumento en la incidencia de los trastornos gastrointestinales de la motilidad durante el proceso de envejecimiento.

En cuanto a la absorción, tiene lugar una discreta disminución de la capacidad absorbente de los hidratos de carbono en personas de edad avanzada cuyas consecuencias, son poco apreciables ya que esta disminución es subclínica y no produce malnutrición. Lo que sí tiene importancia es la reducción de la capacidad de hidrolizar la lactosa a nivel del borde en cepillo de los enterocitos, responsable del incremento de la prevalencia de la intolerancia a la lactosa en la población anciana (45-50%). En cuanto a las proteínas, su absorción no parece afectarse. En cuanto a

los lípidos, la absorción de colesterol, trioleína y ácido oleico se ve reducida a partir de los 60-65 años, lo cual tiene, en principio, escasa importancia clínica. La absorción de ácido fólico y carotenos está reducida en el anciano y puede obligar a la suplementación dietética. También hay cierta deficiencia en la absorción de hierro por numerosas causas, en primer lugar por dietas pobres en hierro y por otro lado, por la hipoclorhidria gástrica existente, por lo que la conversión de hierro férrico a ferroso no es del todo efectiva y se absorbe peor.

Con respecto a los cambios histológicos, las vellosidades intestinales se hacen más cortas y anchas, aumenta la proporción de vellosidades en forma de hoja y la relación cripta vellosidad no es de 1:3, sino de 1:1,5. También se ha apreciado cierto grado de atrofia glandular, aumento de fibrosis mucosa y disminución de las placas de Peyer del íleon, de los folículos linfoides y de los linfocitos intestinales, añadiendo a todo esto una basofilia generalizada. No se han observado cambios en relación a la profundidad de las criptas, enterocitos, borde en cepillo y glándulas de Brunner (Salvador-Carulla, 2003).

En líneas generales, las enfermedades más frecuentes del tracto digestivo a partir de los 50 años son muy variadas, desde la hernia hiatal y la gastritis crónica hasta la enfermedad diverticular y los tumores malignos digestivos. En el esófago, es frecuente, la reducción del peristaltismo, así como de la presión del esfínter esofágico inferior, aumentando la presencia de reflujo gastroesofágico en edades avanzadas. La motilidad y vaciamiento gástricos, así como la motilidad intestinal, son por lo general, normales en los individuos sanos, aunque puede haber cierta tendencia a tener una motilidad y vaciamiento gástrico retardados (Salles, 2007). Además, en personas mayores de 65 años, se ha detectado una mayor incidencia de problemas funcionales tales como estreñimiento, síndrome de colon irritable o disfagia (Talley y cols, 1992).

3.3.4. Edad y sistema nervioso

El sistema nervioso es especialmente vulnerable al envejecimiento, hecho que se puede comprobar en las personas de edad avanzada, donde se observa alteraciones en las capacidades sensitivas, como problemas visuales y auditivos, en las capacidades cognitivas, alteraciones de memoria, y las capacidades motoras, como problemas en velocidad y coordinación, con más frecuencia que en edades jóvenes. Los cambios que afectan al sistema nervioso central durante el envejecimiento, se dividen en tres niveles, nivel morfológico, neuronal y bioquímico.

En cuanto a los cambios morfológicos, en primer lugar se observan cambios macroscópicos en el cerebro del anciano, que son descenso en el peso y volumen en torno a un 10-15% en relación a la cavidad craneana, lo que conlleva una importante reducción de la sustancia gris y la sustancia blanca. Además, en el anciano los surcos interhemisféricos se encuentran agrandados y son más profundos, y se producen también modificaciones en los vasos sanguíneos, donde tiene lugar un engrosamiento de su pared, reduciendo la elasticidad y la luz del vaso. Por otro lado, los cambios microscópicos observados son aumento de los depósitos de gránulos de lipofucsina, producto intermediario de la autofagia, tanto en neuronas como en células gliales, y otros cambios como aparición de ovillos neurofibrilares (conglomerado anormal de proteínas), de placas neuríticas por depósito de proteína beta-amiloide, atrofia y muerte neuronal (Timiras, 2003).

A nivel neuronal, el envejecimiento afecta de manera diferente a las distintas áreas del sistema nervioso. En el sistema nervioso central no existe atrofia neuronal generalizada, sino que ocurre en ciertas áreas como la corteza cerebral y el cerebelo, donde el número de neuronas disminuye de forma moderada con la vejez, mientras que en otras como el locus coeruleus (neuronas catecolaminérgicas) o en la sustancia negra (dopaminérgicas), la pérdida puede ser severa. Se ha demostrado que con el envejecimiento se produce una proliferación de astrocitos (gliosis reactiva) para paliar los efectos de la reducción de las neuronas que van degenerando a lo largo de la vida, de tal forma que aunque el número de neuronas se reduce durante el ciclo vital, el número de células de glía se incrementa como efecto compensatorio (Li L y cols, 2008). También se ha detectado una disminución en el número de dendritas, así como alteraciones en la función sináptica y la transmisión nerviosa (Timiras, 2003).

Por último, los cambios bioquímicos se producen a nivel de los neurotransmisores presentes en el sistema nervioso central, los más afectados son acetilcolina, dopamina y noradrenalina, que disminuyen de una manera progresiva con el paso de los años (Timiras, 2003).

Dichos efectos observados en el sistema nervioso central, también se han demostrado en el sistema nervioso entérico, confiriéndole a ambos características similares. Durante el envejecimiento, los cambios producidos en el sistema nervioso entérico tienen lugar sobre todo, a nivel del plexo miéntérico, plexo submucoso y células de la glía. Uno de los primeros trabajos realizados para demostrar los posibles cambios en las neuronas mientéricas en el envejecimiento lo llevaron a cabo Santer y Baker (1988), quienes describieron una pérdida neuronal del plexo mientérico con la

edad en ratas. También han sido estudiadas, aunque en menor medida, otras especies, como cobaya (Gabella, 1989), ratón (El-Shaly y cols, 1999) e incluso humanos (De Souza y cols, 1993; Gomes y cols, 1997).

A nivel del plexo submucoso, los cambios han sido menos analizados en comparación con el plexo mientérico. Estos cambios se han estudiado en colon proximal y distal de la rata (Phillips y cols, 2007) habiéndose encontrado una pérdida de neuronas del plexo submucoso a partir de los 12 meses de edad. El-Salhy y cols (1999) describieron también un descenso significativo de neuronas en plexo submucoso del antro, duodeno y colon en ratones de edad avanzada. Respecto a las células de la glía en el plexo mientérico, se han observado descensos significativos en duodeno, yeyuno, íleon y colon de ratas ancianas de 25 meses de edad (Phillips y Powley, 2007).

4. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

A nivel de cortes histológicos del duodeno de tres grupos de edad, de 3 meses (grupo 1), 12 meses (grupo 2), 24 meses (grupo 3), se realizan las siguientes mediciones:

1) Cálculo de las áreas de la pared de la túnica submucosa y de la muscular, a partir de imágenes mosaico, previamente realizadas, que representan todo el corte histológico, en los 3 cortes, 1 por cada grupo de edad. Para ello, se establecen 3 áreas: área 1, cuyo límite es el borde más externo de la sección transversal, que corresponde a la muscular externa; área 2, justo por encima de la muscular interna, en el borde más próximo a la mucosa; y área 3, cuyo límite de referencia corresponde justo por debajo de las criptas de Lieberkühn, a nivel infracriptal.

De esta forma, se calculará el espesor de la pared submucosa, que será el valor resultante de la diferencia entre el área 2 y área 3, y el espesor de la pared muscular, la que se obtenga de la diferencia entre área 1 y 2.

2) Cálculo de las áreas de los plexos submucoso y mientérico, sobre imágenes mosaico realizadas previamente, y en relación a los resultados obtenidos a nivel de las áreas de la pared de la túnica submucosa y muscular respectivamente en los mismos casos de estudio.

3) Representación por imagen de los resultados obtenidos en cada grupo.

4) Planteamiento de un estudio posterior, ampliando el número de casos por grupo para posibilitar la comparación entre ellos y realizar un estudio estadístico.

OBJETIVOS

Según este planteamiento de trabajo se pretenden obtener los siguientes objetivos concretos:

Primero: Estudiar los efectos del envejecimiento en el sistema nervioso entérico duodenal.

