



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**A L-GLUTAMINA E O ÓXIDO NÍTRICO PROMOVEM A
PLASTICIDADE DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL EM
RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256**

LUCIANE FRACARO

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 para obtenção em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas.

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

MARINGÁ

2014

LUCIANE FRACARO

**A L-GLUTAMINA E O ÓXIDO NÍTRICO PROMOVEM A
PLASTICIDADE DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL EM
RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256**

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 para obtenção em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas.

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

MARINGÁ
2014

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

F797L Fracaro, Luciane
A L-Glutamina e o óxido nítrico promovem a plasticidade das células intersticiais de Cajal em ratos portadores de tumor de Walker-256 / Luciane Fracaro. -- Maringá, 2014.
126, (12) f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jacqueline Nelisis Zanoni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

1. Motilidade intestinal. 2. Sistema nervoso entérico. 3. Células intersticiais de Cajal. 4. Câncer - Tumor de Walker-256. 5. Antioxidantes - Glutamina 2%. 6. Imunohistoquímica. I. Zanoni, Jacqueline Nelisis, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 21.ed. 615.31

AMMA-001844

Luciane Fracaro

A L-glutamina e o óxido nítrico promovem a plasticidade das células intersticiais de Cajal em ratos portadores de Tumor de Walker-256.

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

Aprovado(a) em: 17/12/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Jacqueline Nelisis Zanoni

Instituição: Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Ana Paula de Santi Rampazzo

Instituição: Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Francine Martins Pereira

Instituição: Faculdade Assis Gurgacz

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Dilvanir e Terezinha, pelo exemplo de vida, carinho, amor incondicional e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua infinita bondade, pelas chances que temos de aprender, de ensinar, de viver... Pela Força e Coragem para enfrentar os momentos difíceis!

Aos meus irmãos, Fabio Fracaro, Daiane Fracaro e Talia Fracaro, pelo amor, carinho, confiança, compreensão e amparo. Vocês são o meu porto seguro.

Ao meu namorado, Izanildo Brambati Junior, por nunca deixar de acreditar em mim, sempre compartilhando os momentos, sejam eles bons ou nem tão bons assim, pelo amor e companheirismo. O incentivo, força e carinho, superando toda a distância e todo sofrimento. E a sua família, que já é um pouco minha devido ao tempo de convívio, pela torcida e incentivo durante todo o mestrado.

Durante esses dois anos conheci pessoas maravilhosas, que se tornaram muito especiais e que sempre vou levar no meu coração.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Jacqueline Nelisis Zanoni, por toda a paciência, seriedade, exemplo profissional e dedicação, pelo incentivo e oportunidade, e por estar sempre presente e disposta a realmente me orientar na execução desse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade oferecida, a secretária da pós-graduação Francisca Helena Mesquita de Carvalho pela atenção, disponibilidade e eficiência em desempenhar seu trabalho. Fundação Araucária e CNPq por disponibilizarem os recursos necessários para a realização desse trabalho.

As técnicas do Laboratório de Histologia e do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP-UEM), Maria Euride do Carmo Cancino, Maria dos Anjos Fortunato e Kátia Kern, pelo apoio técnico na realização da pesquisa. Laboratório de Fisiopatologia dos Radicais Livres, da Universidade Estadual de Londrina (UEL). E aos funcionários do MUDI, pelo convívio diário.

Aos meus verdadeiros amigos(as), professores(as), familiares, que perto ou longe estiveram sempre prontos a me escutar e animar, e todos aqueles(as) que cruzaram minha vida participando de alguma forma na construção e realização deste sonho.

Amigos companheiros do laboratório: Catchia, Priscilla, Camila, Mariana, Geraldo, Sara, Juliana, Francieli, Leonora, Thiago, Anna Carolina, Loraine, Murilo, Caroline, pela ajuda, apoio, simpatia, acolhimento e momentos de descontração que tornaram mais agradáveis as horas de trabalho. Vocês representam uma família que encontrei em Maringá, que me proporcionaram, além do crescimento profissional, a AMIZADE! Não posso deixar de fazer o agradecimento especial para Flávia, Bianca e Héber, que sempre disponibilizaram de tempo nas mais variadas técnicas realizadas, em todos os momentos dessa pesquisa, sempre podendo contar com vocês! A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho. MUITO OBRIGADA!

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Plasticidade Neural Entérica, bloco O-33, da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e no Laboratório de Fisiopatologia dos Radicais Livres, da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Partes deste trabalho foram apresentados e publicados em anais de eventos:

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo):

FRACARO, L.; FREZ, F. C. V.; SEHABER, C. C.; VICENTINI, G. E.; MARTINS, H. A.; DE SOUZA, S. R. G.; CARDOSO, B. S.; BLEGNISKI, F. P.; ZANONI, J. N. CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL IMUNORREATIVAS A PROTEÍNA ANO1 (TMEM16A) NO JEJUNO DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256 APÓS SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA 2%. In: V Simpósio de Biociências Aplicadas a Farmácia e I International Meeting of Biosciences and Physiopathology. Maringá, 2014. **Anais do V Simpósio de Biociências Aplicadas a Farmácia e I International Meeting of Biosciences and Physiopathology**. 2014. Resumo 181.

FRACARO, L.; FREZ, F. C. V.; SEHABER, C. C.; LIMA, M.M; VICENTINI, G. E.; MARTINS, H. A.; DE SOUZA, S. R. G.; CARDOSO, B. S.; BLEGNISKI, F. P.; ZANONI, J. N. PLASTICIDADE DAS REDES DE CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL DO PLEXO MUSCULAR PROFUNDO NO JEJUNO DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256 APÓS SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA 2%. In: II Semana de Bioquímica e I Fórum do Curso de Bacharelado em Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2014. **Anais da II Semana de Bioquímica e I Fórum do Curso de Bacharelado em Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá**. 2014. Resumo SBQ32.

SOUZA, S.R.; FREZ, F.C.V.; LIMA, M.M.; SEHABER, C.C.; MARTINS, J.V.C.P.; FRACARO, L.; MARIANO, R.D.; VICENTINI, G.E.; BLEGNISKI, F.P.; GUARNIER, F.A.; ZANONI, J.N. PREVENÇÃO DA PERDA DE MASSA CORPÓREA COM USO DE L-GLUTAMINA A 2% EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256. In: II Semana de Bioquímica e I Fórum do Curso de Bacharelado em Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2014. **Anais da II Semana de Bioquímica e I Fórum do Curso de Bacharelado em Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá**. 2014. Resumo SBQ81.

FRACARO, L.; FREZ, F. C. V.; VICENTINI, G. E.; MARTINS, H. A.; DE SOUZA, S. R. G.; CARDOSO, B. S.; ZANONI, J.N. SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA A 2%: AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL E ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SÍNTASE DO JEJUNO DE RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256. In: V Seminário Anual do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Farmácia. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2014. **Anais do V Seminário Anual do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**. 2014. Resumo p.32.

FRACARO, L 2014. A L-glutamina e o óxido nítrico promovem a plasticidade das células intersticiais de Cajal em ratos portadores de Tumor de Walker-256. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 126p.

Resumo

As células intersticiais de Cajal (CIC) fornecem um mecanismo de controle para o peristaltismo do trato gastrointestinal (TGI). Na camada muscular longitudinal externa, próximo ao plexo mientérico (MY), as CIC-MY formam uma rede tridimensional, com função de gerar e propagar ondas lentas na musculatura. Na camada muscular circular interna, próximo ao plexo muscular profundo (DMP), as CIC-DMP se apresentam em redes frouxas com processos finos, com função de sinalizar a neurotransmissão. A proteína transmembrana Ano1, atua na regulação dos canais de Ca^{2+} e Cl^- , e apresenta expressão específica e elevada nas CIC, sendo utilizada para evidenciação das mesmas. O óxido nítrico (NO) parece estar envolvido na sobrevivência dessas células. O câncer promove a caquexia, o aumento de processos inflamatórios e do estresse oxidativo, que pode levar à disfunções na motilidade intestinal. Substâncias com ação antioxidante, que participam na redução do estresse oxidativo, podem prevenir os danos provocados pelo tumor. A L-glutamina é um aminoácido que participa indiretamente no aumento da síntese protéica muscular esquelética e é precursor da glutatona. Portanto, objetivou-se investigar os efeitos da suplementação com L-glutamina a 2% sobre as redes das CIC-MY e CIC-DMP e sobre a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, tipo I). *Rattus norvegicus* machos Wistar com 57 dias de idade foram divididos em quatro grupos: controle (C), controle suplementados com L-glutamina (CG), portadores de Tumor de Walker-256 (TW), portadores de Tumor de Walker-256 suplementados com L-glutamina (TWG). Após 14 dias de suplementação, os jejunos foram coletados e processados para técnicas imunohistoquímicas de preparado total e criocortes, e para análise do Western blot. Análises quantitativas foram realizadas para Ano1 e nNOS. Ocorreu a redução da densidade das CIC e o aumento da expressão da proteína Ano1 no grupo TW em comparação com o grupo C ($p < 0,05$). A redução da densidade pode estar relacionada ao estresse oxidativo, que é elevado no câncer. A maior produção de NO pela maior expressão da nNOS-IR, estimulou a proliferação e manutenção das redes CIC-DMP. Ocorreu presença da caquexia nos grupos portadores de tumor, sendo menor no grupo TWG ($p < 0,05$). A suplementação com L-glutamina aumenta a síntese de proteínas prevenindo o desenvolvimento de caquexia. A suplementação com L-glutamina no grupo TWG promoveu elevada plasticidade das CIC, devido sua ação antioxidante. Os mecanismos de reparo das CIC não estão elucidados, porém é possível concluir que a suplementação com L-glutamina parece estar envolvida na regulação dos canais de Ca^+ e Cl^- . O NO pode interagir com as CIC, e, juntamente com o tratamento antioxidante, parecem contribuir na proteção e reparação dessas células, preservando a homeostasia intestinal no modelo de Tumor de Walker-256.

Palavras-chave: Motilidade intestinal, Sistema Nervoso Entérico, Câncer, Antioxidantes, Imunohistoquímica.

FRACARO, L 2014. L-glutamine and nitric oxide promote plasticity in interstitial cells of Cajal in Walker 256 tumor-bearing rats. Master degree. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 126p.

Abstract

Interstitial cells of Cajal (ICC) provides a mechanism to control the peristalsis of the gastrointestinal (GI) tract. In outer longitudinal muscle layer, near the myenteric plexus (MY), ICC-MY form a three-dimensional network, with function to generating and propagating slow waves in the muscles. In inner circular muscle layer, near the deep muscular plexus (DMP), ICC-DMP are presented in loose networks with fine processes, with function to signal neurotransmission. The transmembrane protein Ano1, participates in the regulation of Ca^{2+} and Cl^- channels, and presents specific and high expression in the CIC and is used to show of the same. Nitric oxide (NO) appears to be involved in the survival of these cells. Cancer cachexia promotes the increase of inflammatory processes and oxidative stress, which can lead to abnormalities in intestinal motility. Substances with antioxidant action, participating in the reduction of oxidative stress, can prevent the damage caused by the tumor. L-glutamine is an amino acid involved indirectly in increasing skeletal muscle protein synthesis and precursor of glutathione. Therefore the aim of the present study was to investigate the effects of supplementation with L-glutamine to 2% on the networks of ICC-MY and ICC-DMP and on neuronal nitric oxide synthase (nNOS, type I). *Rattus norvegicus* Wistar males with 57 days of age were divided into four groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), with Walker-256 tumor (WT), Walker-256 tumor patients supplemented with L-glutamine (WTG). After 14 days of supplementation, jejunums were collected and processed for immunohistochemical techniques whole-mount and cryosections prepared, and Western blot analysis. Quantitative analyzes were performed to Ano1 and nNOS.

The reduced density of ICC and the increase in Ano1 protein expression was observed in the WT group compared to the C group ($p < 0.05$). Reduction in density can be related to oxidative stress, which is high in cancer. Greater production of nitric oxide (NO) stimulated proliferation and maintenance of ICC-DMP network. Cachexia was lower in the WTG group compared to WT ($p < 0.05$). Supplementation with L-glutamine increases protein synthesis by preventing the development of cachexia. L-glutamine in the WTG group promoted high plasticity in ICC, due to its antioxidant action. The repair mechanisms of ICC have not been explained, but it is possible to deduce that L-glutamine may be involved in the regulation of Ca^{+2} e Cl^- channels. NO can interact with the ICC, and, together with the antioxidant treatment appear to contribute to the protection and repair of these cells, maintaining intestinal homeostasis in the Walker-256 tumor model.

Keywords: Intestinal motility, Enteric Nervous System, Cancer, Antioxidants, Immunohistochemistry.

APRESENTAÇÃO

A Dissertação foi composta por uma revisão de literatura seguindo as normas da ABNT (NBR 6023/2002) e um artigo científico em português (com versão em inglês) completo redigido na forma exigida pela revista científica *Neurogastroenterology and Motility* (ISSN online: 1365-2982).