Segundo: Analizar la influencia del envejecimiento a nivel de las áreas de los plexos submucoso y mientérico.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. INMUNOHISTOQUÍMICA

5.1.1. Fundamento

La inmunohistoquímica es una técnica que permite detectar *in situ* componentes celulares y extracelulares (antígeno) por medio de anticuerpos específicos, empleando para ello, sistemas de detección enzimáticos. Se trata de una técnica que ha revolucionado la investigación y el diagnóstico morfofuncional. La inmunohistoquímica tiene su antecedente en 1941, Coons y cols fueron los pioneros empleando un anticuerpo marcado con isocianato de fluoresceína para detectar bacterias, dando origen a los métodos de inmunofluorescencia. Sin embargo, estos métodos presentaban varios inconvenientes, entre ellos, la necesidad de utilizar tejido fresco, así como requerir de objetivos especiales para microscopio de fluorescencia, que son más costosos y de cuyas imágenes se obtiene una menor resolución para describir morfología que con el microscopio óptico convencional. Por el contrario, las secciones de tejido en las que se utiliza un enzima como trazador unido a un anticuerpo pueden tratarse mediante el procesado habitual y conservarse para su observación permanentemente. Estos hechos han limitado la utilización de la inmunofluorescencia, y sentaron las bases de la inmunohistoquímica.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas empleados en inmunohistoquímica son generalmente de clase IgG, producidos por los linfocitos B en cantidades importantes, al inyectarle a un animal una molécula que reconoce como extraña. Estos anticuerpos están presentes en el suero del animal inmunizado, se extraen y purifican. Cada determinante antigénico activará un clon o grupo de linfocitos B, que producirán anticuerpos contra él. Las moléculas complejas, como las proteínas, tienen en su estructura varios determinantes antigénicos capaces de desencadenar una respuesta inmune. Los anticuerpos utilizados pueden ser de dos tipos, policlonales y monoclonales. Los primeros están sintetizados por diferentes clones de linfocitos B y, en consecuencia, son inmunológicamente distintos, por lo que reaccionan con varios epítopos de un antígeno contra el que han sido producidos. Por el contrario, los anticuerpos monoclonales están producidos por un sólo clon de células plasmáticas, son inmunológicamente idénticos y reaccionan con un epítipo específico que es el antígeno contra el que han sido preparados. El éxito actual de la inmunohistoquímica reside, en buena medida, en la gran oferta comercial de anticuerpos, su alta especificidad y afinidad para reconocer y unirse a moléculas y también en la

estandarización de su protocolo. Todo ello, ha determinado que la inmunohistoquímica se haya convertido en el método de elección para detectar la presencia de moléculas en los tejidos, incluso aunque éstas se encuentren en cantidades ínfimas (Kumar y Rudbeck, 2009).

La localización del complejo antígeno-anticuerpo a nivel tisular exige la unión de los anticuerpos a marcadores que permitan su detección. Estos marcadores pueden ser fluorescentes (los que anteriormente se utilizaban en inmunofluorescencia) o enzimáticos (los utilizados en inmunohistoquímica). Hay dos métodos de detección, directos e indirectos, método de detección directo se denomina a la conjugación directa de un enzima trazador con una inmunoglobulina, y método de detección indirecto, que actualmente suele emplearse con más frecuencia, consiste en situar una serie de intermediarios entre la inmunoglobulina y la molécula marcadora. De esta forma, permite una mayor versatilidad de la técnica e intensidad de señal frente a la misma concentración de antígeno.

Entre los métodos indirectos, destacan los que utilizan un sistema de peroxidasa-antiperoxidasa y los del complejo avidina-biotina-peroxidasa. La primera técnica de la inmunoperoxidasa fue descrita por Nakene y Pierce (1967). Desde entonces, se han producido muchos avances que han aumentado la sensibilidad con respecto a las primeras técnicas. Un desarrollo reciente ha sido el uso del marcador polimérico. Esta tecnología se ha aplicado tanto a los anticuerpos primarios como a los sistemas de detección. Se trata de conjugados poliméricos de unión con peroxidasa, en los que no presentan el problema de la tinción inespecífica producido con los sistemas de detección de estreptavidina y biotina, debido a la biotina endógena. En este estudio, se ha utilizado la detección indirecta mediante esta última metodología más beneficiosa. Siempre que se realice una inmunotinción, en el mismo portaobjetos debe ponerse un control de tejido positivo para el marcaje que se quiere realizar, a fin de atestiguar que la técnica se ha realizado correctamente.

5.1.2. Técnica inmunohistoquímica

El proceso de la técnica inmunohistoquímica se desarrolló en varias etapas: 1) Desenmascaramiento antigénico; 2) inhibición de la actividad enzimática endógena; 3) exposición a anticuerpos primarios; 4) exposición a anticuerpos secundarios; 5) revelado y contratinción.

5.1.2.1 Desenmascaramiento antigénico

Esta etapa se realizó de forma previa a la exposición con los anticuerpos, con objeto de lograr la mejor capacidad de reacción antígeno-anticuerpo posible. Para ello, existen diversos métodos, tales como el tratamiento con saponinas, detergentes, enzimas proteolíticos, o el calor. En este trabajo, se utilizó la exposición a calor mediante olla a presión, en la cual se alcanzaron temperaturas superiores a la ebullición (130 °C).

En una olla a presión de 5,5 L, se vertieron 2 L de tampón de citrato sódico 10mM y se colocaron, en un cestillo metálico, los portaobjetos silanizados con las muestras incluidas. Cuando se alcanzó la presión máxima en la olla, ésta se mantuvo durante 2 minutos en ebullición. Después, los portas se sumergieron en un tampón fosfato salino (PBS) (Kumar y Rudbeck, 2009).

5.1.2.2. Inhibición de la actividad enzimática endógena

Aunque pueden emplearse varias enzimas como elementos trazadores, la más utilizada es la peroxidasa, seguida de la fosfatasa alcalina y la glucosa oxidasa. Estas enzimas están presentes en el tejido que se va a examinar, por lo que su actividad endógena debe inhibirse antes de la inmunotinción, ya que, de no bloquearse ésta, su actividad endógena reaccionaría con el sustrato empleado para localizar la enzima marcadora, originando falsos positivos (Kumar y Rudbeck, 2009). En este trabajo, se utilizó la incubación con H₂O₂.

5.1.2.3. Exposición a los anticuerpos primarios

Con la antigenicidad del tejido ya desenmascarada, y de forma previa a la exposición de las muestras al anticuerpo primario, éstas se trataron con caseína al 0,4% en una solución de PBS cuya finalidad fue reducir la unión inespecífica de los anticuerpos primarios y del polímero. Tras dos lavados con PBS, posteriormente los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario en una cámara húmeda. Se utilizó un anticuerpo primario frente a la proteína S-100. Ésta se expresa en las células neurales y gliales, células de Schwann del nervio periférico, tejido adiposo y cartilaginoso, células de Langerhans, mioepiteliales, melanocitos, así como en los tumores que derivan de estas células y presenta un patrón de tinción citoplasmática y nuclear.

5.1.2.4. Exposición a los anticuerpos secundarios

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las secciones de tejido se trataron durante 30 minutos con suero animal en una solución de PBS. El anticuerpo secundario y la enzima trazadora, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esto consistió en un conjugado polimérico de IgG con la enzima peroxidasa de rábano picante polimérica, además de suero animal al 10% en PBS. Este complejo es capaz de reconocer todos los anticuerpos primarios ligados al tejido.

5.1.2.5. Revelado y contratinción

Para que se pueda visualizar la región tisular donde ha tenido lugar la unión antígeno-anticuerpo primario y secundario, se requiere la adición del sustrato de la enzima y un cromógeno. De esa forma, aparecerá un precipitado insoluble y coloreado. En nuestro caso, el sustrato fue el H_2O_2 y el cromógeno, el 3,3-tetracloruro de diaminobencidina (DAB). La contratinción de los cortes tratados se realizó con hematoxilina de Harris, tras los cuales éstos se aclararon en agua (Kumar y Rudbeck, 2009).