ARTIGO: A L-GLUTAMINA E O ÓXIDO NÍTRICO PROMOVEM A PLASTICIDADE DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256

ARTICLE: L-GLUTAMINE AND NITRIC OXIDE PROMOTE PLASTICITY IN INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL IN WALKER 256 TUMOR-BEARING RATS

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1	Interconversão glutamina-glutamato (WATFORD <i>et al.</i> , 2002).....	28
Figura 2	Utilização da glutamina em forma de glutamato (LIMA, 2008).....	29
Figura 3	Formação de espécies reativas de oxigênio, lipoperoxidação e proteção antioxidante (SORIA, 2012; adaptado de VALKO <i>et al.</i> , 2007).....	31
Figura 4	Organização do SNE de mamíferos. O SNE possui plexos ganglionados, o plexo mientérico entre as camadas longitudinal e circular da musculatura externa e o plexo submucoso, localizado na submucosa. Feixes de fibras nervosas ligam os gânglios e também formam os plexos que inervam o músculo longitudinal, músculo circular, muscular da mucosa, artérias intrínsecas e mucosa (adaptada de FURNESS, 2012).....	34
Figura 5	Descrição das subpopulações das CIC (adaptada de BLAIR <i>et al.</i> , 2014).....	36
Figura 6	Visão geral dos subtipos de CIC no TGI. Representações esquemáticas de CIC no estômago (A), intestino delgado (B), cólon (C). Camada muscular circular (MC) e camada muscular longitudinal (ML). Células intersticiais de Cajal do plexo mientérico (CIC-MY). Células intersticiais de Cajal do plexo muscular profundo (CIC-DMP). (adaptada de LINO; HORIGUCHI, 2006).....	37
Figura 7	Organização dos subtipos de CIC de acordo com Cajal e a atual nomenclatura. Células intersticiais de Cajal do plexo muscular profundo (CIC-DMP ou CIC-SMP ou CIC-SM). Células intersticiais de Cajal da camada muscular circular (CIC-CM ou CIC-IM). Células intersticiais de Cajal do plexo mientérico (CIC-MP ou CIC-MY). Células intersticiais de Cajal da camada muscular longitudinal (CIC-LM ou CIC-IM).....	38
Figura 8	Mecanismo de geração intracelular da atividade de marcapasso das CIC. (A) liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares pela ativação transitória dos canais anoctamin-1 (Ano1). (B) produção de correntes transitórias espontâneas em células de marca-passo primárias. NKCC1 repõem íons Cl^- intracelulares. (C) ondas lentas despolarizam CIC próximas, desencadeando a ativação de canais voltagem-dependentes de Ca^{2+} em células marca-passos secundárias (adaptada de BLAIR <i>et al.</i> , 2014).....	41
Figura 9	Ativação da propagação de ondas lentas. 1º passo: elevação do	

Ca²⁺ em todas as células. 2º passo: despolarização ativa entrada de Ca²⁺ e liberação de Ca²⁺ em toda CIC. 3º passo: despolarização ativa propagação de ondas lentas na rede de CIC (seta preta horizontal mostra a direção de propagação). 4º passo: ondas lentas se propagam pela rede de CIC, e conduzem passivamente para as células musculares lisas acopladas eletricamente (adaptada de SANDERS; WARD; KOH, 2014)..... 42

Figura 10 Principais alvos da inervação motora entérica. Neurônios motores inibitórios e excitatórios. Receptor guanilato ciclase (GC) para NO. Células musculares lisas (CLM) (adaptada de WARD; SANDERS, 2001)..... 43

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO: A L-GLUTAMINA E O ÓXIDO NÍTRICO PROMOVEM A PLASTICIDADE DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256

- Figura 1** **1A.** Intensidade de brilho (RGB) para CIC-MY (A) e CIC-DMP (B). Resultados expressos como média \pm erro padrão. Valores médios seguidos por letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). $n = 8$ ratos por grupo. **1B.** Fotomicrografias em preparado total das CIC-MY (A) e CIC-DMP (B) imunomarcadas pela proteína Ano1 no jejuno. *Barra de calibração* 15 μm . Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG). 86
- Figura 2** Modelagem em superfície 3D representativas da intensidade de brilho (RGB) das CIC-MY (A) e CIC-DMP (B). Grupos: controle (C), controle suplementado com glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com glutamina (TWG). *Barra de calibração* 15 μm 87
- Figura 3** **3A.** Densidade das CIC-MY (A) e CIC-DMP (B). Resultados expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ quando comparado a C. $n = 8$ ratos por grupo. **3B.** Fotomicrografias em corte histológico das CIC-MY e CIC-DMP. As setas indicam a co-localização das CIC/DAPI. *Barra de calibração* 30 μm . Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG). 88
- Figura 4** **4A.** Ocupação do espaço pelas redes celulares CIC-MY (A) e CIC-DMP (B). Resultados expressos como média \pm erro padrão. Valores médios seguidos por letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). $n = 8$ ratos por grupo. **4B.** Fotomicrografias em preparado total das CIC-MY (A) e CIC-DMP (B), imagens 16-bit. *Barra de calibração* 15 μm . Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG)..... 89
- Figura 5** **5A.** Ocupação do espaço pelos neurônios nNOS-IR miontéricos (A) e submucosos (B). Resultados expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ quando comparado a C. $n = 8$ ratos por grupo. **5B.** Fotomicrografias representativas dos nNOS-IR miontéricos (A) e submucosos (B), imagens 16-bit. *Barra de calibração* 30 μm . Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG)..... 90
- Figura 6** Fotomicrografias para Ano1 (CIC-MY), nNOS e CIC-MY/nNOS. *Barra de calibração* 30 μm . Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e

tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG)..... 91

Figura 7 Fotomicrografias para Ano1 (CIC-DMP), nNOS e CIC-DMP/nNOS. As cabeças de setas indicam exemplos de fibras nervosas nNOS-IR e redes das CIC-DMP co-localizadas. *Barra de calibração* 30 μ m. Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG)..... 92

Figura 8 **8A.** Imunoblot para Ano1 e nNOS. **8B.** Resultados expressos pela porcentagem do grupo controle. * $p < 0,05$ quando comparado a C. $n = 4$ ratos por grupo. Grupos: controle (C), controle suplementado com glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com glutamina (TWG)..... 93

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO: L-GLUTAMINE AND NITRIC OXIDE PROMOTE PLASTICITY IN INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL IN WALKER 256 TUMOR-BEARING RATS

- Figure 1** **1A.** Brightness intensity (RGB) for ICC-MY (A) and ICC-DMP (B). Results were expressed as mean \pm standard error. Mean values followed by different letters are statistically different ($p < 0.05$). $n = 8$ rats per group. **1B.** Photomicrographs of the whole-mounts of ICC-MY (A) and ICC-DMP (B) immunostained with the Ano1 protein in rat jejunums. *Calibration bar* 15 μm . Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG)..... 119
- Figure 2** 3D surface modeling representing brightness intensity (RGB) for ICC-MY (A) and ICC-DMP (B). Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG). *Calibration bar* 15 μm 120
- Figure 3** **3A.** Figure 3A. Density for ICC-MY (A) and ICC-DMP (B). Results were expressed as mean \pm standard error. * $p < 0,05$ when compared to C. $n = 8$ rats per group. **3B.** Photomicrographs of the histological section of ICC-MY and ICC-DMP. The arrows indicate co-localization of ICC/DAPI. *Calibration bar* 30 μm . Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG).. 121
- Figure 4** **4A.** Space occupancy by the ICC-MY (A) and ICC-DMP (B) cellular networks. Results were expressed as mean \pm standard error. Mean values followed by different letters are statistically different ($p < 0.05$). $n = 8$ rats per group. **4B.** Photomicrographs of whole-mount preparations of ICC-MY (A) and ICC-DMP (B), 16-bit images. *Calibration bar* 15 μm . Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG)..... 122
- Figure 5** **5A.** Space occupancy by the nNOS-IR neurons myenteric (A) and submucosal (B). Results were expressed as mean \pm standard error. $p < 0,05$ when compared to C. $n = 8$ rats per group. **5B.** Photomicrographs of whole-mount preparations of nNOS-IR myenteric (A) and submucosal (B), 16-bit images. *Calibration bar* 30 μm . Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG)..... 123
- Figure 6** Photomicrographs to Ano1 (ICC-MY), nNOS and ICC-MY/nNOS. *Calibration bar* 30 μm . Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG)..... 124

Figure 7	Photomicrographs to Ano1 (ICC-DMP), nNOS and ICC-DMP/nNOS. Arrowheads indicate examples of nNOS-IR nerve fibers and networks of ICC-DMP co-located. <i>Calibration bar</i> 30 μm . Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG).....	125
Figure 8	Immunoblot for Ano1 and nNOS. 8B . Results expressed by the percentage of the control group. * $p < 0,05$ when compared to C. n = 4 rats per group. Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG).....	126

LISTA DE TABELAS

ARTIGO: A L-GLUTAMINA E O ÓXIDO NÍTRICO PROMOVEM A PLASTICIDADE DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256

- Tabela 1** Parâmetros fisiológicos: peso final (PF) (71 dias de idade), consumo de ração (CR) e massa tumoral (MT) do flanco direito. Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), Tumor de Walker-256 (TW) e Tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG). Resultados expressos como média \pm erro padrão. Valores médios seguidos por letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). n = 7 ratos por grupo..... 85

LISTA DE TABELAS

ARTIGO: L-GLUTAMINE AND NITRIC OXIDE PROMOTE PLASTICITY IN INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL IN WALKER 256 TUMOR-BEARING RATS

- Table 1.** Physiological parameters: final weight (FW), feed intake (FI) and mass of tumor (MT) of the right flank. Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG). Results were expressed as mean \pm standard error. Mean values followed by different letters in the same row are statistically different ($p < 0.05$). n = 7 rats per group..... 118

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1.1 CÂNCER.....	19
1.2 CAQUEXIA E ANOREXIA NO CÂNCER.....	21
1.3 TUMOR DE WALKER-256.....	24
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES.....	25
1.5 L-GLUTAMINA	28
1.6 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE).....	33
1.7 CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL (CIC).....	35
2. REFERÊNCIAS.....	45

ARTIGO: A L-GLUTAMINA E O ÓXIDO NÍTRICO PROMOVEM A PLASTICIDADE DAS CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE WALKER-256	60
--	-----------

Resumo.....	61
Introdução.....	62
Materias e Métodos.....	64
Resultados.....	72
Discussão.....	75
Referências.....	78

Article: L-GLUTAMINE AND NITRIC OXIDE PROMOTE PLASTICITY IN INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL IN WALKER 256 TUMOR-BEARING RATS	94
---	-----------

Abstract.....	95
Introduction.....	96
Materials and Methods.....	98
Results.....	106
Discussion.....	108
References.....	112

Anexo

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CÂNCER

O câncer é considerado um problema de saúde pública, devido a elevada taxa de morbidade e mortalidade, e, também, por estar se tornando cada vez mais comum mundialmente. O quadro característico da neoplasia é o descontrole no ciclo celular, levando à multiplicação desordenada do número de células e/ou desequilíbrio no controle da morte celular programada (apoptose) em tecidos e órgãos (PASTERNAK, 2002).

As células cancerosas tendem a formação de tumores e a possibilidade de disseminação por tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, caracterizando o evento conhecido como metástase (INCA, 2014). A metástase ocorre devido a angiogênese, que é a proliferação de vasos sanguíneos que irrigam o tumor. Os novos vasos, no entanto, não são bem formados e são facilmente danificados, de modo que as células do tumor podem penetrar nestes vasos e atingir também vasos linfáticos, alcançando órgãos distantes (PEREIRA, 2008).

Os diferentes tipos de câncer envolvem os vários tipos de células do organismo. Desta maneira, se a neoplasia maligna tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas este é denominado carcinoma. Se o mesmo tem início em tecidos conjuntivos como ossos, músculos ou cartilagens é chamado de sarcoma (INCA, 2013).

O câncer em humanos e nos modelos experimentais em animais cresce, geralmente, por períodos variáveis de tempo, sem perturbar a fisiologia do organismo hospedeiro. A carcinogênese caracteriza-se por um processo múltiplo, no qual um acúmulo de eventos genéticos levam a uma aparência celular progressivamente displásica, com desregulação da multiplicação celular e, finalmente, ao carcinoma (PEREIRA, 2008).

A carcinogênese pode ser estudada em três estágios: iniciação, promoção e progressão, e, com raras exceções, os estágios de promoção e progressão aparecem até décadas após a iniciação (TSAO *et al.*, 2004). Contudo, uma vez que os primeiros sinais de distúrbios homeostáticos tornam-se evidentes, há uma evolução rápida e fulminante (GUIMARAES *et al.*, 1999).

A incidência de neoplasias malignas sofre variações regionais, de etnias, de ocupação e pela exposição a agentes desencadeadores de câncer, sendo sua origem multifatorial. O perfil epidemiológico no Brasil, aumenta a busca pelo conhecimento sobre a situação da doença, para que possam ser estabelecidas prioridades e recursos de forma direcionada à modificação positiva desse cenário (INCA, 2013).

As neoplasias malignas, conforme dados do Ministério da Saúde, aparecem oito vezes na lista das vinte doenças que mais matam no Brasil. As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (2014), para os anos de 2014/2015, apontam para a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos, reforçando a magnitude do problema no país. O câncer de pele do tipo não melanoma aparece como o mais incidente, com 182 mil casos novos; seguidos pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INCA, 2014). No âmbito global, as estimativas apontam para o surgimento de 27 milhões novos casos anuais, 17 milhões de óbitos e 75 milhões de portadores em 2030, dos quais 60% ocorrerão em países em desenvolvimento (INCA, 2014).

O câncer instalado, dependendo do tipo, localização e tratamento, além dos aspectos psicológicos, conduz à alterações físicas e sociais, tanto para o portador como para as pessoas que convivem com ele. Para o paciente, o câncer altera todos os aspectos da vida, incluindo modificações em seus hábitos, comprometendo a capacidade e habilidade de suas atividades rotineiras e certamente prejudicando a sua qualidade de vida (MICHELONE *et al.*, 2004).

A equipe multidisciplinar no acompanhamento do paciente oncológico é essencial na redução da morbi-mortalidade e na melhora da qualidade de vida do portador e de seus familiares. Assim, fica evidente a necessidade de investimentos em ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação: detecção precoce, assistência aos pacientes, formação de recursos humanos, pesquisa e demais setores ligados ao tema (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

No momento do diagnóstico do câncer, muitas vezes, ocorre um período de muita ansiedade e angústia, desencadeando quadros depressivos. Esta condição vem associada a sintomas somáticos, como perda de apetite e fraqueza, que também podem estar relacionadas ao catabolismo da doença ou ao seu tratamento (SILVA, 2006). Uma das consequências do câncer é a observação de um

emagrecimento generalizado, resultante da anorexia e conseqüente perda de massa magra tecido adiposo.

É constante a observação de anemia e a atrofia dos órgãos viscerais. Estas situações podem caracterizar o estado de caquexia, muito comum, no paciente oncológico (KOWATA *et al.*, 2009). A caquexia cancerosa gera um estado de inflamação sistêmica, que há algum tempo tem sido apontada como principal responsável pela alteração funcional de diversos órgãos (VIOLATO, 2013). O sintoma mais frequente na caquexia é a rápida e acentuada perda de peso, que atinge cerca de metade dos pacientes com câncer e está presente em mais de dois terços dos pacientes em estágio terminal (MORLEY, 2002).

1.2 CAQUEXIA E ANOREXIA NO CÂNCER

O termo caquexia significa má condição, do grego, “*kakos*”: má e “*hexis*”: estado/condição (INUI, 2002). De acordo com Muscaritoli *et al.* (2010) e Fearon *et al.* (2011) a caquexia pode ser definida como uma síndrome multifatorial, na qual há perda contínua de massa muscular. É característico o estado fraqueza generalizada; anemia; disfunção imune; anorexia e mudanças na ingestão e má absorção de nutrientes (KOWATA *et al.*, 2009).