5.2. ESTUDIO MORFOMÉTRICO

5.2.1. Protocolo del estudio morfométrico. Variables

Una de las limitaciones más importantes de los estudios morfológicos es que, a menudo, se llegan a conclusiones a partir de la simple observación con el microscopio, sin la realización de un riguroso estudio estadístico de contraste de hipótesis. Cuando lo que pretendemos es comparar grupos de estudio de diferentes edades, el sesgo que puede cometerse en la apreciación de un fenómeno morfológico se agrava todavía más. Con objeto de validar las observaciones realizadas con el microscopio óptico, se decidió realizar un estudio morfométrico que, mediante una potente aplicación informática de tratamiento de imágenes, permitiera la cuantificación de los fenómenos observados, a los que posteriormente se les aplicó un análisis estadístico. En el estudio S-100, se analizó un corte por grupo de edad.

Antes de la realización del estudio morfométrico, fue necesario construir una imagen en mosaico formada por la integración de 10 a 30 imágenes aisladas capturadas a 200 aumentos, que compondrían el corte del tejido a analizar. Los datos registrados en el estudio morfométrico de cada corte transversal de duodeno fueron de dos tipos: en primer lugar, los correspondientes a las áreas de los plexos submucoso y mientérico

con marcaje inmunohistoquímico positivo frente a la proteína S-100, lo que indicaría la superficie ocupada por los plexos nerviosos. Este procedimiento posibilitó que el valor absoluto, obtenido para cada corte, de la región con marcaje positivo frente a S-100, pudiera ser corregido por la superficie total de las capas submucosa y muscular, donde se localizaron dichos marcajes positivos inmunohistoquímicos. Esta corrección permitió la comparación entre individuos y entre grupos, sin cometer los sesgos que se hubieran derivado del mero contaje absoluto de los marcajes, ya que, lógicamente, aquellos cortes con mayor superficie hubieran conllevado una mayor cantidad de tejido marcado positivamente.

Por ello, las variables obtenidas fueron las siguientes: área marcada anti S-100 del plexo submucoso, área total capa submucosa; y área positiva a S-100 del plexo mientérico, área total capa muscular.

5.2.2. Elaboración de las imágenes mosaico

El objetivo de construir mosaicos ha sido representar la totalidad de un corte transversal del duodeno, como paso previo necesario para calcular las áreas de las paredes submucosa y muscular, y las áreas de los plexos nerviosos y cuantificar. Para este propósito, se realizó una fotocomposición que resultó de la unión de varias imágenes, generalmente de 20 a 30, capturadas con el microscopio las cuales debían quedar adyacentes. Este objetivo se logró tomando como referencia estructuras concretas, como células de morfología peculiar, forma concreta de vellosidades o incluso pequeñas estructuras puntuales, especialmente cuando la imagen tenía como fondo únicamente el color blanco.

5.2.3. Estudio de las áreas de las tunicas submucosa y muscular

Este cálculo se realizó en el mosaico sobre el cual se delimitaron tres áreas (figura 4): área 1, comprende toda la circunferencia del corte a estudio, es la de mayor tamaño y tiene como límite el borde más externo de la sección transversal, que corresponde a la muscular externa; área 2, se delimitó justo por encima de la muscular interna, en el borde más próximo a la mucosa, y es la segunda en superficie; y área 3, cuyo límite de referencia corresponde justo por debajo de las criptas de Lieberkühn (por debajo de la *muscularis mucosae*) cuando estaba presente, ya que debido a su pequeño tamaño en la rata, a veces, no se visualizaba, y entonces fue el nivel infracriptal el que marcaba este límite.

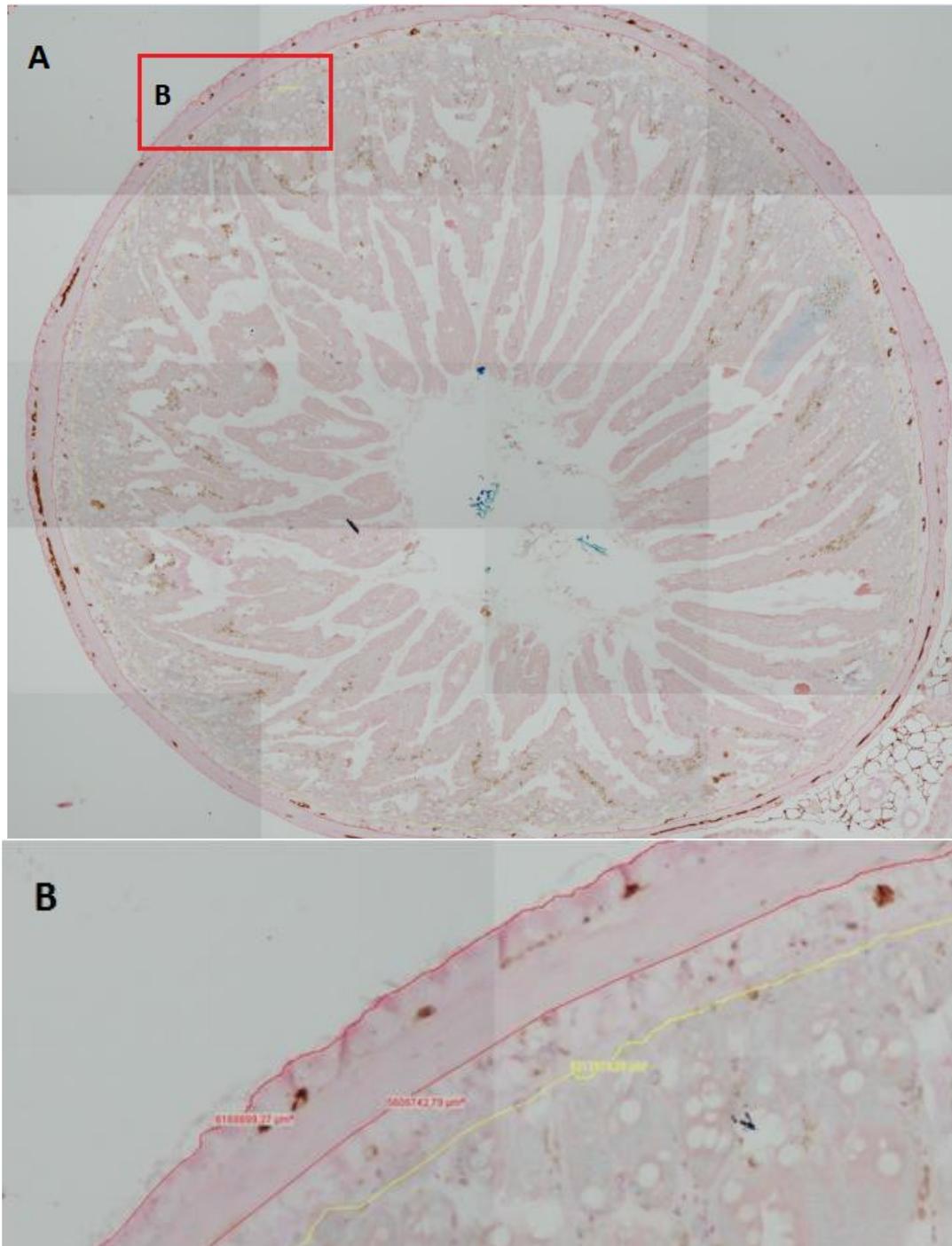


Figura 4. **A:** Cálculo de las áreas de la pared submucosa y muscular. **B:** Ampliación de la imagen anterior. El trazado rojo externo permite calcular el área de sección duodenal. El trazado rojo interno representa toda el área menos la capa muscular. De su diferencia se obtiene el área de la capa muscular. El trazado amarillo delimita la submucosa. La diferencia del área calculada, entre los límites del trazado rojo interno y el amarillo corresponde al área submucosa. La imagen corresponde a la rata del grupo 1 de 3 meses de edad. Tinción inmunohistoquímica anti S-100 con contratinción de hematoxilina. Aumento: A x20 B x40.

En la figura 4, se observa que el área de la capa muscular corresponde a la diferencia entre las áreas 1 y 2, conteniendo el plexo mientérico de Auerbach entre ambas; mientras que de la diferencia entre la 2 y 3, se obtiene el área de la capa submucosa, en cuyo espesor se halla el plexo submucoso de Meissner. Los datos obtenidos a partir de este análisis son importantes, dado que el estudio posterior, consistente en calcular las áreas que el plexo muscular y submucoso ocupan en cada corte, se hallará en relación al área de las paredes muscular y submucosa en cada caso.

5.2.4. Cálculo de las áreas de los plexos submucoso y mientérico.

Las áreas de los plexos submucoso y mientérico se calcularon a partir de la fotocomposición en mosaico construida para la tinción frente a S-100. Para ello, la aplicación informática Cell D ® dispuso de un recurso que permitió seleccionar los límites de una región de la imagen, correspondiente a un ganglio del plexo nervioso, con igual tipo y densidad de color. En esta tinción fue marrón oscuro, ya que la DAB formó precipitados insolubles de dicha coloración.

Delimitados estos bordes la aplicación calculó el área de dicha selección. La figura 5 ejemplifica el proceso del cálculo del área del plexo submucoso en el animal del grupo de tres meses. El cálculo de las áreas del plexo submucoso se hizo con el mosaico completo desplazándonos por la pantalla del ordenador en todo el plano de la fotocomposición. La figura 5B muestra 4 regiones del plexo submucoso de 180,81 μm^2 , 105,08 μm^2 , 233,14 μm^2 y 146,78 μm^2 . El sumatorio de todas las regiones del plexo submucoso fue de 12497,32 μm^2 . Como en cada corte la superficie de la submucosa, en la que se sitúa el plexo submucoso podía variar de forma considerable, el área total calculada para el plexo submucoso se corrigió por la superficie de la submucosa de cada corte.

El resultado final se expresó como un valor porcentual del área ocupada por el plexo submucoso en la submucosa. De idéntica manera, puede calcularse el área del plexo mientérico, en relación a la capa muscular.

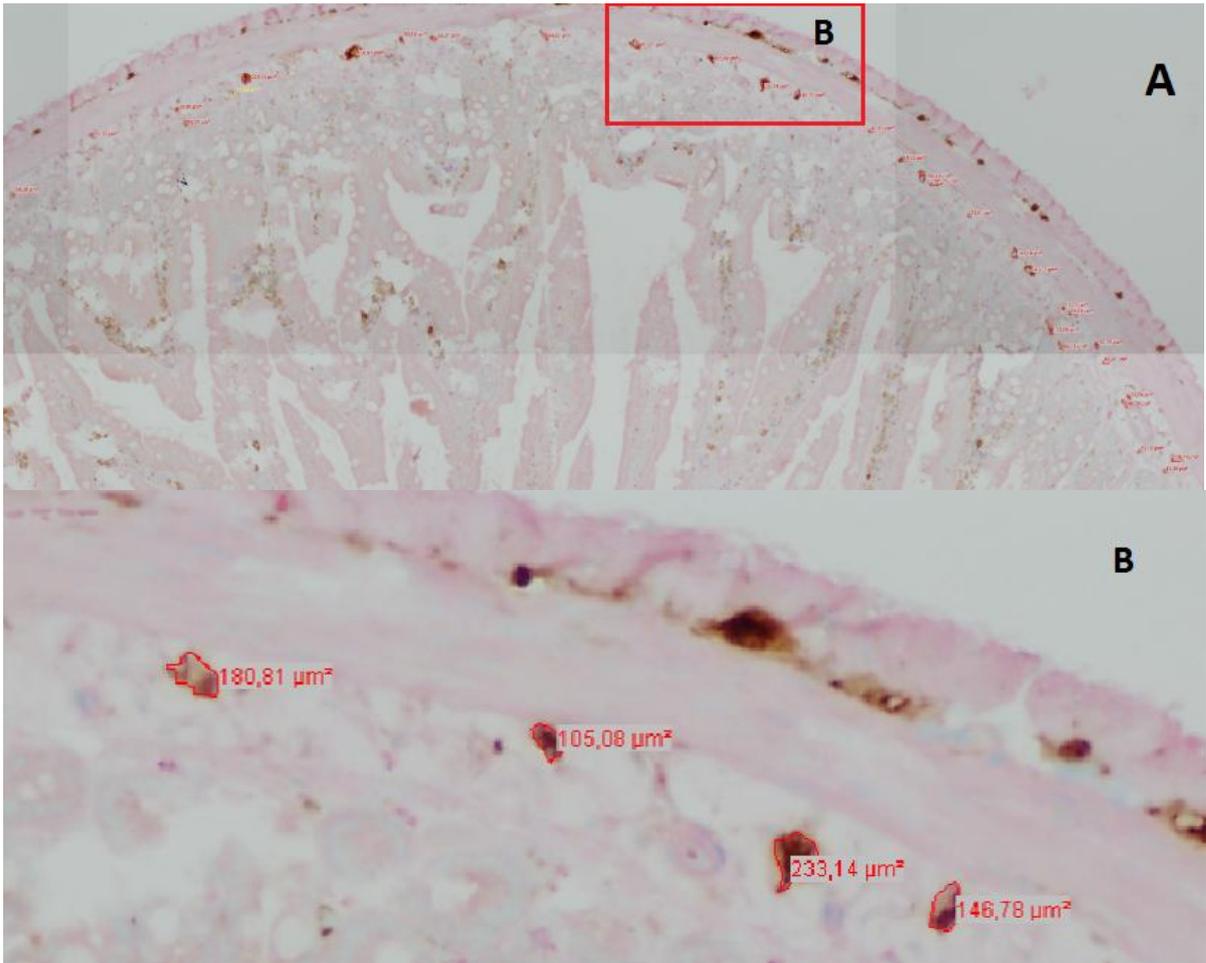


Figura 5. A: Cálculo del área del plexo submucoso en la rata de grupo 1 de 3 meses de edad. **B:** Ampliación de la imagen anterior. Cuatro áreas del plexo submucoso medidas en μm^2 en la rata del grupo 1 de 3 meses de edad. Tinción inmunohistoquímica anti S-100 con contratinción de hematoxilina. Aumento: A x20 B x40.

6. RESULTADOS

6.1. GRUPO 1, RATAS DE 3 MESES DE EDAD

En cuanto al cálculo de las áreas de la pared de la túnica submucosa y muscular, a partir de la imagen mosaico del grupo 1, se establecen las tres áreas, área 1 de $6168899,27 \mu\text{m}^2$, área 2 de $5608742,79 \mu\text{m}^2$ y área 3 de $5212979,28 \mu\text{m}^2$.

De esta forma, se calculará el espesor de la pared submucosa, que será el valor resultante de la diferencia entre el área 2 y el área 3, y cuyo valor es $395763,51 \mu\text{m}^2$.

De igual modo, se calcula el espesor de la pared muscular de la diferencia entre el área 1 y 2, dando un valor de $560156,48 \mu\text{m}^2$.

Con respecto al cálculo de las áreas de los plexos submucoso y mientérico, sobre imágenes mosaico se han delimitado las áreas de los plexos en ambas capas. El sumatorio de todos estos valores, nos dará el valor total del plexo submucoso, a nivel de la pared submucosa y del plexo mientérico, situado entre las capas musculares circular y longitudinal del duodeno.