A característica clínica proeminente em adultos é a perda de peso e em crianças é a falta de crescimento (EVANS *et al.*, 2008). A caquexia cancerosa é influenciada por aumento do estado inflamatório e da proteólise muscular, deficiência do metabolismo de carboidratos (intolerância à glicose e resistência periférica à ação da insulina) e depleção de lipídeos e proteínas (NUNES, 2008; PAZ *et al.*, 2011). O estado caquético é mediado por citocinas, que alteram o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras nesses pacientes (SILVA *et al.*, 2012).

A perda de peso é uma manifestação frequente em doenças inflamatórias crônicas e degenerativas e a perda de massa muscular é o fator mais impactante na perda de peso corporal total, sendo reflexo tanto da anorexia, quanto da má absorção de nutrientes, mediadas pelas células tumorais. Essa condição não apresenta capacidade de ser totalmente revertida pela terapia nutricional convencional, conduzindo ao emagrecimento acentuado e comprometimento

funcional progressivo do organismo (EISENCHLAS, 2006; CONSENSO BRASILEIRO DE CAQUEXIA/ANOREXIA, 2011).

Nos pacientes com câncer, a anorexia que também é um sintoma muito frequente, aparece no diagnóstico ou posteriormente ao crescimento do tumor. De acordo com Eley *et al.* (2007), é a perda espontânea e não intencional de apetite, um sintoma corriqueiro no câncer em estado terminal. Geralmente é resultado das alterações do paladar e olfato ou mudanças na regulação hipotalâmica (FRIEDENREICH; ORENSTEIN, 2002). Segundo Silva (2006), a anorexia está associada ao câncer em 60% dos pacientes adultos em fase avançada e em 80% dos pacientes infantis que vieram à óbito.

O termo síndrome da anorexia-caquexia (SAC) tem sido usado com frequência, devido a forte relação entre estas duas condições. A SAC compromete mais de 50% dos portadores de câncer (TISDALE, 2003; DAVIS *et al.*, 2004; SILVA, 2006). Mas a síndrome caquética pode ocorrer independentemente da anorexia e/ou má absorção de nutrientes, apontando como fatores-chave o aumento da depleção dos tecidos muscular e adiposo, mediado pela estimulação de vias metabólicas catabólicas e inibição de vias anabólicas (TISDALE, 2002; VICENTINO *et al.*, 2002).

Um dos sintomas mais comuns da SAC no câncer é a fadiga que atinge 74% dos portadores, seguida por perda de apetite (53%), perda de peso (46%), modificações no paladar, êmese e saciedade precoce (aproximadamente 23%). Além disso, ainda há alteração no perfil hormonal plasmático, reduzida atividade de hormônios anabólicos e disfunção hipotalâmica (FEARON *et al.*, 2011; CONSENSO BRASILEIRO DE CAQUEXIA/ANOREXIA, 2011).

O quadro de SAC oncológico compreende diversas alterações metabólicas, hormonais e fisiológicas, caracterizadas pelo alto consumo energético imposto pela neoplasia, a liberação de fatores sacietogênicos e citocinas produzidas pelo hospedeiro e pelo tumor (SILVA, 2006; CHOUDRY *et al.*, 2006).

Metabolicamente, no câncer, devido ao desenvolvimento do tumor, ocorre um fluxo de nitrogênio do músculo esquelético para o fígado, onde os aminoácidos resultantes da proteólise muscular são utilizados para síntese de proteínas de fase aguda e produção de glicose (neoglicogênese). Os efeitos da caquexia no câncer sobre o metabolismo mostram um aumento da neoglicogênese a partir de alanina, vinda da proteólise muscular; de glicerol que é oriundo do tecido adiposo e de

lactato que é produzido pelo tumor. Somado a isto, no fígado há intensa glicogenólise (CHOUDRY *et al.*, 2006).

Quanto a proteólise muscular, além da alanina, direcionada para a biossíntese de glicose, também há a liberação de glutamina, que é, na maior parte, utilizada pelo tumor em processos energéticos e biossintéticos. Já no organismo há o aumento da biossíntese de proteínas envolvidas na resposta de fase aguda. O tumor em crescimento demanda muitos nutrientes, especialmente aminoácidos essenciais, devido a estreita relação entre o crescimento do tumor e a proteólise muscular. Ocorre um balanço negativo de nitrogênio e aumento da utilização de aminoácidos, principalmente a glutamina (ARGILÉS *et al.*, 2005; CHOUDRY *et al.*, 2006). Conforme Argilés *et al.* (2001), a ingestão de aminoácidos pode teoricamente poupar a proteína tanto do metabolismo muscular como da neoglicogênese.

O alto catabolismo protéico, resultado da invasão tumoral, somado à intensa mobilização de lipídeos, são direcionados por certos mediadores na caquexia (ARGILÉS *et al.*, 2005). Entre estes mediadores produzidos por células tumorais do tecido do hospedeiro, encontram-se as citocinas, o fator indutor de proteólise (PIF), o fator mobilizador de lipídeos (LMF), os hormônios catabólicos, toxormônios, neuropeptídeos e os neurotransmissores (RUBIN, 2003; TISDALE, 2003; RAMOS *et al.*, 2004; LOBERG *et al.*, 2007).

Conforme Mantovani *et al.* (2004), grande parte das alterações metabólicas associadas à caquexia tem sido associada ao estresse oxidativo e também às citocinas pró-inflamatórias, liberadas principalmente pelas células do sistema imune, exercendo efeitos, através de mecanismos complexos, sobre diversas células do organismo (células musculares, adipócitos, células endoteliais e neurônios). Entre estas citocinas estão: o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina-1 e -6 (IL-1 e IL-6), o interferon gama (INF- γ) e o fator inibitório de leucemia (LIF) (TISDALE, 2000; KOREKANE *et al.*, 2003).

As citocinas são proteínas liberadas em resposta a estímulos ativadores e induzem respostas do organismo à injúria, infecção, tumores e doenças inflamatórias (JANEWAY *et al.*, 2002). Estas citocinas direcionam a biossíntese de proteínas de fase aguda da inflamação, as quais se apresentam aumentadas na caquexia associada ao câncer. Assim, esta condição, direcionada, em grande parte por citocinas, representa um quadro inflamatório crônico mediado por agentes pró-inflamatórios, os eicosanóides (FENNEKOHL *et al.*, 1999; ARGILÉS *et al.*, 2005).

A caquexia associada ao câncer vem sendo estudada, com muita freqüência, em modelos animais. Em ratos portadores de tumor de Walker-256, o modelo consolidado de caquexia é observado em uma grande perda de massa magra que é atribuída a uma redução na síntese de proteínas, um aumento na degradação das mesmas ou ambos (LAZO, 1985; MUND, 2004).

1.3 TUMOR DE WALKER-256

O Tumor de Walker-256 é uma neoplasia que possui comportamento biológico agressivo, sendo localmente invasivo e com alto poder de metástase por via linfática e hematogênica. Assim, o modelo tem sido amplamente usado nos estudos de fisiopatologia do câncer (IKEDA *et al.*, 2004; MAO-YING *et al.*, 2006).

Foi descoberto em 1928 pelo professor George Walker a partir de uma massa tumoral espontânea na glândula mamária de uma rata albina prenhe (YANO *et al.*, 2008). O exame histopatológico revelou um adenocarcinoma (SILVA *et al.*, 2006) e a possibilidade de seu transplante foi comprovada pelo próprio pesquisador (YANO *et al.*, 2008). Desde então, as células do tumor, vem sendo mantidas em laboratórios como uma ferramenta valiosa no auxílio à pesquisa em diversas áreas do conhecimento, sendo transplantadas por via intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, intrapleural, intracardíaca e sanguínea (MORAES *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2002; DORNELAS *et al.*, 2006).

Quando a via subcutânea é utilizada há o desenvolvimento de tumores sólidos, inicialmente firmes a palpação, encapsulados e de forma arredondada, que provocam infiltração da pele e musculatura adjacente. A inoculação dessas células tumorais por meio da via intraperitoneal, resulta no desenvolvimento da forma ascítica do tumor (DORNELAS *et al.*, 2006).

O carcinossarcoma de Walker-256 tem elevado índice de pega do tumor e amplas possibilidades para uso em testes laboratoriais (SILVA *et al.*, 2002). Sua utilização em ratos vem sendo considerado um modelo experimental adequado na compreensão da síndrome da caquexia no câncer devido ao seu desenvolvimento ser rápido e uniforme e as características tumorais bem definidas, além da facilidade de sua manutenção em laboratório (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Este modelo experimental de caquexia é induzido pela presença de um tumor sólido e vem sendo utilizado em estudos morfofisiológicos de vários tecidos,

principalmente pela sua capacidade de induzir rapidamente um estado caquético neoplásico com alterações imunológicas e metabólicas estabelecidas (DE FREITAS *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2004).

Em curto espaço de tempo após sua implantação verificam-se redução no peso do animal, dificuldade de ingestão adequada de alimento, catabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Aos 14 dias após o implante, a massa tumoral pode representar uma fração considerável do peso do animal e a morte ocorre após este período (VICENTINO *et al.*, 2002).

O crescimento do câncer induz alterações marcantes no metabolismo oxidativo dos tecidos e órgãos do hospedeiro mesmo que distantes do tumor. Ocorrem as características clássicas da caquexia como: emagrecimento, catabolismo muscular e anorexia, e também alterações metabólicas em parâmetros plasmáticos e hepáticos (ANGELO; OLIVEIRA, 2009) sendo que este quadro não é devido a um menor consumo de alimento, mas sim a fatores (citocinas) produzidos pelo tumor ou pelo hospedeiro em resposta à presença do mesmo. Conforme Tsao *et al.* (2004), os tumores são capazes de aumentar a quantidade de substâncias pró-oxidantes e reduzir as atividades das enzimas antioxidantes em tecidos extra-tumorais. Promovem aumento do estresse oxidativo, assim como também reduzem a capacidade de resposta celular a esse processo (MANTOVANI *et al.*, 2004; VALKO *et al.*, 2007; MENA; ORTEGA; ESTRELA, 2009).

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

O estresse oxidativo manifesta-se quando há desequilíbrio entre a produção de oxidantes e o respectivo sistema de defesa (ABUJA; ALBERTINI, 2001). O aumento de moléculas oxidativas altamente reativas dentro das células (OBROSOVA *et al.*, 2002) causam danos às proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, culminando em morte celular por necrose ou apoptose (VINCENT *et al.*, 2004).

O estresse oxidativo intrínseco ocorre devido a presença de concentrações elevadas das espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células cancerosas (GIBELLINI *et al.*, 2010). O envolvimento de espécies reativas de oxigênio e também espécies reativas de nitrogênio (ERN) tem sido investigado nos mecanismos patogénéticos da carcinogênese (LEV *et al.*, 2003; BURTON; JAUNIAUX, 2011). Os mecanismos que podem levar ao estresse oxidativo, no paciente com câncer,

incluem: o metabolismo energético alterado; ativação crônica não-específica de citocinas pró-inflamatórias e o resultado do uso de drogas anti-neoplásicas (MANTOVANI *et al.*, 2004).

As ERO incluem espécies de radicais livres, que são muito reativas em decorrência de sua instabilidade, os quais, podem surgir da interação com agentes exógenos, pela exposição da célula a xenobióticos, que causam a redução incompleta do oxigênio (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A geração de radicais livres *in vivo* é um fenômeno constante que ocorre no metabolismo fisiológico ou por alterações patológicas. Radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais pares de elétrons desemparelhados que conferem um considerável grau de reatividade, e que possuam existência independente (livre) (GATÉ *et al.*, 1999).

Os principais grupos de ERO são as espécies radicalares: hidroxila (OH°), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^\cdot); e as não-radicalares: oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). Entre as ERN estão o óxido nítrico (NO^\cdot), a nitroxila (NO^-), o óxido nitroso (N_2O_3), o ácido nitroso (HNO_2), os nitritos (NO_2^-), os nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Alguns destes podem ser muito reativos e danosos.

Quando uma molécula de oxigênio captura um elétron, ela se torna um ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), considerado ERO primárias, que pode reagir com outras moléculas para formar ERO secundárias. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), molécula que não conta com um elétron desemparelhado, é menos reativo que o superóxido, e se difunde mais facilmente, podendo atravessar a membrana plasmática. O radical hidroxila (OH°) pode ser produzido a partir de peróxido de hidrogênio, e essa reação é catalisada pela oxidação de elementos como o Fe^{+2} . A OH° é a molécula oxidante mais reativa (GATÉ *et al.*, 1999; VALKO *et al.*, 2007), porém, todos apresentam capacidade para oxidar lipídeos de membrana, ácidos nucleicos, carboidratos, proteínas e enzimas, provocando dano celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Alguns ERO podem provocar reações em cadeia como ocorre com os lipídios insaturados de membrana na chamada lipoperoxidação (LPO). Esta LPO tem como produto intermediário, os lipoperóxidos, responsáveis por alterações na fluidez e permeabilidade da membrana celular, podendo ainda lesar proteínas, enzimas e receptores de membrana. A LPO tem como principal produto final, o malondialdeído

(MDA), o qual é importante na gênese de várias doenças e processos antiinflamatórios. O MDA pode ser detectado como marcador biológico da lipoperoxidação nos organismos (ZHANG *et al.*, 2002; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O organismo está sob constante ataque oxidativo das ERO, uma vez que o metabolismo aeróbio é alto na maioria das células. Assim um complexo e sofisticado sistema de defesas antioxidantes evoluiu e ganhou importância na manutenção do equilíbrio entre este ataque e sua capacidade de defesa (BURTON; JAUNIAUX, 2011). As células desenvolveram sistemas enzimáticos que convertem os oxidantes em moléculas não-tóxicas, protegendo o organismo do efeito deletério do estresse oxidativo (PEREIRA, 2008).

As defesas antioxidantes são compostas principalmente por enzimas, proteínas e moléculas de baixo peso molecular (antioxidantes não-enzimáticos). Entre as proteínas, existem as Tiol proteínas: peroxirredoxinas (Prx) e tiorredoxinas (Trx); e as ligadoras de metais de transição (principalmente ferro e cobre), tais como a ferritina, lactoferrina, albumina e ceruloplasmina. Já entre os compostos de baixo peso molecular (não-enzimáticos) estão o ácido úrico (AU); ácido lipóico (AL); coenzima Q (CoQ) e glutathione (GSH). O organismo conta também com os antioxidantes que tem origem na dieta como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pró-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (BARREIROS *et al.*, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2007).

Quanto às enzimas pode-se citar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) e glutathione-redutase (GSH-Rd). A enzima SOD converte o ânion superóxido em H_2O_2 e O_2 , sendo o H_2O_2 um produto menos tóxico. Essa enzima é a primeira linha na defesa celular contra o estresse oxidativo, e trabalha juntamente com enzimas que removem H_2O_2 , como a catalase e a glutathione peroxidase (GPx). A catalase é a segunda enzima que age na desintoxicação celular, pois converte H_2O_2 em água (H_2O) e O_2 . A GPx converte H_2O_2 em H_2O via oxidação da glutathione reduzida (GSH). A glutathione redutase permite a conversão da glutathione oxidada em GSH, o que é essencial para a viabilidade do GSH in vivo. O GSH é um tripeptídeo que apresenta um importante papel celular na síntese de proteínas, transporte de aminoácidos, síntese do DNA e na desintoxicação celular (GATÉ *et al.*, 1999).

A glutiona-S-transferase (GST) pertence a uma família multigênica de isoenzimas que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos à GSH. As várias isoformas da GST, podem metabolizar compostos carcinogênicos, poluentes ambientais, drogas, xenobióticos e detoxifica compostos endógenos reativos como hidroperóxidos de DNA (CNUBBEN *et al.*, 2001).

Essencialmente, manter os níveis dos sistemas antioxidantes mais elevados que os sistemas oxidantes é uma forma de se reduzir os danos induzidos pelo estresse oxidativo. Neste sentido, têm sido utilizados, através de suplementação, alguns antioxidantes ou ainda seus precursores (CERQUEIRA *et al.*, 2007). Um exemplo é a utilização de L-glutamina, precursora na formação de L-glutiona (GSH), o principal antioxidante celular não enzimático do organismo.

1.5 L-GLUTAMINA

Agentes antioxidantes são responsáveis pela inibição e redução de lesões causadas pelos radicais livres nas células. De maneira geral, atuam protegendo os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares.

A L-glutamina (C₅H₁₀N₂O₃) é um L- α -aminoácido, a qual pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo. É o aminoácido livre mais abundante no plasma e no tecido muscular, sendo encontrada em concentrações relativamente elevadas em outros tecidos corporais. Sua biossíntese ocorre a partir do glutamato e da amônia, quando catalisada pela glutamina sintetase em uma reação dependente do trifosfato de adenosina (ATP, Figura 1).

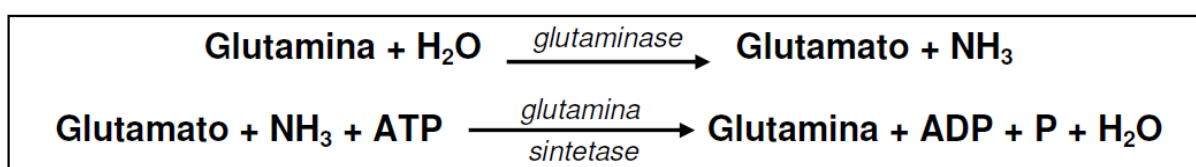


Figura 1 Interconversão glutamina-glutamato (WATFORD *et al.*, 2002)

Considerada como um aminoácido condicionalmente essencial em situações críticas do organismo, a L-glutamina, representa até 25% dos aminoácidos do plasma, sendo liberada principalmente da degradação protéica do músculo, local de seu maior estoque (50-60%) (FÜRST *et al.*; 2004). Graças aos seus dois grupos de

nitrogênio, a L-glutamina atua no transporte de nitrogênio entre vários tecidos principalmente do músculo para os órgãos viscerais.

Em condições fisiológicas normais, a concentração de glutamina é constante, sua homeostase depende do equilíbrio da sua produção e utilização (GRIFFITHS, 2001). Este aminoácido revela-se importante em estados hipercatabólicos, de balanço nitrogenado negativo, tais como infecções graves, trauma e câncer, onde há intensa proteólise muscular que pode ocorrer aumento da demanda de glutamina nestes tecidos, diminuindo seus níveis plasmáticos (ALBERTINI; RUIZ, 2001; BILOLO *et al.*, 2006; CURTI *et al.*, 2005).

Algumas células como enterócitos, linfócitos e células tumorais, devido à intensa proliferação, demandam mais nutrientes e tendem a consumir mais glutamina, pois esta fará parte da síntese protéica, da formação de glutamato e glutatona e ainda é precursora das purinas (Figura 2) (COLQUHOUN; NEWSHOLME, 1997; ALPERS, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

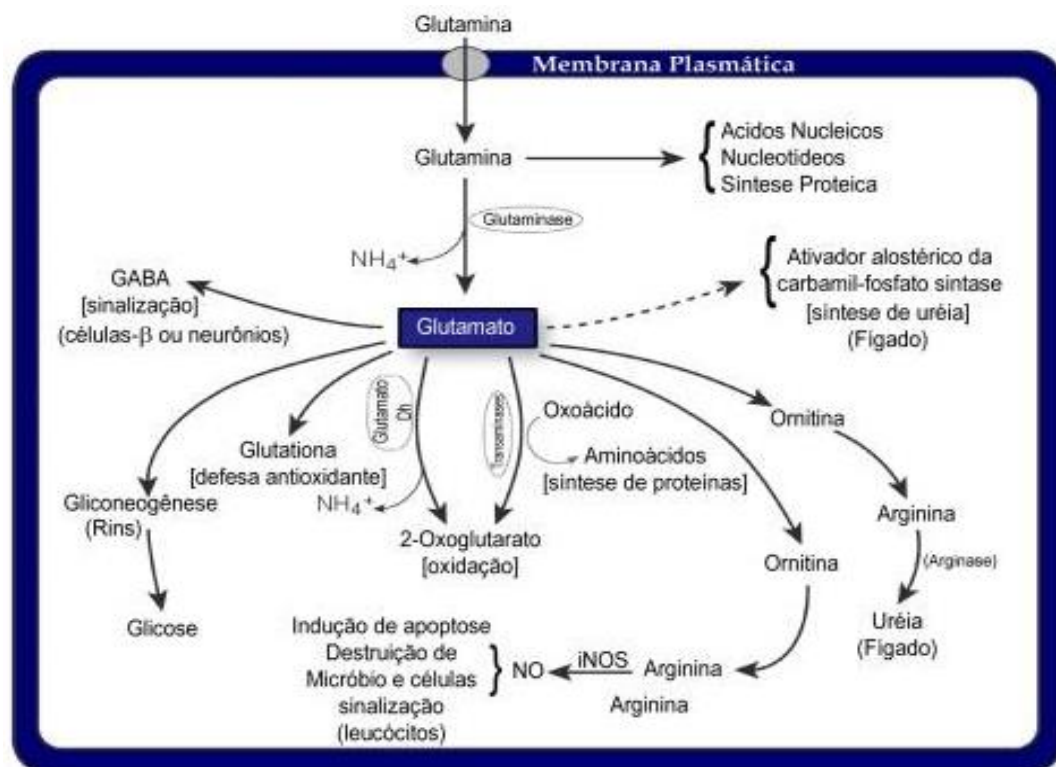


Figura 2 Utilização da glutamina em forma de glutamato (DE LIMA, 2008).

Alterações fisiológicas adaptativas, como intensa mobilização de proteína pelos pulmões e principalmente pelos tecidos musculares, para o aumento da síntese desse aminoácido, podem ocorrer em estado de catabolismo intenso, devido a competição pela utilização de glutamina por células tumorais e imunitárias

(KRZYWKOWSKI *et al.*, 2001; ALPERS, 2006). Partindo desta hipótese, a suplementação de glutamina poderia diminuir o efeito do catabolismo, aumentando a atividade das células imunitárias.

O papel antioxidante da L-glutamina se faz através da L-glutationa, um tripeptídeo constituído por glutamina, cisteína e glicina, que alterna seu estado redox entre GSH (estado reduzido) e o GSSG (estado oxidado). A ação antioxidante da glutaciona está centrada no grupamento sulfidrílico (-SH) doador de elétrons (CAO; PRIOR, 1998). Algumas vias da formação de ERO e a participação da GSH no equilíbrio do estresse oxidativo estão demonstradas na Figura 3 (VALKO *et al.*, 2007).

A L-glutamina no seu processo catabólico gera precursores para a síntese de moléculas importantes, tais como a GSH (CURI *et al.*, 2005). A enzima mitocondrial fosfato-glutaminase metaboliza a L-glutamina, formando glutamato e amônia, que são transportados para o citoplasma, onde através do ciclo gama-glutamil, o glutamato é usado na síntese de GSH. Dessa forma, a L-glutamina mantém o pool de glutamato intracelular, não permitindo que ocorra a depleção da GSH (AMORES-SÁNCHEZ; MEDINA, 1999).

A GSH é o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular; a sua concentração é de aproximadamente 2mM e mais de 10 mM em eritrócitos humanos e hepatócitos, respectivamente. Este tripeptídeo é encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos. Nota-se a ligação γ -peptídica pouco usual, a presença da porção γ -glutamil e do grupo α -carboxilato livre prevenindo a hidrólise da GSH pelas peptidases celulares que degradam outros peptídeos pequenos. O seu principal papel é a manutenção do balanço redox celular (HUBNER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A., 2008). Possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo, desempenhando o papel de substrato para a GSH peroxidase, uma enzima antioxidativa que absorve vários peróxidos (URCINI *et al.*, 1985).

O papel fisiológico da GSH como um antioxidante tem sido descrito e fundamentado em numerosas desordens, de tal forma que o aumento da oxidação é um resultado do metabolismo anormal da mesma (MEISTER; ANDERSON, 1983; ZIEGLER, 1985). Muitos relatos têm demonstrado que a ação da GSH é como um

antioxidante endógeno, necessitando de mais estudos relacionando o efeito da ingestão na dieta contra o estresse oxidativo (UENO *et al.*, 2002).

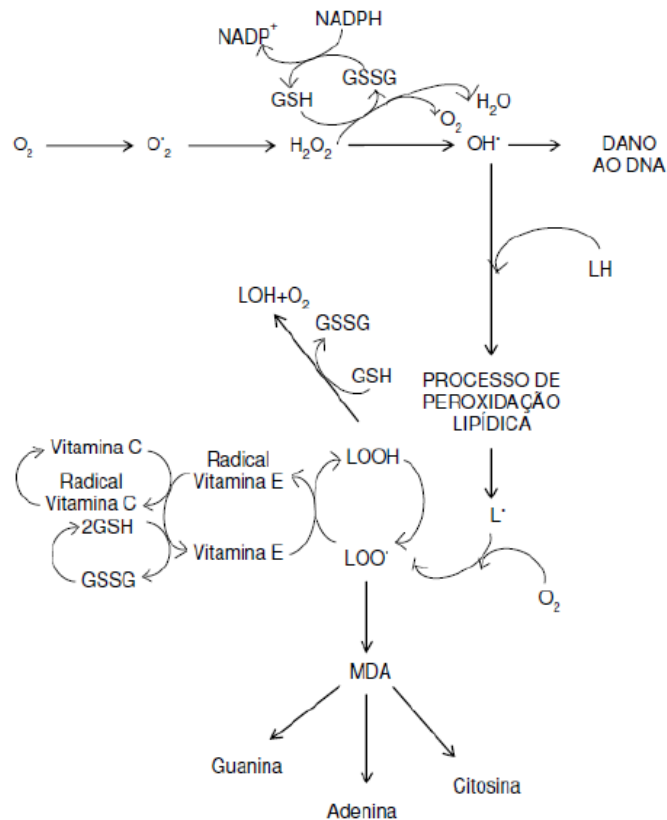


Figura 3 Formação de espécies reativas de oxigênio, lipoperoxidação e proteção antioxidante (SORIA, 2012; adaptado de VALKO *et al.*, 2007).

As células epiteliais da mucosa intestinal apresentam alta concentração de glutaminase, compatível com as altas taxas de captação e consumo de L-glutamina (CHWALS, 2004). O intestino se constitui no principal órgão na síntese de GSH, mas, na presença de estresse oxidativo, a diminuição da concentração de L-glutamina se constitui em um fator limitante para a sua síntese. Esse efeito pode ser minimizado com o fornecimento de suplementação adicional desse aminoácido (ROUSE *et al.*, 1995).

Situações diversas, como doenças inflamatórias, diabetes, câncer, envelhecimento e exercícios extenuantes podem depletar a GSH levando o organismo ao estresse oxidativo. A suplementação com L-glutamina tem mostrado efeitos positivos na redução de radicais livres em diversas situações, como por exemplo, em exercícios físicos exaustivos reduzindo a formação de lesão celular pelo aumento de ERO, e na neuropatia diabética promovendo um efeito neuroprotetor no sistema nervoso entérico (SNE) frente ao estresse oxidativo

induzido pelo diabetes (ROTH *et al.*, 2002; TOWNSEND *et al.*, 2003; BELMONTE *et al.*, 2007; ALVES, 2010).

Níveis de GSH mostram-se aumentados em ratos suplementados com L-glutamina (ROTH *et al.*, 2002). Adicionalmente, os efeitos benéficos da L-glutamina, também foram observados por Pereira *et al.* (2011) no combate às ERO, estas que são consideradas as principais causadoras da morte de neurônios, principalmente por provocar danos na membrana celular e fragmentação do DNA. A morte neuronal no SNE, relacionada ao estresse oxidativo, pode ser minimizada com a suplementação com antioxidantes dietéticos como observado em alguns trabalhos (PEREIRA *et al.*, 2004; DE FREITAS *et al.*, 2008).

Experimentações em ratos, realizadas por Yoshida *et al.*, 2001 e Salomão; Gomes-Marcondes, 2012, demonstraram que a L-glutamina, ao contrário do que se pensava, não provoca crescimento tumoral, revelando ser uma importante arma na redução do crescimento acelerado destas células, provavelmente por reduzir a resposta inflamatória. Nos últimos anos, estudos têm sugerido que a suplementação com L-glutamina é benéfica para pacientes críticos, uma vez que a mesma influencia a resposta inflamatória, o estresse oxidativo, a modulação de apoptose, a integridade da barreira intestinal e a plasticidade neural entérica (OLIVEIRA *et al.*, 2010; ALVES, 2010).

Em pacientes com câncer, a permeabilidade da membrana intestinal pode aumentar, debilitando a barreira da mucosa e predispondo o paciente a maiores complicações. Suplementação com glutamina tem mostrado redução da permeabilidade da membrana da mucosa intestinal. Isto mantém sua estrutura, prevenindo a redução da secreção intestinal de imunoglobulina A (IgA), que conserva a concentração, a estrutura e função intestinal e conseqüentemente, melhora o sistema imunitário (SACKS, 1999).