En primer lugar, el plexo submucoso presenta las siguientes áreas: $538,61 \mu\text{m}^2$, $228,04 \mu\text{m}^2$, $191,02 \mu\text{m}^2$, $136,99 \mu\text{m}^2$, $62,11 \mu\text{m}^2$, $104,66 \mu\text{m}^2$, $56,16 \mu\text{m}^2$, $458,20 \mu\text{m}^2$, $102,96 \mu\text{m}^2$, $49,35 \mu\text{m}^2$, $670,92 \mu\text{m}^2$, $66,79 \mu\text{m}^2$, $75,73 \mu\text{m}^2$, $215,27 \mu\text{m}^2$, $126,36 \mu\text{m}^2$, $388,85 \mu\text{m}^2$, $140,40 \mu\text{m}^2$, $189,32 \mu\text{m}^2$, $159,11 \mu\text{m}^2$, $416,93 \mu\text{m}^2$, $513,51 \mu\text{m}^2$, $293,55 \mu\text{m}^2$, $341,20 \mu\text{m}^2$, $343,33 \mu\text{m}^2$, $742,82 \mu\text{m}^2$, $240,37 \mu\text{m}^2$, $142,10 \mu\text{m}^2$, $101,25 \mu\text{m}^2$, $154,44 \mu\text{m}^2$, $94,02 \mu\text{m}^2$, $146,78 \mu\text{m}^2$, $233,14 \mu\text{m}^2$, $105,08 \mu\text{m}^2$, $180,81 \mu\text{m}^2$, $56,16 \mu\text{m}^2$, $55,31 \mu\text{m}^2$, $64,67 \mu\text{m}^2$, $48,50 \mu\text{m}^2$, $33,61 \mu\text{m}^2$, $17,02 \mu\text{m}^2$, $34,04 \mu\text{m}^2$, $123,80 \mu\text{m}^2$, $62,11 \mu\text{m}^2$, $52,75 \mu\text{m}^2$, $60,41 \mu\text{m}^2$, $32,78 \mu\text{m}^2$, $86,36 \mu\text{m}^2$, $73,18 \mu\text{m}^2$, $44,25 \mu\text{m}^2$, $43,39 \mu\text{m}^2$, $84,24 \mu\text{m}^2$, $31,91 \mu\text{m}^2$, $57,43 \mu\text{m}^2$, $50,63 \mu\text{m}^2$, $58,29 \mu\text{m}^2$, $19,14 \mu\text{m}^2$, $142,10 \mu\text{m}^2$, $44,67 \mu\text{m}^2$, $46,37 \mu\text{m}^2$, $201,66 \mu\text{m}^2$, $36,16 \mu\text{m}^2$, $271,86 \mu\text{m}^2$, $275,39 \mu\text{m}^2$, $174,86 \mu\text{m}^2$, $38,72 \mu\text{m}^2$, $63,39 \mu\text{m}^2$, $53,18 \mu\text{m}^2$, $48,07 \mu\text{m}^2$, $39,14 \mu\text{m}^2$, $76,38 \mu\text{m}^2$, $51,48 \mu\text{m}^2$, $25,53 \mu\text{m}^2$, $93,17 \mu\text{m}^2$, $44,67 \mu\text{m}^2$, $109,34 \mu\text{m}^2$, $402,47 \mu\text{m}^2$, $70,20 \mu\text{m}^2$, $37,01 \mu\text{m}^2$, $50,20 \mu\text{m}^2$, $83,39 \mu\text{m}^2$, $69,35 \mu\text{m}^2$, $25,95 \mu\text{m}^2$ y $41,69 \mu\text{m}^2$.

El sumatorio de todos estos plexos da un valor total de $12497,32 \mu\text{m}^2$. Para calcular el porcentaje que ocupa el plexo submucoso con respecto a la túnica submucosa, se divide el valor del sumatorio de todas las áreas de los plexos ($12497,32 \mu\text{m}^2$) entre el espesor de la túnica submucosa ($395763,51 \mu\text{m}^2$) y se multiplica por 100 para obtener el resultado en tanto por ciento, dando como resultado 3,15 %. Es decir, el plexo submucoso ocupa un 3,15 % de toda la túnica submucosa.

Se realiza lo mismo con el plexo mientérico, que presenta los siguientes valores para los plexos: 79,98 μm^2 , 112,74 μm^2 , 101,25 μm^2 , 88,49 μm^2 , 170,60 μm^2 , 76,58 μm^2 , 124,23 μm^2 , 83,81 μm^2 , 1495 μm^2 , 43,39 μm^2 , 56,16 μm^2 , 85,51 μm^2 , 123,38 μm^2 , 365,88 μm^2 , 156,14 μm^2 , 134,01 μm^2 , 117 μm^2 , 2188,47 μm^2 , 235,69 μm^2 , 2296,53 μm^2 , 112,32 μm^2 , 20,85 μm^2 , 122,53 μm^2 , 77 μm^2 , 160,82 μm^2 , 55,31 μm^2 , 98,28 μm^2 , 1771,54 μm^2 , 104,23 μm^2 , 266,75 μm^2 , 123,38 μm^2 , 210,59 μm^2 , 242,93 μm^2 , 2169,75 μm^2 , 541,59 μm^2 , 294,83 μm^2 , 253,14 μm^2 , 382,47 μm^2 , 1053,82 μm^2 , 1064,45 μm^2 , 317,80 μm^2 , 67,22 μm^2 , 75,73 μm^2 , 95,72 μm^2 , 112,32 μm^2 , 53,61 μm^2 , 243,78 μm^2 , 140,82 μm^2 , 110,19 μm^2 , 67,22 μm^2 , 134,86 μm^2 , 143,37 μm^2 , 123,38 μm^2 , 120,40 μm^2 , 127,63 μm^2 , 75,73 μm^2 , 122,10 μm^2 , 97,85 μm^2 , 138,69 μm^2 , 285,05 μm^2 , 69,77 μm^2 , 259,52 μm^2 , 317,80 μm^2 y 61,26 μm^2 . El sumatorio de todas las áreas da un resultado de 20623,74 μm^2 . Se calcula el porcentaje al igual que para el plexo submucoso, pero en este caso para saber el valor del porcentaje del plexo mientérico (20623,74 μm^2) con respecto a la túnica muscular (560156,48 μm^2), dando como resultado 3,68 %.

6.2. GRUPO 2, RATAS DE 12 MESES DE EDAD

Se realiza lo mismo para el corte histológico del grupo 2 en ratas de 12 meses de edad. En primer lugar, se calculan las áreas de la pared de la túnica submucosa y de la túnica muscular, a partir de los valores obtenidos de las tres áreas, área 1 de 5196668,29 μm^2 , área 2 de 4126071,10 μm^2 , y área 3 de 3646260,44 μm^2 .

A partir de estos valores se calcula, primero, el área de la túnica submucosa, que será la diferencia entre el área 2 y área 3, cuyo resultado es 479810,66 μm^2 .

El área de la túnica muscular, se obtiene se la diferencia entre área 1 y área 2, dando un valor de 1070597,19 μm^2 .

Para realizar el cálculo de las áreas de los plexos submucoso y mientérico, se han delimitado las áreas de los plexos en ambas capas.

El plexo submucoso presenta las siguientes áreas: 499,89 μm^2 , 278,24 μm^2 , 72,75 μm^2 , 49,35 μm^2 , 178,69 μm^2 , 153,58 μm^2 , 190,60 μm^2 , 144,22 μm^2 , 270,58 μm^2 , 369,28 μm^2 , 103,81 μm^2 , 50,63 μm^2 , 28,08 μm^2 , 42,54 μm^2 , 42,12 μm^2 , 354,39 μm^2 , 156,14 μm^2 , 124,65 μm^2 , 416,08 μm^2 , 261,65 μm^2 , 105,93 μm^2 , 286,32 μm^2 , 225,48 μm^2 , 171,45 μm^2 , 45,52 μm^2 , 136,99 μm^2 , 269,30 μm^2 , 1337,16 μm^2 , 241,23 μm^2 , 615,61 μm^2 , 42,54 μm^2 , 67,22 μm^2 , 283,77 μm^2 , 372,26 μm^2 , 38,72 μm^2 , 72,75 μm^2 , 102,96 μm^2 , 230,16 μm^2 , 111,89 μm^2 , 186,34 μm^2 , 145,93 μm^2 , 39,14 μm^2 , 66,79 μm^2 , 50,63 μm^2 , 64,67 μm^2 , 71,47 μm^2 , 322,48 μm^2 , 62,97 μm^2 , 100,40 μm^2 , 177,41 μm^2 , 108,49 μm^2 , 51,90 μm^2 , 171,03 μm^2 , 423,31 μm^2 , 58,71 μm^2 , 249,31 μm^2 , 55,73 μm^2 ,

42,12 μm^2 , 212,72 μm^2 , 145,93 μm^2 , 170,18 μm^2 , 30,21 μm^2 , 100,83 μm^2 , 913,85 μm^2 , 112,32 μm^2 , 107,64 μm^2 , 389,70 μm^2 y 366,73 μm^2 .

El sumatorio de todas estas áreas da como resultado μm^2 . Se divide el sumatorio de todas las áreas del plexo (13548,47 μm^2) entre el valor de la túnica submucosa (479810,66 μm^2) para saber el porcentaje del plexo submucoso con respecto a la túnica submucosa, dando como resultado 2,82 %.