Os neurônios do trato gastrointestinal (TGI) têm sido objeto de diversas investigações utilizando modelos experimentais que induzem ao estresse oxidativo como o envelhecimento, diabetes, câncer, doenças parasitárias e atividade física. As células neurais do TGI fazem parte de um sistema nervoso próprio da parede intestinal, o SNE. Estes estudos observam as disfunções intestinais, as quais, em parte, são atribuídas às alterações morfológicas e quantitativas dos neurônios e à expressão de neurotransmissores no SNE (ZANONI *et al.*, 1997; MAIFRINO *et al.*,

1999; FREGONESI *et al.*, 2001; FURLAN *et al.*, 2002; MAREGA, 2001; KIETZER, 2002; DE BRITTO *et al.*, 2008, ALVES *et al.*, 2010).

1.6 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE)

O trato gastrointestinal possui um sistema nervoso intrínseco, denominado SNE, e o mesmo, é formado por uma grande concentração de neurônios com ampla diversidade funcional. Considerada uma grande e complexa divisão do sistema nervoso autônomo (SNA), o SNE, tem função independente, sendo capaz de conduzir as funções do TGI, sem depender de comandos centrais. Suas características o fazem bastante similar ao cérebro, podendo o mesmo ser descrito como o "segundo cérebro", incluindo a organização compacta de elementos gliais e neurais, ausência de colágeno, espaço extracelular restrito e neurotransmissores comuns (FURNESS, 2012).

Este SNE distribui-se por todo o sistema digestório tubular, desde o esôfago até o canal anal. Sua organização acontece através de plexos, que podem ser ganglionados ou não, e interagem por meio de numerosos neurotransmissores. As funções são controladas por uma interação dinâmica entre os diferentes tipos de células ou por meio de um grande número de moléculas sinalizadoras (MAZZONE; FARRUGIA, 2007).

Além de sua própria rede neuronal, no SNE existem terminações neuronais extrínsecas do sistema nervoso simpático e parassimpático, conectadas por fibras aferentes e eferentes ao SNC. Entre suas funções, o SNE pode controlar e coordenar a motilidade intestinal, as secreções exócrinas e endócrinas, a absorção, a microcirculação e o sistema imune local, além de modular a resposta inflamatória do TGI (GABELLA, 1984; FURNESS; COSTA, 1987; GABELLA, 1990; GERSHON, 1999; FURNESS, 2006).

Os plexos ganglionados (grupos de neurônios com suporte de células da glia revestidos por uma lâmina basal e tecido conjuntivo), são interligados por feixes de fibras nervosas formando uma rede. Já os plexos não-ganglionados são encontrados na musculatura longitudinal e circular, na muscular da mucosa, junto aos vasos sanguíneos, nas bases das glândulas endócrinas da mucosa, e no interior das vilosidades.

Intrinsecamente, as células nervosas do SNE possuem corpos celulares inseridos em dois plexos ganglionados, o plexo mientérico e o plexo submucoso. Os plexos ganglionados do SNE juntos somam de 400-600 milhões de neurônios, dispersos ou reunidos em gânglios, equivalendo-se quase tanto ao que é encontrado na medula espinal (FURNESS, 2006; FURNESS, 2012). O plexo mientérico (de Auerbach) se localiza entre os estratos circular e longitudinal da túnica muscular, e o plexo submucoso (Meissner) localizado na tela submucosa (Figura 4) (FURNESS; COSTA, 1987; FURNESS, 2012).

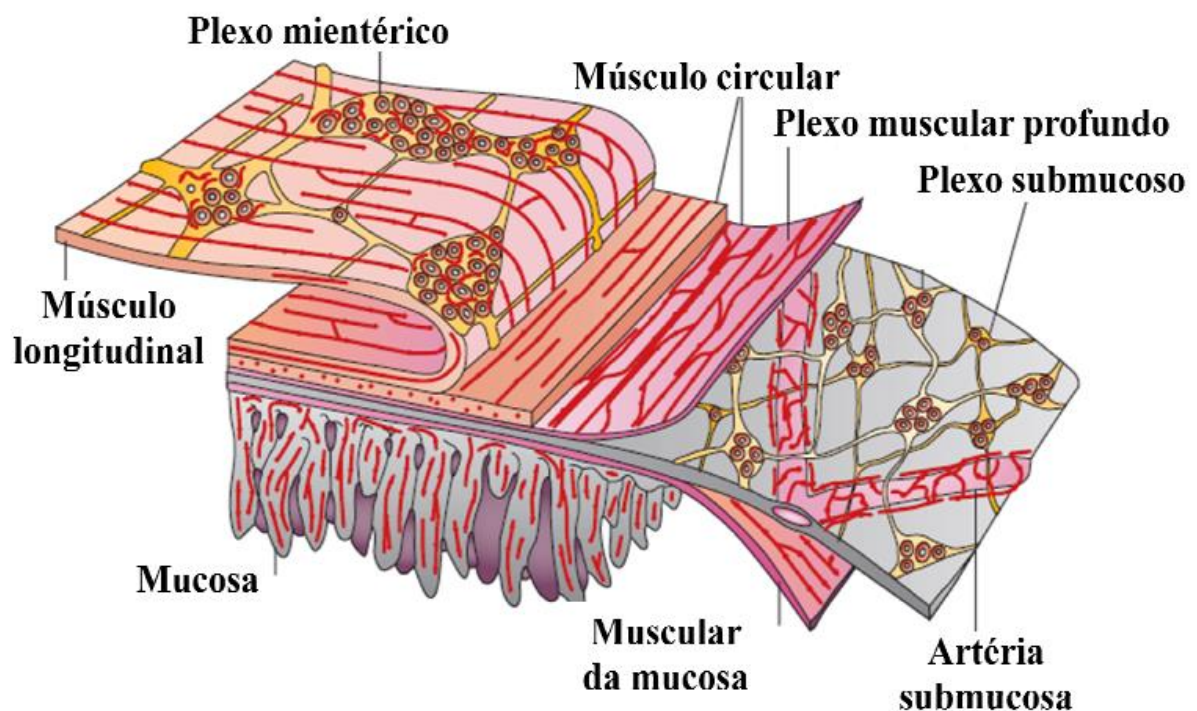


Figura 4 Organização do SNE de mamíferos. O SNE possui plexos ganglionados, o plexo mientérico entre as camadas longitudinal e circular da musculatura externa e o plexo submucoso, localizado na submucosa. Feixes de fibras nervosas ligam os gânglios e também formam os plexos que inervam o músculo longitudinal, músculo circular, muscular da mucosa, artérias intrínsecas e mucosa (adaptada de FURNESS, 2012).

O gânglio mientérico varia em tamanho, forma e orientação, entre as várias espécies e ao longo dos segmentos intestinais. Os neurônios deste plexo são responsáveis pelo controle contrátil da musculatura; inervação motora das duas túnicas musculares e inervação secretomotora da mucosa. O plexo submucoso inerva a muscular da mucosa, células neuroendócrinas e vasos sanguíneos da camada submucosa; os neurônios deste plexo regulam principalmente as atividades secretomotoras e vasomotoras da mucosa (FURNESS; COSTA, 1983; FURNESS,

2006; BREHMER, 2006). Nesses plexos são grandes as variedades de tipos neuronais, numerosos neurotransmissores e receptores com diversas propriedades funcionais, constituindo uma verdadeira rede de controle da motilidade digestiva e vascular (FURNESS; COSTA, 1987; FURNESS, 2012).

Este sistema complexo é integrado em vários outros sistemas, tais como células do sistema imune e as redes de células intersticiais de Cajal (CIC). Além dos neurônios do SNE, outras células, como as CIC, contribuem para a atividade motora peristáltica (WARD *et al.*, 2006; BURNS 2007; FARRUGIA, 2008). O resultado dessas interações é a coordenação eficaz da motilidade, secreção e fluxo de sangue no trato gastrointestinal. As CIC geram ondas lentas e estão envolvidas na neurotransmissão e no controle eficaz do potencial da membrana do músculo liso (MAZZONE; FARRUGIA, 2007). Estão relacionadas anatômica e funcionalmente ao SNE (NEWGREEN, 2002). É sugerido que a diferenciação das CIC é dependente da localização no SNE e que a redução no número das mesmas está associado com várias doenças que acometem o SNE.

1.7 CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL (CIC)

As CIC foram descobertas e descritas pelo pesquisador espanhol Santiago Ramón y Cajal (1911), primeiramente classificadas como neurônios primitivos, capazes de modificar a contração do músculo liso. Após as descrições de Cajal, essas células ganharam importância (1970-1980), sendo identificadas usando diferentes nomes, até serem chamadas de células intersticiais de Cajal, como são conhecidas na nomenclatura atual (GARCIA-LOPEZ; FREIRE; GARCIA-MARIN, 2009).

Existem algumas variações estruturais entre espécies e diferenças devido à sua localização no intestino, mas a ultra-estrutura da CIC pode ser caracterizada pela presença de várias mitocôndrias; retículo endoplasmático rugoso; junções comunicantes com células musculares lisas (HUIZINGA *et al.*, 1995; CAMBOROVÁ *et al.*, 2003; BLAIR *et al.*, 2014).

As CIC apresentam estabelecidas quatro funções distintas. Elas geram ondas elétricas lentas que são transmitidas passivamente para o músculo liso gastrointestinal (HUIZINGA *et al.*, 1995; WARD *et al.*, 1994; SANDERS *et al.*, 2006). Sinalizam a neurotransmissão colinérgica e nitrérgica (BURNS *et al.*, 1996; WARD *et*

al., 2000; WARD; SANDERS, 2006). Regulação de potenciais de ação na membrana celular do músculo liso e gradiente de potencial eletroquímico (FARRUGIA *et al.*, 2003; SHA *et al.*, 2007; GIBBONS; FARRUGIA, 2004) e parecem estar envolvidas na mecanotransdução (STREGGE *et al.*, 2005; WON *et al.*, 2005).

As CIC participam do controle da motilidade do TGI. Essas células associadas ao SNE geram e propagam “ondas lentas”, espontaneamente, para as camadas musculares, constituindo o que é chamado por sistema de marcapasso que determina a frequência de contração fásica (SANDERS, 1996; WARD *et al.*, 2006; BURNS, 2007; HUIZINGA *et al.*, 2009). As ondas de contração possuem ritmicidade, frequência e amplitude de contração, as quais são determinadas pela atividade elétrica de ondas lentas, geradas e propagadas por CIC à musculatura lisa (SANDERS *et al.*, 2000). Assim, muitos estudos vêm tentando caracterizar as condutâncias responsáveis pelas ondas lentas no TGI, mas a precisão do mecanismo da ritmicidade elétrica ainda é debatido (CAMBOROVÁ *et al.*, 2003; WARD *et al.*, 2006; BURNS 2007).

Estão localizadas ao longo de todo TGI, do esôfago até o esfíncter anal interno (DANIEL *et al.*, 1984; HAGGER *et al.*, 1998); e a máxima densidade é encontrada na parte externa da camada muscular circular, seguida de sua parte mais interna. Na camada longitudinal ela diminui progressivamente em direção à serosa (WEDEL *et al.*, 2002; RINTALA, 2006; Figura 5).

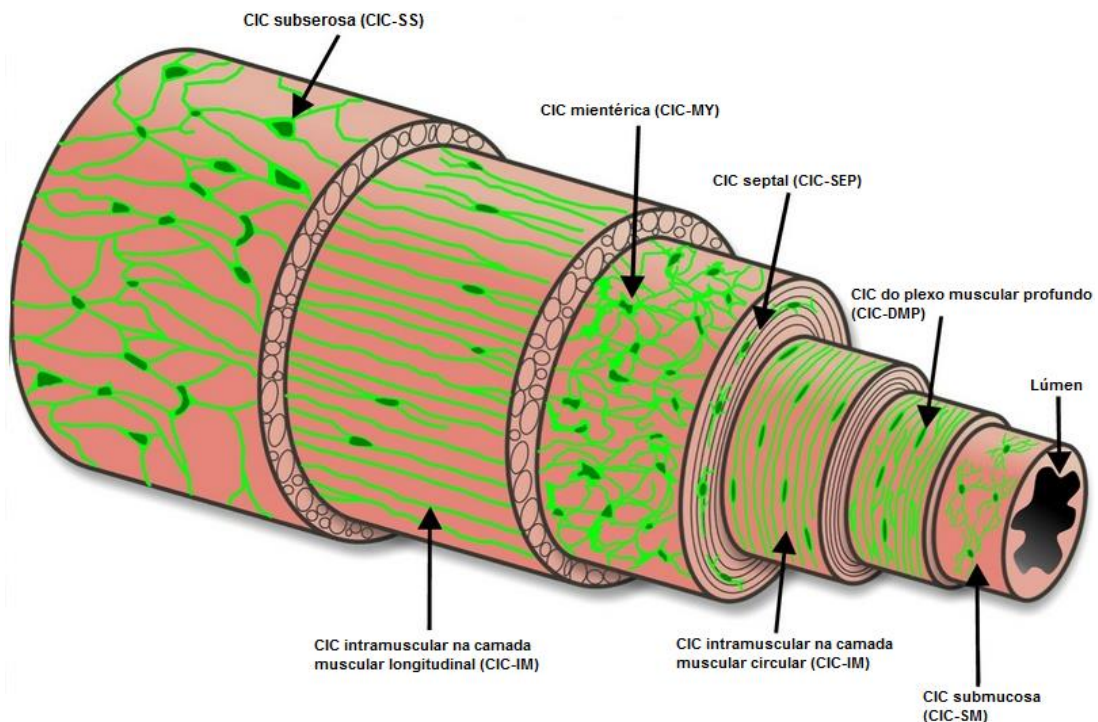


Figura 5 Descrição das subpopulações das CIC (adaptada de BLAIR *et al.*, 2014).

As CIC são classificadas em vários subtipos, baseado em dados morfológicos e funcionais e em função da sua localização nas camadas de tecido do TGI (GABELLA, 1979; HANANI *et al.*, 2005; GFROERER; ROLLE, 2013). A forma da célula e disposição de cada subtipo é determinada principalmente por três fatores: (1) a relação com plexos nervosos locais, (2) pela orientação da camada de músculo liso que está contida e (3) pela frequência de ligações com outras CIC (HANANI, *et al.*, 2005; GFROERER; ROLLE, 2013).

As CIC podem estar localizadas no estômago (a), intestino delgado (b) e cólon (c), podendo ser classificadas e representadas esquematicamente conforme a Figura 6.

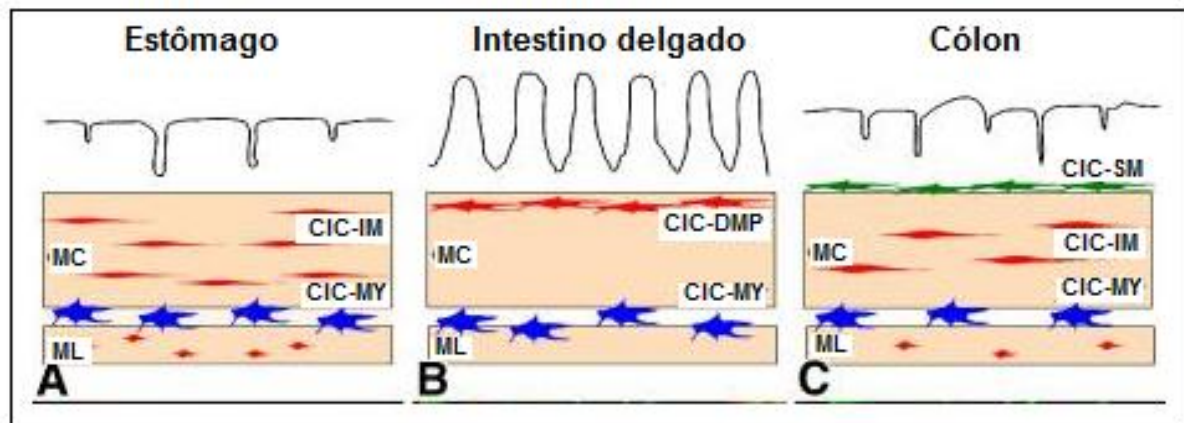


Figura 6 Visão geral dos subtipos de CIC no TGI. Representações esquemáticas de CIC no estômago (A), intestino delgado (B), cólon (C). Camada muscular circular (MC) e camada muscular longitudinal (ML). Células intersticiais de Cajal do plexo mientérico (CIC-MY). Células intersticiais de Cajal do plexo muscular profundo (CIC-DMP). (adaptada de LINO; HORIGUCHI, 2006).

As CIC localizadas no interior do espaço intermuscular entre as camadas musculares longitudinal e circular; aderidas a camada muscular longitudinal externa, localizadas próximas ao plexo mientérico são conhecidas como CIC-MY. São células com citoplasma multipolar, processos citoplasmáticos primários que projetam processos secundários, terciários e mais processos de ramificações que se interconectam com seus homólogos (junções gap), caracterizando uma rede tridimensional (BLAIR *et al.*, 2014). Elas formam uma rede de "telefonia" celular no espaço da camada mientérica, porém é independente do plexo mientérico e as mesmas podem apresentar receptores para vários neurotransmissores (PATTERSON *et al.*, 2001). Sua função mais específica consiste em gerar ondas

lentas na musculatura, se comportando como células marcapasso no estômago e no intestino delgado (LINO; Horiguchi, 2006; Blair *et al.*, 2014).

De uma forma geral, esses subtipos podem ser organizados conforme a Figura 7.

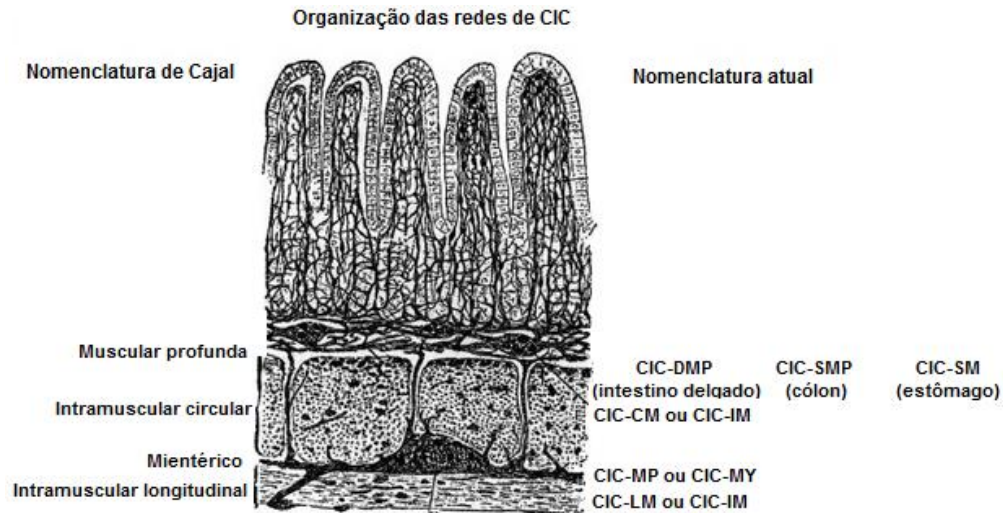


Figura 7 Organização dos subtipos de CIC de acordo com Cajal e a atual nomenclatura. Células intersticiais de Cajal do plexo muscular profundo (CIC-DMP ou CIC-SMP ou CIC-SM). Células intersticiais de Cajal da camada muscular circular (CIC-CM ou CIC-IM). Células intersticiais de Cajal do plexo mientérico (CIC-MP ou CIC-MY). Células intersticiais de Cajal da camada muscular longitudinal (CIC-LM ou CIC-IM). (adaptada de GARCIA-LOPEZ; FREIRE; GARCIA-MARIN, 2009).

As CIC encontradas entre a camada mais interna e a camada mais externa da muscular circular, aderidas a camada circular interna próximas do plexo muscular profundo (DMP), são conhecidas como CIC-DMP (MAZZONE; FARRUGIA, 2007). Classificadas como células multipolares com processos finos ao longo das fibras nervosas no DMP, capazes de interagir com células musculares por meio de junções do tipo gap e cavéolas, permitindo-lhes transmitir informações da inervação nitrérgica e colinérgica para os músculos (BURNS *et al.*, 1996; BECKETT *et al.*, 2002; WANG; PATERSON; HUIZINGA *et al.*, 2009; WARD *et al.*, 2006), são em menor número, quando comparadas com as CIC-MY, e as suas redes celulares são relativamente soltas no intestino delgado (KOMURO, 2006; BLAIR *et al.*, 2014).

As CIC da muscular circular (CIC-CM), são principalmente células bipolares orientadas ao longo do eixo de células musculares lisas. No entanto, a distribuição e densidade das células do CIC-CM diferem consideravelmente de órgão para órgão, CIC-CM no intestino delgado mostram frequentemente ramos citoplasmáticos secundários e são escassamente distribuídos com feixes nervosos. Em contraste, o

CIC-CM do estômago e do cólon mostram uma forma alongada do eixo simples, mas são densamente distribuídos ao longo de feixes de nervos (KOMURO, 2006; BLAIR *et al.*, 2014).

As CIC da muscular longitudinal (CIC-LM), são semelhantes as CIC-CM em forma celular, mas são geralmente menos numerosas do que as CIC-CM em quase todo o trato gastrointestinal, ou seja, estômago, intestino delgado e cólon (KOMURO, 2004). Localizadas nas próprias camadas musculares; na muscular longitudinal e na muscular circular são juntas referidas como CIC intramuscular (CIC-IM) (SANDERS, 1996; BLAIR *et al.*, 2014).

As CIC da submucosa (CIC-SM; CIC-SMP), são encontrados na interface entre o tecido conjuntivo da submucosa e a camada mais interna da circular muscular da região pilórica do estômago (HORIGUCHI *et al.*, 2001; SEKI; KOMURO, 2002; MITSUI; KOMURO, 2003) e do cólon, respectivamente (BEREZIN *et al.*, 1988; ISHIKAWA; KOMURO, 1996). Seus eixos celulares são paralelos com a camada circular, mas contêm células multipolares com alguns processos secundários e parecem formar uma rede frouxa (KUNISAWA; KOMURO, 2004), sendo elas responsáveis pela estimulação das glândulas para liberação de seu conteúdo interno em direção ao lúmen (BAYGUINOV *et al.*, 2010; BLAIR *et al.*, 2014). As CIC da subserosa (CIC-SS), células intersticiais estreladas na camada subserosa foram observadas no intestino delgado de ratos (THUNEBERG, 1982) e no intestino grosso (VANDERWINDEN *et al.*, 2000).

As CIC são células de origem mesenquimal e possuem receptores de tirosina quinase (c-Kit) em sua superfície (MAWEI, 2009). C-Kit é o produto de um proto-oncogene que regula o desenvolvimento e diferenciação de células progenitoras das linhagens de melanócitos, células germinativas e hematopoéticas (WARD *et al.*, 1994). Estudos demonstram a importância da expressão de c-Kit para o desenvolvimento e manutenção de CIC e, conseqüentemente para o desenvolvimento intestinal normal. O c-Kit parece ser fator indispensável à sobrevivência de algumas, mas não de todas as classes de CIC (MAEDA *et al.*, 1992; TAKAKI, 2003). Vários distúrbios da motilidade gastrointestinal têm sido associados com depleção de kit-positivo (C-kit) para CIC (FELDSTEIN *et al.*, 2003; FORSTER *et al.*, 2005; HANANI *et al.*, 2005).

Outra proteína apresenta expressão elevada e específica nas CIC, identificada como DOG-1 (WEST *et al.*, 2004; ESPINOSA *et al.*, 2008). É uma

proteína transmembrana que atua na regulação dos canais de Ca^{2+} e Cl^- (CaCCs), conhecida atualmente como TMEM16A codifica o Anoctamin 1 (ANO1), alternando polarização e repolarização das CIC na condução de impulso de ondas lentas, possuindo papel importante para as contrações rítmicas do músculo liso intestinal (YANG *et al.*, 2008; CAPUTO *et al.*, 2008; SCHROEDER *et al.*, 2008; FERRERA *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2009).

Ano1 é parte de uma família de 10 produtos de genes (ANO1 a ANO10 ou TMEM16A para TMEM16K) com sequências primárias similares e estruturas secundárias. A expressão do ANO1 foi descoberta em tumores estromais gastrintestinais (WEST *et al.*, 2004; ESPINOSA *et al.*, 2008; STANICH *et al.*, 2011) e está relacionada a outras doenças incluídas nas disfunções do trato gastrintestinal, principalmente distúrbios da motilidade. A expressão de anoctamins foi analisada principalmente em ratos e a proteína Ano1 foi expressa positivamente nos tratos gastrointestinais de ratos, seres humanos e primatas não-humanos (*Macaca fascicularis*) (GOMEZ-PINILLA *et al.*, 2009; HWANG *et al.*, 2009; SANDERS *et al.*, 2012).

A Ano1 parece ser a condutância dominante das ondas lentas nas CIC, e, é mais específico para as mesmas do que o c-Kit, pois o c-Kit também é expresso pelos mastócitos no intestino. A imunomarcagem para Ano1 e c-Kit mostrou que células imunopositivas para Ano1 eram exclusivamente CIC (HWANG *et al.*, 2009; GOMEZ-PINILLA *et al.*, 2009).

Tem sido demonstrado que a atividade elétrica de marcapasso muscular tem início através de correntes internas no citoplasma de CIC, conduzidas a partir de alterações em canais iônicos, seguido de despolarização da membrana plasmática. A condutância é seletiva a canais de cloro, os quais são ativados por canais de cálcio (Ca^{2+}), acionados por um processo dependente de voltagem. A entrada de Ca^{2+} e, eventualmente, liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, pode ser o sinal que ativa a grande corrente interna nas CIC (ZHU *et al.*, 2009; BLAIR *et al.*, 2014; Figura 8 e Figura 9).

O termo “ondas lentas” faz referência ao ciclo de despolarização e repolarização induzido na célula muscular lisa. As CIC contribuem para a manutenção do potencial de repouso negativo, o qual assegura uma fase de relaxamento entre as contrações (SANDERS *et al.*, 1999). A atividade de marcapasso controla o potencial de membrana da célula muscular lisa aumentando

a possibilidade de abertura dos canais de Ca^{2+} e de iniciar o potencial de ação nessas células, resultando em excitabilidade muscular (MAZZONE; FARRUGIA, 2007).

As CIC fornecem vias necessárias para propagação das ondas elétricas nas células musculares lisas de modo indispensável à peristalse (MAZZONE; FARRUGIA, 2007). Portanto, a atividade elétrica espontânea através de CIC é uma importante via de ativação do músculo liso do TGI, mas não é a única e ocorre sobreposta a impulsos regulatórios nervosos, hormonais e parácrinos (SANDERS, 2000).

As CIC se encontram fisicamente interpostas entre varicosidades de terminais nervosos e fibras musculares lisas adjacentes. Estabelecem contatos sinápticos com neurônios e formam junções comunicantes com as células musculares lisas e, ainda entre uma CIC e outra, facilitando a neurotransmissão (BECKETT *et al.*, 2002; SANDERS; WARD, 2006).

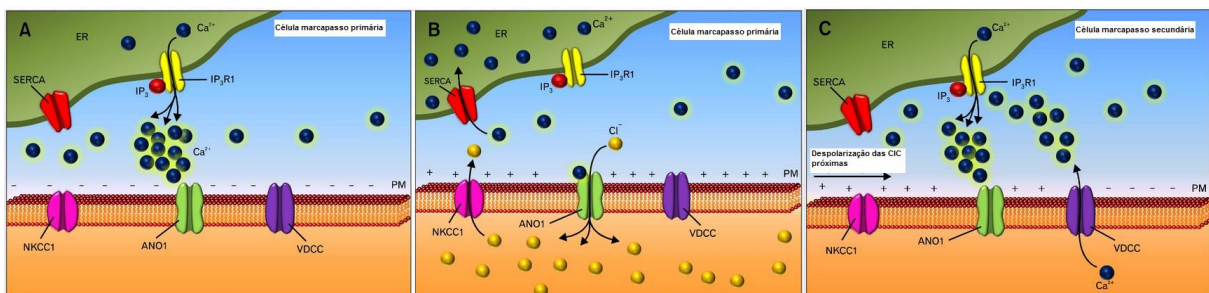


Figura 8 Mecanismo de geração intracelular da atividade de marca-passo das CIC. (A) liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares pela ativação transitória dos canais anoctamin-1 (Ano1). (B) produção de correntes transitórias espontâneas em células de marca-passo primárias. NKCC1 repõem íons Cl^- intracelulares. (C) ondas lentas despolarizam CIC próximas, desencadeando a ativação de canais voltagem-dependentes de Ca^{2+} em células marca-passos secundárias (adaptada de BLAIR *et al.*, 2014).