Se realiza lo mismo con el plexo mientérico, cuyas áreas son: 122,10 μm^2 , 1132,52 μm^2 , 140,82 μm^2 , 100,40 μm^2 , 153,58 μm^2 , 51,48 μm^2 , 93,17 μm^2 , 48,50 μm^2 , 133,59 μm^2 , 78,71 μm^2 , 104,23 μm^2 , 52,33 μm^2 , 667,94 μm^2 , 116,57 μm^2 , 259,94 μm^2 , 63,82 μm^2 , 1789,83 μm^2 , 329,72 μm^2 , 72,75 μm^2 , 174,01 μm^2 , 25,53 μm^2 , 1195,06 μm^2 , 1044,88 μm^2 , 365,45 μm^2 , 36,16 μm^2 , 181,66 μm^2 , 141,67 μm^2 , 399,06 μm^2 , 237,82 μm^2 , 1190,81 μm^2 , 582 μm^2 , 98,70 μm^2 , 1007,44 μm^2 , 2637,73 μm^2 , 105,93 μm^2 , 207,62 μm^2 , 151,46 μm^2 , 167,20 μm^2 , 256,97 μm^2 , 312,27 μm^2 , 161,67 μm^2 , 39,57 μm^2 , 28,93 μm^2 , 195,28 μm^2 , 129,76 μm^2 , 715,59 μm^2 , 18,72 μm^2 , 50,20 μm^2 , 100,83 μm^2 , 239,10 μm^2 , 160,39 μm^2 , 1021,06 μm^2 , 81,68 μm^2 , 795,15 μm^2 , 341,20 μm^2 , 121,68 μm^2 , 66,79 μm^2 , 56m16 μm^2 , 70,20 μm^2 , 263,35 μm^2 , 1656,67 μm^2 , 131,04 μm^2 , 48,07 μm^2 y 121,25 μm^2 . El sumatorio de todas las áreas da un valor de 22645,77 μm^2 . Para conocer el porcentaje de plexo mientérico que hay con respecto a la túnica muscular, se realiza la división del sumatorio de todas las áreas (22645,77 μm^2) entre la medida de la túnica muscular (1070597,19 μm^2) y se multiplica por 100, dando un valor de 2,11%.

6.3. GRUPO 3, RATAS DE 24 MESES DE EDAD

Para terminar, se realiza lo mismo que anteriormente, pero con el corte histológico de la rata de 24 meses de edad. Primero, se calculan las áreas de la pared de la túnica submucosa y muscular, a partir de los valores de las tres áreas que delimitan las paredes. El área 1 tiene un valor de 3279547,31 μm^2 , el área 2 un valor de 2595257,78 μm^2 , y el área 3 un valor de 2168097,14 μm^2 .

Se calcula el área de la pared de la túnica submucosa, haciendo la diferencia entre el área 2 y el área 3, dando un valor de 427160,64 μm^2 . Y el área de la pared de la túnica muscular, con la diferencia entre el área 1 y el área 2, y será 684289,53 μm^2 .

Para realizar el cálculo de las áreas de los plexos submucoso y mientérico, se han delimitado las áreas de los plexos en ambas capas.

Las áreas del plexo submucoso son: 110,61 μm^2 , 57,01 μm^2 , 118,27 μm^2 , 29,78 μm^2 , 86,36 μm^2 , 257,82 μm^2 , 221,23 μm^2 , 128,48 μm^2 , 73,18 μm^2 , 68,92 μm^2 , 121,25 μm^2 ,

180,81 μm^2 , 117 μm^2 , 625,82 μm^2 , 180,81 μm^2 , 75,73 μm^2 , 38,72 μm^2 , 72,32 μm^2 , 49,35 μm^2 , 282,92 μm^2 , 68,50 μm^2 , 103,81 μm^2 , 128,48 μm^2 , 86,36 μm^2 , 84,24 μm^2 , 533,93 μm^2 , 45,10 μm^2 , 89,34 μm^2 , 19,57 μm^2 , 133,59 μm^2 , 17,44 μm^2 , 76,58 μm^2 , 100,40 μm^2 , 176,98 μm^2 , 125,51 μm^2 , 54,88 μm^2 , 27,23 μm^2 , 178,69 μm^2 , 260,37 μm^2 , 251,01 μm^2 , 169,75 μm^2 , 85,94 μm^2 , 115,29 μm^2 , 93,60 μm^2 , 90,19 μm^2 , 434,38 μm^2 , 246,33 μm^2 , 66,79 μm^2 , 418,21 μm^2 , 710,49 μm^2 , 45,10 μm^2 , 57,86 μm^2 , 89,77 μm^2 , 220,80 μm^2 , 125,08 μm^2 , 165,50 μm^2 , 29,78 μm^2 , 147,20 μm^2 , 149,76 μm^2 , 165,50 μm^2 , 47,22 μm^2 , 66,79 μm^2 , 148,48 μm^2 , 42,54 μm^2 , 135,71 μm^2 , 36,59 μm^2 , 20 μm^2 , 19,14 μm^2 , 103,81 μm^2 , 99,13 μm^2 , 54,03 μm^2 y 77 μm^2 . El sumatorio de todas las áreas, da un valor de 9936,13 μm^2 . Se divide este valor (9936,13 μm^2) entre el área de la pared de la túnica submucosa (427160,64 μm^2), se multiplica por 100 y nos da el porcentaje, con un valor de 2,32%.

Las áreas del plexo mientérico (figura 7) son: 134,86 μm^2 , 97,43 μm^2 , 242,08 μm^2 , 476,92 μm^2 , 82,96 μm^2 , 140,82 μm^2 , 128,91 μm^2 , 97,85 μm^2 , 1403,10 μm^2 , 230,10 μm^2 , 70,62 μm^2 , 72,75 μm^2 , 18,29 μm^2 , 60,84 μm^2 , 75,73 μm^2 , 176,56 μm^2 , 99,98 μm^2 , 786,21 μm^2 , 90,62 μm^2 , 106,79 μm^2 , 65,52 μm^2 , 22,12 μm^2 , 170,60 μm^2 , 150,61 μm^2 , 105,93 μm^2 , 30,63 μm^2 , 87,22 μm^2 , 76,15 μm^2 , 77 μm^2 , 195,28 μm^2 , 362,48 μm^2 , 798,55 μm^2 , 83,39 μm^2 , 47,22 μm^2 , 111,04 μm^2 , 21,27 μm^2 , 202,94 μm^2 , 120,83 μm^2 , 107,21 μm^2 , 351,41 μm^2 , 180,81 μm^2 , 28,93 μm^2 , 25,95 μm^2 , 76,58 μm^2 , 262,92 μm^2 , 294,83 μm^2 , 100,83 μm^2 , 366,73 μm^2 , 43,39 μm^2 , 106,36 μm^2 , 379,92 μm^2 , 66,37 μm^2 , 165,07 μm^2 , 19,14 μm^2 , 145,26 μm^2 , 85,09 μm^2 , 121,25 μm^2 , 126,36 μm^2 , 76,15 μm^2 , 737,71 μm^2 , 255,69 μm^2 , 96,15 μm^2 , 114,44 μm^2 , 43,82 μm^2 , 109,76 μm^2 , 119,12 μm^2 , 259,94 μm^2 , 194,43 μm^2 y 1544,78 μm^2 . El sumatorio de todas las áreas da 13928,52 μm^2 . Se divide este valor (13928,52 μm^2) entre el área de la pared de la túnica muscular (684289,53 μm^2), se multiplica por 100 y da un porcentaje de plexo mientérico con respecto a la túnica muscular de 2,03%.

En la siguiente tabla, se muestra un resumen de los porcentajes del plexo submucoso con respecto a la pared de la túnica submucosa, y del plexo mientérico con respecto a la pared de la túnica muscular, donde sugiere que existe una disminución de este porcentaje conforme aumenta la edad de la rata.

Tabla 1. Porcentajes del plexo submucoso, con respecto a la pared de la túnica submucosa, y del plexo mientérico, con respecto a la pared de la túnica muscular, en el grupo 1 (3 meses de edad), grupo 2 (12 meses de edad) y grupo 3 (24 meses de edad).

	Plexo submucoso (%)	Plexo mientérico (%)
GRUPO 1	3,15	3,68
GRUPO 2	2,82	2,11
GRUPO 3	2,32	2,03

En el figura 6, se muestra también el porcentaje de ambos plexos, submucoso y mientérico, donde se observa que a medida que la edad de las ratas es mayor, el porcentaje tanto del plexo submucoso como del plexo mientérico desciende.