As CIC dentro do trato gastrointestinal possuem uma série de neurotransmissores e sua atividade é influenciada por neurônios motores do SNE, colinérgicos ou nitrérgicos, através da liberação dos respectivos neurotransmissores (IWASAKI *et al.*, 2006; MAZZONE; FARRUGIA, 2007). Os mediadores não adrenérgicos e não colinérgicos (NANC), envolvidos na motilidade intestinal englobam um importante sistema de neurotransmissores, dentre eles, o NO que aparece como neurotransmissor inibitório NANC dominante no SNE (NEZAMI; SRINIVASAN, 2010).

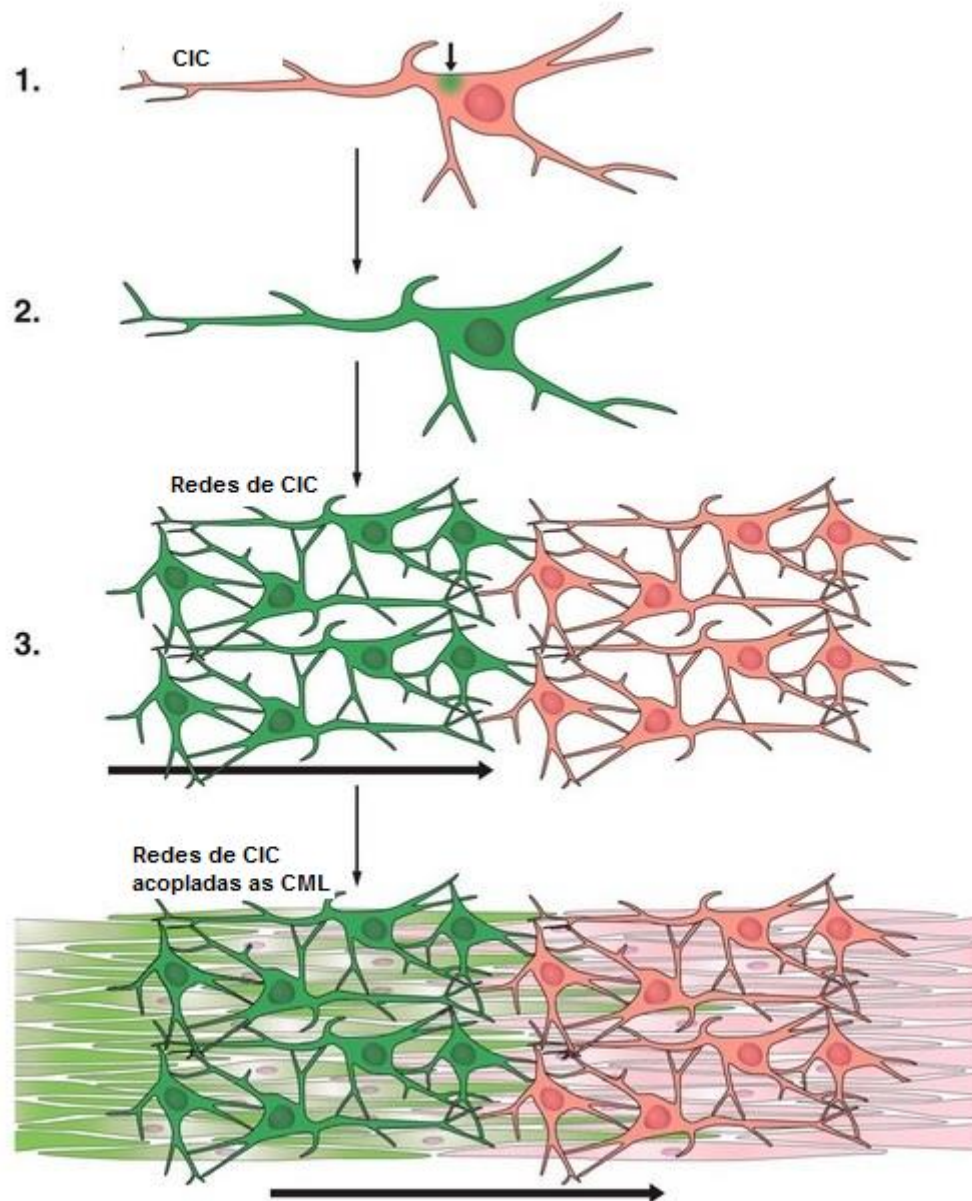


Figura 9 Ativação da propagação de ondas lentas. 1º passo: elevação do Ca^{2+} em todas as células. 2º passo: despolarização ativa entrada de Ca^{2+} e liberação de Ca^{2+} em toda CIC. 3º passo: despolarização ativa propagação de ondas lentas na rede de CIC (seta preta horizontal mostra a direção de propagação). 4º passo: ondas lentas se propagam pela rede de CIC, e conduzem passivamente para as células musculares lisas acopladas eletricamente (adaptada de SANDERS; WARD; KOH, 2014).

O NO é considerado um mediador inibitório dos neurônios entéricos que contém a enzima óxido nítrico sintase (NOS), conhecidos como neurônios nitrérgicos (BULT et al., 1990). Segundo Ward (2000), as CIC atuam como um elo fundamental na neurotransmissão inibitória entérica. Os neurônios entéricos liberam neurotransmissores que ligam-se principalmente aos receptores expressos por CIC. Os terminais de neurônios motores entéricos liberam o neurotransmissor, a CIC

medeia e traduz impulsos nervosos para as células musculares lisas na forma de respostas mecânicas (WARD, 2000).

Para as CIC estarem envolvidas na neurotransmissão, devem expressar receptores e efetores apropriados para ocorrer a transdução de sinais. As respostas ao NO no TGI depende da produção de GMP cíclico (cGMP) pela guanilato ciclase solúvel. A guanilato ciclase é uma enzima heterodímera composta por duas subunidades, α e β e estudos imunohistoquímicos mostraram que ambas as subunidades são fortemente expressas em CIC (IINO *et al.*, 2008;) (Figura 10).

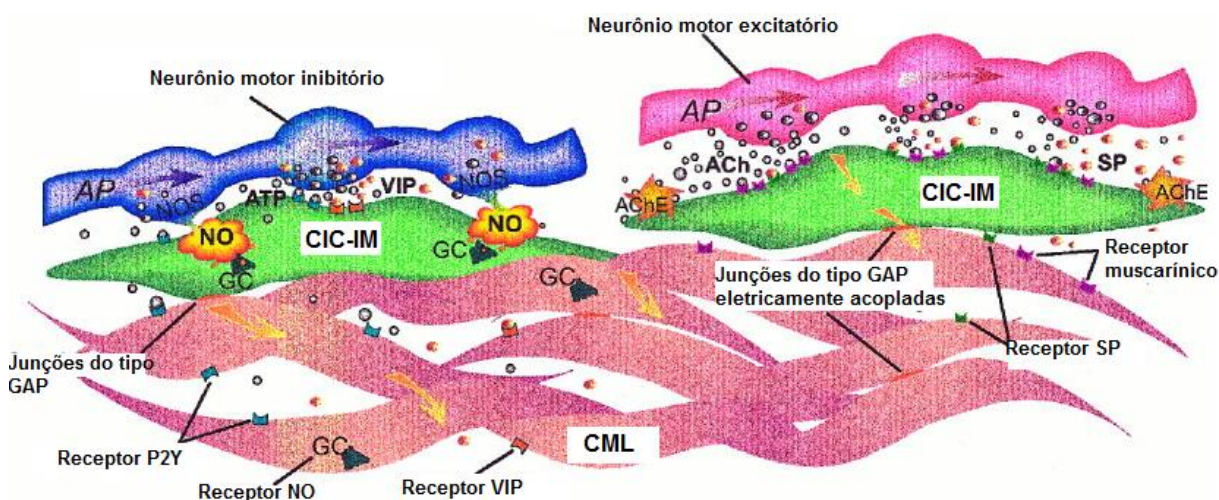


Figura 10 Principais alvos da inervação motora entérica. Neurônios motores inibitórios e excitatórios. Receptor guanilato ciclase (GC) para NO. Células musculares lisas (CML) (adaptada de WARD; SANDERS, 2001).

A literatura descreve vários trabalhos, os quais sugerem que as CIC participem da neurotransmissão dependente de NO (BURNS *et al.*, 1996; WARD *et al.*, 1998a; FARRÉ *et al.*, 2007). As CIC expressam seletivamente os canais de íons e sistemas de segundos mensageiros, que são necessários para a transdução de sinais de NO liberado por neurônios nitrérgicos, e que poderiam ativar vias inibitórias em células pós-juncionais (BURNS *et al.*, 1996; WARD *et al.*, 1998b; FARRÉ *et al.*, 2007). Além disso, baseado em experimentos em cultura, é sugerido que o NO derivado de neurônios nNOS desencadeia importante papel na sobrevivência de CIC, atuando como molécula citoprotetora. O tratamento com doadores de NO promove o aumento do número de CIC, enquanto que o tratamento com inibidores do NO leva a diminuição destas células (CHOI *et al.*, 2007).

Entretanto, segundo alguns autores as evidências do papel de CIC na neurotransmissão são indiretas e circunstanciais. As CIC respondem ao SNE, mas

não quer dizer que estas células são responsáveis por traduzir sinais neuronais para células musculares lisas e não provam que CIC medeiam a neurotransmissão (GOYAL; CHAUDHURY, 2010).

A perda de CIC ou o desmantelamento das redes de células têm sido relatada em uma ampla série de doenças do trato gastrointestinal incluindo acalasia (FAUSSONE-PELLEGRINI *et al.*, 1985; KHELIF *et al.*, 2003; KRAICHELY; FARRUGIA, 2006), pseudo-obstrução intestinal crônica (YAMATAKA *et al.*, 1998; FELDSTEIN *et al.*, 2003), doença de Hirschsprung (VANDERWINDEN *et al.*, 1996; PIOTROWSKA *et al.*, 2003), doença inflamatória intestinal (RUMESSEN *et al.*, 1996), constipação de trânsito lento (HE *et al.*, 2000; WEDEL *et al.*, 2002), gastroenteropatia diabética (ZARATE *et al.*, 2003; FORSTER *et al.*, 2005), tumor (FARRUGIA, 2008), entre outras. Porém, não é possível afirmar se a ausência das CIC causam doenças ou se a doença causa a falta das mesmas (BURNS, 2007).

Muito já se explorou no que se refere ao reconhecimento da importância das CIC para a integridade da função motora do digestório (THUNEBERG, 1982), no entanto, o interesse em relacionar sua função com as alterações causadas pelo estresse oxidativo ainda não está totalmente elucidado (WEST, 2004).

Disfunções na motilidade intestinal tais como a constipação, têm sido descritas em pacientes portadores de neoplasias e em experimentações com ratos utilizando tumor de Walker-256 (CHINN; SCHUFFLER, 1988; MCCARTHY; DAUN, 1992; YAEGASHI *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 2001; KIETZER, 2002). A diminuição do trânsito intestinal em modelos portadores de tumor pode estar relacionada a alterações na musculatura lisa intestinal ou em células do SNE ou em algum componente neural extrínseco deste órgão ou ainda em todos simultaneamente (MAREGA, 2001). Todo o trato gastrointestinal é afetado pelo tumor, da boca a região anorretal, e a disfunção deste sistema contribui para a morbidade desta doença e piora a qualidade de vida de seus portadores. Dessa forma, há necessidade de melhor entendimento das alterações nesse sistema e da compreensão dos mecanismos moleculares que controlam a função; densidade e os eventos que desencadeiam a sobrevivência; proliferação e morte celular das CIC.

2. REFERÊNCIAS

Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* 2001; 306: 1-17.

Albertini SM, Ruiz MA. O papel da glutamina na terapia nutricional do transplante de medula óssea. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2001; 23: 41-47.

Alves EPB. Immunohistochemical study of vasoactive intestinal peptide (VIP) enteric neurons in diabetic rats supplemented with L-glutamine. *Nutritional Neuroscience* 2010; 13: 43-51.

Alpers DH. Glutamine: Do the data support the cause for glutamine supplementation in humans? *American Gastroenterological Association* 2006; 130:106-116.

Amores-Sánchez MI, Medina MA. Glutamine, as a Precursor of Glutathione, and Oxidative Stress. *Molecular Genetics and Metabolism* 1999; 67:100-105.

Angelo HRS, Oliveira GG. Caquexia e alterações bioquímicas em ratos com tumor de Walker 256. *Terra e Cultura*: 48 e 49 - Ano 25, 2009.

Argilés JM, Meijnsing SH, Pallares-Trujillo J. Cancer cachexia: A therapeutic approach. *Medical Research* 2001; 21:83-101.

Argilés JM, Busquets S, García-Martínez C, López-Soriano FJ. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. *Nutrition Pennsylvania* 2005; 21: 977-985.

Barreiros ALBS, David JM. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova* 2006; 29:113-123.

Bayguinov PO, Henning GW, Smith TK. Ca^{2+} imaging of activity in ICC-MY during local mucosal reflexes and the colonic migrating motor complex in the murine large intestine. *The Journal of Physiology* 2010; 588: 4453–4474.

Beckett EA, Horiguchi K, Khoyi M, Sanders KM, Ward SM. Loss of enteric motor neurotransmission in the gastric fundus of SI/SI(d) mice. *The Journal of Physiology* 2002; 543: 871–87.

Belmonte L, Coeffier M, Le Pessot F, Miralles-Barrachina O, Hiron M, Leplingard A, et al. Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in malnourished rats during inflammatory shock. *World Journal of Gastroenterology* 2007; 13: 2833-2840.

Berezin I, Huizinga JD, Daniel EE. Interstitial cells of Cajal in the canine colon: a special communication network at the inner border of the circular muscle. *Journal of Comparative Neurology* 1988; 273: 42–51.

Biolo G, De Cicco M, Dal Mas V. Response of muscle protein and glutamine kinetics to branched-chain-enriched amino acids in intensive care patients after radical cancer surgery. *Nutrition* 2006; 22:1-8.

Blair P, Rhee P-L, Sanders KM, Ward SM. The significance of Interstitial Cells in Neurogastroenterology. *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 2014; 20(3): 294-317.

Brehmer A. Structure of enteric neurons. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* 2006; 186: 1-91.