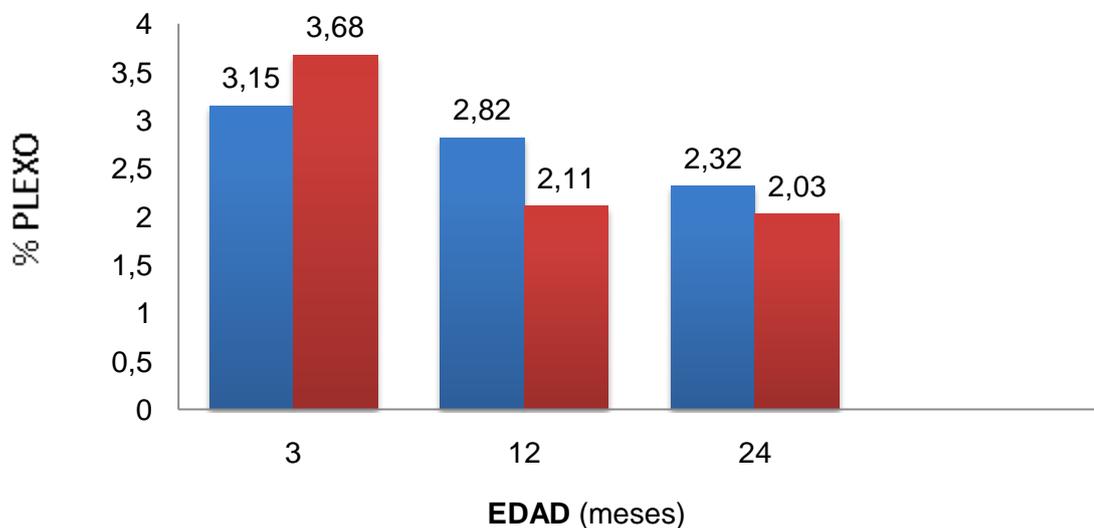


Figura 6. Porcentaje del plexo submucoso (en azul) con respecto a la pared submucosa, y del plexo mientérico (en rojo) en relación a la pared mientérica, en los tres grupos de edad. Se observa el marcado descenso en la relación con el incremento de la edad de los animales.

En la figura 7 se ilustra el plexo mientérico en los tres grupos de edad. Se observa que en el primer grupo (figura 7A), el área del plexo es mayor que en el grupo 2 (figura 7B), y a su vez ésta mayor que en el grupo 3 (figura 7C), donde se muestra la tendencia hacia el descenso del plexo mientérico con la edad.

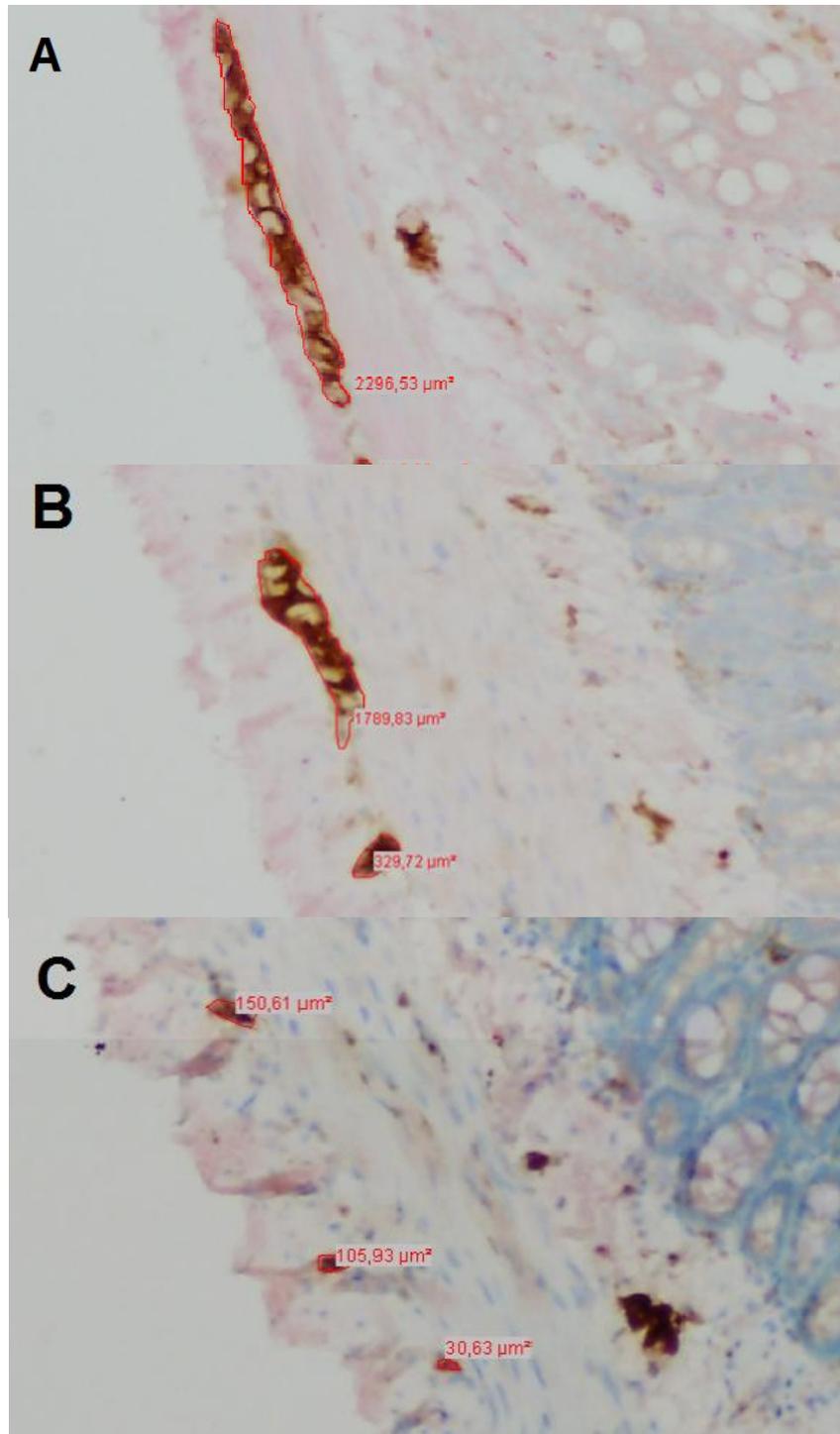


Figura 7. Áreas del plexo mientérico en los 3 grupos de edad. **A:** grupo 1, 3 meses de edad, **B:** grupo 2, 12 meses de edad, **C:** grupo 3, 24 meses de edad. Tinción inmunohistoquímica anti S-100 con contratinción de hematoxilina x40.

7. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo, ha sido estudiar la existencia de cambios en el sistema nervioso entérico durante el proceso de envejecimiento. Se realizó en ratas, debido a que su tracto gastrointestinal comparte muchas características con otros mamíferos, lo cual, podría facilitar la extrapolación de los resultados encontrados a otras especies. El estudio de las posibles alteraciones neuronales que tienen lugar en el plexo miéntérico y submucoso con la edad, se llevó a cabo mediante marcaje inmunohistoquímico con proteína S-100 y posteriormente estudio morfométrico de las áreas de las tunicas submucosa y muscular, y áreas de los plexos submucoso y muscular.

En relación a las alteraciones neuronales que se producen con la edad en el tracto gastrointestinal, los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que a lo largo de la edad se produce una pérdida neuronal significativa, demostrándose diferencias en las imágenes estudiadas de ratas de tres grupos con edades diferentes, de 3, 12 y 24 meses de edad, respectivamente. Estos resultados obtenidos están de acuerdo con los datos previos de la literatura. Esta pérdida neuronal del plexo miéntérico del tracto gastrointestinal con la edad, se ha observado en variedad de especies, incluyendo humanos (Gomes y cols, 1997), ratas (Santer y Baker, 1988; Phillips y Powley, 2001), cobayas (Gabella, 1989) y ratones (El Salhy y cols, 1999).

En relación al plexo mientérico, Santer y Baker (1988) realizaron uno de los primeros trabajos para demostrar esta pérdida neuronal, observando que en el intestino delgado de ratas, se producía una pérdida cercana al 40% y en colon la pérdida fue superior al 60%, comparando animales de 6 y 24 meses de edad. Gabella (1989) observó una reducción del 40-60% de neuronas mientéricas en intestino delgado de cobayas de 30 meses, con respecto a cobayas jóvenes de 6 meses de edad. Phillips and Powley (2001) realizaron un experimento con ratas Fischer 344 de 3 meses de edad y ratas de hasta 21 meses de edad, donde la pérdida neuronal fue significativa a partir de los 12 meses en estómago, duodeno y colon, siguiendo un patrón lineal a lo largo de la vida de los roedores. Gomes y cols (1997), en su estudio realizado en humanos comprobaron una reducción en torno al 37% del número de neuronas mientéricas en colon, comparando entre dos grupos de 20-35 años y 65 años de edad, respectivamente. En el plexo submucoso también se encuentra pérdida neuronal con la edad en colon proximal y distal de la rata de 6, 12, 18, 24 y 27 meses (Phillips y cols, 2007). El-Salhy y cols (1999) detectaron un descenso de la densidad neuronal

del plexo submucoso en un 30-60% en estómago, duodeno y colon en ratones de 3 meses de edad comparados con ratones de 12 meses de edad. Con respecto a las células gliales algunos de los estudios realizados (Phillips y cols, 2004) indican una pérdida significativa del número de éstas en diferentes regiones de intestino delgado y grueso, de ratas de 5-6 meses y ratas de 25 meses de edad. Esta pérdida de las células gliales se ha hallado en todas las áreas del intestino, excepto en el recto, donde la pérdida no ha sido significativa. En todos estos trabajos se han empleado especies animales diferentes, distintas técnicas y distintas regiones del tracto gastrointestinal, pero en todas ellas se ha llegado a la misma conclusión: con la edad se produce una pérdida significativa de neuronas en el tracto gastrointestinal.

Una vez observado que con la edad se producen alteraciones estructurales y neuronales en el tubo digestivo, según la teoría de los radicales libres (Harman D, 1956), estos cambios, así como las enfermedades asociadas a ellos, podrían ser consecuencia del daño causado por los radicales libres que se generan durante el metabolismo normal de las células. Esto se debe a que durante la respiración mitocondrial normal, el oxígeno ocasiona moléculas altamente reactivas e inestables llamadas especies reactivas del oxígeno (ERO) (Balaban y cols, 2005). Estas especies, promueven reacciones que dañan las macromoléculas de las células, lípidos, proteínas e hidratos de carbono, y provocan un daño irreversible que se acumula con el tiempo (Cadenas E y cols, 2000). Las neuronas, son muy vulnerables al daño que producen los radicales libres, debido a su alto nivel de actividad metabólica y a la poca defensa antioxidante que presentan (Sohal, Weindruch, 1996). Por esto, y por lo observado en algunos estudios (Thradivoulou y cols, 2006) el incremento de radicales libres con la edad estaría relacionado con alteraciones a nivel tanto del sistema nervioso central como del sistema nervioso entérico.

Todos estos cambios en el sistema nervioso entérico estarían relacionados con las principales alteraciones funcionales que afectan al tracto gastrointestinal en las personas ancianas, ya que aunque la función se mantiene en el envejecimiento, su efectividad puede estar comprometida por pérdida neuronal (Salles N, 2007). Esto podría contribuir al desarrollo de problemas funcionales comunes en la vejez como el estreñimiento, la disfagia o el síndrome de colon irritable (Abalo y cols, 2007; Talley y cols, 1992).

8. CONCLUSIONES

Primera: El estudio de los efectos del envejecimiento en el sistema nervioso entérico, proporciona una información relevante acerca de los fenómenos que lo pueden originar, y permite equiparar éstos a los que tienen lugar a nivel del sistema nervioso central.

Segunda: El análisis de las tunicas muscular y submucosa facilita el cálculo, en un corte histológico mediante morfometría, de forma precisa el área de los plexos submucoso y mientérico.

Tercera: En este trabajo, se ha demostrado, a través del estudio morfométrico aplicado a la histología, una afectación de ambos plexos por el envejecimiento en cuanto al descenso de sus áreas tanto a nivel submucoso como mientérico.

Cuarta: Estos cambios estructurales y neuronales que se producen con el envejecimiento, podrían ser consecuencia del estrés oxidativo al que están sometidas las células, produciendo un desequilibrio en el control de la motilidad gastrointestinal y contribuyendo a los problemas gastrointestinales de mayor incidencia en la vejez.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abalo R, Vera G, Rivera AJ, Martín MI (2007). Age-related changes in the gastrointestinal tract: a functional and immunohistochemical study in guinea-pig ileum. Departamento de ciencias de la salud, Universidad Rey Juan Carlos. Madrid *Life Sciences* vol. 80 2436-2445.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005). Mitochondria, Oxidants and Aging. Review. *Cell* Vol. 120, 483-495.

Bernis C, (2004) Envejecimiento, poblaciones envejecidas y personas ancianas, universidad autónoma de Madrid *Antropo*, vol. 6, 1-14.

Brownlee M (1991). Glycosylation products as toxic mediators of diabetic complications. *Annual Review of Medicine*; vol. 42, 159-166.

Cadenas E, Davies Kelvin JA (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free radical biology and medicine* vol. 29, 222-230.

Cutler RG (1975). Evolution of human longevity and the genetic complexity governing aging rate. *Proceedings National Academy of sciences*; vol. 72 4664-4668.

Dongmei Cui, M.S, (2011) Histología con correlaciones funcionales y clínicas. Wolters Kluwer Lippincott William & Wilkins.

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

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* vol. 43, 210-217.

Guyton, C.G and Hall J.E. (2012) Tratado de Fisiología Médica. 12ª Edición. Elsevier; 2012.

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontology*, vol. 11, 298-300.

Hayflick L, Moorhead PS. (1961) Serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* vol. 25, 585-621.

Ira Fox, S (2011) Fisiología Humana. 12ª Edición. Mc Graw Hill.

Kierszenbaum A, Tres L. (2012) Histología y biología celular, introducción a la anatomía patológica. 3ª edición. Elsevier 2012.

Kirkwood TBL, Rose MR. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Phil Trans R Soc London B*. 1991;332(1262):15-24.

Kumar, G. and Rudbeck, L. (2009). Immunohistochemical staining methods. Education guide. *Dako North America*. Fifth edition.

Li, L., Lundkvist, A., Andersson, D., Wilhelmsson, U., Nagai, N., Pardo, A. C., et al. (2008). Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 28, 468-481.

Martín-Lacave I, García-Caballero T. (2012) Atlas de inmunohistoquímica, caracterización de células, tejidos y órganos normales. Ed. Díaz de Santos; 2012.

Orgel LE. (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proceedings of the National Academy of Science USA* vol. 49: 517-21.

Phillips RJ and Powley TL. (2001) As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fischer 344 rat. *Journal of comparative neurology* vol. 434, 358-77.

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

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

Ross M. and Pawlina W. (2008) Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular. 5ª edición. Panamericana.

Saffrey MJ. (2013) Cellular changes in the enteric nervous system during ageing. *Developmental Biology*, vol. 382, 344-395.

Salvador-Carulla L, Cano Sánchez A, Cabo-Soler J.R. (2003). Longevidad. Tratado integral sobre salud en la segunda mitad de la vida. Panamericana; 2003.

Salles N. (2007) Basic mechanism of the aging gastrointestinal tract. *Digestive Diseases*, vol. 25, 112-117.

Santer, RM., Baker, DM. (1988) Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. *Journal of the autonomic nervous system* vol. 25, 59-67.

Slagboom PE, Vug J. (1989) Genetic instability and aging: theories, facts, and future perspectives. *Genome*; vol. 31 373-85.

Sheldrake AR (1974). The ageing, growth, and death of cells. *Nature* vol. 250, 381-5.

Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* vol. 273, 59-63.

Szilard L (1959). On the nature of the aging process. *Proceedings of the national academy of sciences* vol. 45, 30-45.

Talley, N.J., O'Keefe, E.A., Zinsmeister, A.R. and Melton, L.J., III (1992). Prevalence of gastrointestinal symptoms in the elderly: a population-based study. *Gastroenterology*, vol. 102, 895-901.

Timiras, P.S. (2003) Physiological basis of aging and geriatrics. 3ª Edición. CRC Press. p 99-117.

Thrasivoulou C, Soubeyre V, Ridha H, Giuliani D, Giaroni C, Michael GJ, Saffrey MJ and Cowen T (2006). Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. *Aging cell* vol. 5, 247-257.

Welsch U. (2014) Histología Sobotta. 3ª Edición. Panamericana.

Young Bárbara, O'Dowd Geraldine. (2014) Wheater's histología Funcional, texto y atlas en color. 6ª Edición. Elsevier.

Yan-Bo yu, Yan-Qing Li. (2014) Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. *World Journal gastroenterology* vol. 20, 11273-11280.