De Britto MR, Clebis NK, Gagliardo KM, Guimarães JP, De Mello GR, De Souza RR. Effects of exercise on the morphology of the myenteric neurons of the duodenum of Wistar rats during the ageing process. *Archive of Anatomy, Histology and Embryology* 2008; 37: 289-95.

Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 345:346-347.

Burns AJ. Disorders of Interstitial Cells of Cajal. *J of Ped Gastroenterology and Nutrition* 2007; 45: 103-106.

Burns AJ, Lomax AEJ, Torihashit S, Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Physiology* 1996; 93:12008-12013.

Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract. Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25:287–299.

Camborová P, Hubka P, Sulkava I, Hulin I. The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity. *Physiological Research* 2003; 52: 275–284.

Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinic Chem* 1998; 44:1309-15.

Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galletta LJ. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 2008; 322:590–594.

Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes Dietéticos: Controvérsias e Perspectivas. *Química Nova* 2007; 30: 441-449.

Chinn JS, Schuffler MD. Paraneoplastic visceral neuropathy as a cause of severe gastrointestinal motor dysfunction. *Gastroenterology* 1988; 95: 1279-1286.

Choi KM, Gibbons SJ, Roeder JL, Lurken MS, Zhu J, Wouters MM, Miller SM, Szurszewski JH, Farrugia G. Regulation of interstitial cells of Cajal in the mouse gastric body by neuronal nitric oxide. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19:585–595.

Choudry HA, Pan M, Karinch AM, Souba WW. Branched-Chain Amino Acid-Enriched Nutritional Support in Surgical and Cancer Patients. *Journal of Nutrition* 2006; 136: S314-S318.

Chwals WJ. Regulation of the cellular and physiological effects of glutamine. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2004; 4: 833-838.

Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, van Zanden J, van Bladeren PJ. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001; 10: 141-152.

Colquhoun A, Newsholme EA. Aspects of glutamine metabolism in human tumour cells. *Biochemistry and Molecular Biology International* 1997; 41: 583-596.

Consenso Brasileiro de Caquexia/Anorexia. *Revista Brasileira de Cuidados Paliativos* 2011; 3: 3-42.

Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, Corless M, Newsholme P. Molecular mechanisms of glutamine action. *Journal of Cellular Physiology* 2005; 204: 392-401.

Davis MP, Dreicer R, Walsh D, Lagman R, LeGrand SB. Appetite and cancer-associated anorexia: a review. *Journal of Clinical Oncology* 2004; 22: 1510-7.

Daniel EE, Posey-Daniel V. Neuromuscular structures in opossum esophagus: role of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 1984; 246: G305-15.

Dornelas CA, Almeida PRC, Nascimento GL, Lima ÉB, Moraes MO. Modelo experimental do carcinosarcoma 256 de Walker em bexiga de ratos. *Acta Cirurgica Brasileira* 2006; 21.

Espinosa I, Lee CH, Kim MK, Rouse BT, Subramanian S, Montgomery K, et al. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 2008; 32:210-218

Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: A new definition. *Clinical Nutrition* 2008; 27:793-99.

Eisenchlas JH. Tratamiento del síndrome de caquexia anorexia em câncer. *Acta Gastroenterologia Latinoamericana* 2006; 36: 218-226.

Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Journal Of Biochemistry* 2007; 407:113-120.

Faussone-Pellegrini MS, Cortesini C. The muscle coat of the lower esophageal sphincter in patients with achalasia and hypertensive sphincter. An electron microscopic study. *J Submicrosc Cytol* 1985; 17: 673-85.

Farré R, Wang XY, Vidal E, Domènech A, Pumarola M, Clave P, Huizinga JD, Jiménez M. Interstitial cells of Cajal and neuromuscular transmission in the rat lower esophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19:484-96.

Farrugia, G. Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterology and Motility* 2008; 20: 54–63.

Farrugia G, Lei S, Lin X. A major role for carbon monoxide as an endogenous hyperpolarizing factor in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 8567–70.

Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The Lancet Oncology* 2001; 12: 489–495.

Feldstein AE, Miller SM, El-Youssef M. Chronic intestinal pseudoobstruction associated with altered interstitial cells of cajal networks. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36: 492–7.

Fennekohl A, Schieferdecker HL, Jungermann K, Püschel GP. Differential expression of prostanoid receptors in hepatocytes, Kupffer cells, sinusoidal endothelial cells and stellate cells of rat liver. *Journal of Hepatology* 1999; 30: 38-47.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras* 1997; 43:1-16.

Ferrera L, Caputo A, Ubbby I, Bussani E, Zegarra-Moran O, Ravazzolo R, Pagani F, Galiotta LJ. Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 33360–33368.

Forster J, Damjanov I, Lin Z, Sarosiek I, Wetzel P, McCallum RW. Absence of the interstitial cells of Cajal in patients with gastroparesis and correlation with clinical findings. *J Gastrointest Surg* 2005; 9:102–8.

Fregonesi CEPT, Miranda-neto MH, Sant'Ana DMG, Molinari SL. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Arquivos Neuro-Psiquiatria* 2001; 59: 50-53.

Freitas JJS, Pompéia C, Miyasaka CK, Curi, R. Walker-256 tumor growth causes oxidative stress in rat brain. *Journal of Neurochemistry* 2001; 77:655-663.

De Freitas P, Natali MR, Pereira RV, Miranda Neto MH, Zanoni JN. Myenteric neurons and intestinal mucosa of diabetics rats after ascorbic acid supplementation. *W. J. Gastroenterol* 2008; 14(42): 6518-6524.

Frenhani PB. Terapia nutricional em estados hipermetabólicos. *Revista Nutrição em Pauta* 2003; 11: 40-46.

Friedenreich CM, Orenstein MR. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 132: 3456S-3464S.

Furlan MMDP, Molinari SL, Miranda-Neto MH. Morphoquantitative effects of acute diabetes on the myenteric neurons of the proximal colon of adult rats. *Arquivos Neuro-Psiquiatria* 2002; 60: 576-581.

Furness, JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 9(5):286-94.

Furness, JB. *The enteric nervous system*. Malden: Blackwell Publishing, p 274, 2006.

Furness JB, Costa M. The enteric nervous system: an overview. In "Functional digestive system". Raven press: New York, p 47-57, 1983.

Furness JB, Costa M. *The enteric nervous system*. New York: Churchill Livingstone, 1987.

Furness JB, Li ZS, Young HM, Forstermann U. Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. *Cell tissue research* 1994; 277:139-149.

Fürst P, Alteheld B, Stehle P. Why should a single nutrient – glutamine – improve outcome? The remarkable story of glutamine dipeptides. *Clinical Nutrition Supplements* 2004; 1:3-15.

Gabella, G. Innervation of the gastrointestinal tract. *International Review of Cytology* 1979; 59: 129–193.

Gabella, G. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. *Journal of the Autonomic Nervous System* 1990; 30: 59-66.

Gabella, G. Size of neurons and glial cells in the intramural ganglia of the hypertrophic intestine of the guinea-pig. *Journal of Neurocytology* 1984; 13:73–84.

Garcia-Lopez P, Freire M, Garcia-Marin V. Updating old ideas and recent advances regarding the Interstitial Cells of Cajal. *Brain Research* 2009; 61:154-169.

Gaté L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induce in pathologies: the role of antioxidants. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 1999; 53:169-180.

Gershon MD. The enteric nervous system: a second brain. *Hospital Practice* 1999; 34: 31–32, 35–38, 41–42.

Gfroerer F, Role U. Interstitial cells of Cajal in the normal human gut and in Hirschsprung disease. *Pediatric Surgery International* 2013; 29: 97-889.

Gibellini L, Pinti M, Nasi M, De Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, Cossarizza A. Interfering with ROS metabolism in cancer cells: the potential role of quercetin.

Cancers 2010; 2:1288-1311.

Gibbons SJ, Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2004; 556: 325–36.

Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Bardsley MR, Lorincz A, Pozo MJ, Pasricha PJ, et al. Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296:G1370–G1381

Goyal RK, Chaudhury. A mounting evidence against the role of icc in neurotransmission to smooth muscle in the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298:10-13.

Griffiths RD. The evidence for glutamine use in the critically-ill. *Proceedings of the Nutrition Society* 2001; 60:403-410.

Guimarães F, Rettori O, Vieira Matos AN, Fernandes GA. The influence of septal lesions on sodium and water retention induced by Walker 256 tumor. *Br J of medical and biological research* 1999; 32: 309-317.

Hagger R, Gharai S, Finlayson C, Kumar D. Distribution of the interstitial cells of Cajal in the human anorectum. *J Auton Nerv Syst* 1998; 73: 75–9.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press. Oxford:1-543, 1999.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142, 231-55.

Hanani M, Farrugia G, Komuro T. Intercellular coupling of interstitial cells of Cajal in the digestive tract. *International Review of Cytology* 2005; 242: 249–282.

He CL, Burgart L, Wang L. Decreased interstitial cell of cajal volume in patients with slow- transit constipation. *Gastroenterology* 2000; 118: 14–21.

Horiguchi K, Semple GS, Sanders KM, Ward SM. Distribution of pacemaker function through the tunica muscularis of the canine gastric antrum. *Journal of Physiology* 2001; 537: 237–250.

Hubner PC, Almeida WP, Fatima Â. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova* 2008; 31:1170-1179.

Huizinga JD, Zarate N and Farrugia G. Physiology, injury, and recovery of interstitial cells of Cajal: basic and clinical science. *Gastroenterology* 2009; 20:1-9.

Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995; 373: 347–9.

Hwang SJ, Blair PJA, Britton FC, O'Driscoll KE, Hennig G, Bayguinov YR, et al. Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. *J Physiol* 2009; 587:4887–4904.

Iino S, Horiguchi K, and Nojyo Y. Interstitial cells of Cajal are innervated by nitrergic nerves and express nitric oxide-sensitive guanylate cyclase in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Neuroscience* 2008; 152: 437-448.

Instituto Nacional do Câncer. O que é o câncer? Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 16 de junho de 2014.

Instituto Nacional do Câncer. Incidência de Câncer no Brasil. Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=2>>. Acesso em: 19 de outubro de 2013.

Inui A. Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome: Current Issues in Research and management. *CA Cancer Journal Clinical* 2002; 52: 72-91.

Ishikawa K, Komuro T. Characterization of the interstitial cells associated with the submuscular plexus of the guinea-pig colon. *Anatomy and embryology* 1996; 194: 49–55.

Ikeda Y, Hayashi I, Kamoshita E, Yamasaki A, Endo H, Ishihara K, Yamashina S, Tsutsumi Y, Matsubara H, Majira M. Host stromal bradkinin B2 receptor signaling facilitates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Cancer Research* 2004; 64:178-185.

Iwasaki H, Kajimura M, Osawa S, Kanaoka S, Furuta T, Ikuma M, Hishida A. A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 2006; 41:1076–1087.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik, A. *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. Porto Alegre: Artmed, p 767, 2002.

Khelif K, De Laet MH, Chaouachi B, Segers V, Vanderwinden JM. Achalasia of the cardia in Allgrove's (triple A) syndrome: histopathologic study of 10 cases. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 667–72.

Kietzer KS. Avaliação morfoquantitativa do plexo mientérico do intestino grosso de ratos com tumor de Walker – 256 [Dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002.

Komuro T. Morphological features of interstitial cells of Cajal. In: *Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): from pathology to molecular target therapy*, Gann Monograph on Cancer Research. Japan Scientific 2004; 53: 109–134.

Komuro T. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Journal of Physiology* 2006; 576: 653–658.

Korekane H, Nishikawa A, Imamura K. Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003; 412: 216-222.

Kowata CH, Benedetti GV, Travaglia T, Araújo EJA. Fisiopatologia da caquexia no câncer: uma revisão. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR* 2009; 13: 267-272.

Kraichely RE, Farrugia G. Achalasia: physiology and etiopathogenesis. *Dis Esophagus* 2006; 19: 213–23.

Krzywkowski K, Petersen EW, Ostrowski K, Kristensen JH, Boza J, Pedersen BK. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced change in lymphocytes function. *American Journal of Physiology Cell* 2001; 281:1259-1265.

Kunisawa Y, Komuro T. Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastric antrum. Distribution and Ultrastructure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 2004; 945–946.

Lazo PA. Tumour-host metabolic interaction and cachexia. *FEBS Letters* 1985; 187: 189-192.

Lee HR, Lennon VA, Camilleri M, Prather CM. Paraneoplastic gastrointestinal motor dysfunction: clinical and laboratory characteristics. *Amer J of Gastroenterology* 2001; 96: 373-379.

Lev N, Melamed E, Offen D. Apoptosis and Parkinson's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2003; 27:245-250.

De Lima C. Efeito da suplementação com glutamina associada ao treinamento de salto sobre o crescimento tumoral, caquexia e proliferação de linfócitos T em ratos portadores de Tumor de Walker 256 - Identificação de mediadores participantes neste processo [Dissertação] Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2008.

Lino S, Horiguchi, K. Interstitial Cells of Cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Acta Histochem Cytochem* 2006; 39:145-153.

Loberg RD, Bradley DA, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Pienta KJ. The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2007; 57: 225-241.

Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K and Nishikawa Shin-Ichi. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker

system. The Company of Biologists Limited 1992; 116:369-375.

Maifrino LB, Liberti EA, Watanabe I, De Souza RR. Morphometry and acetylcholinesterase activity of the myenteric neurons of the mouse colon in the chronic phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999; 60:721-5.

Mantovani G, Madeddu C, Maccio A, Gramignano G, Lusso MR, Maasa E, Astará G, Serpe R. Cancer-Related Anorexia/Cachexia Syndrome and Oxidative Stress: An Innovative Approach beyond Current Treatment. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2004; 13.

Mao-Ying QL, Zhao J, Dong ZK, Wang J, Yu J, Yan MF, Zhang YQ, Wu GC, Wang YQ. A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of Walker 256 mammary gland carcinoma cells. *Biochemistry Biophysics Research Commun* 2006; 354:1292-1298.

Marega P. Características estruturais do plexo mioentérico do intestino delgado de ratos portadores do tumor de Walker-256: Uma análise morfoquantitativa [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001.

Mawei G. Interstitial cells of Cajal in the gut: what makes them tick? *J of Physiology* 2009; 587: 47-65.

Mazzone A, Farrugia G. Evolving concepts in the cellular control of gastrointestinal motility: Neurogastroenterology and enteric sciences. *Gastroenterol Clin Am* 2007; 36:499-513.

McCarthy DO, Daun JM. The role of gastric stasis in tumor-induced anorexia in rats. *Cancer* 1992; 70:1601-4

Meister A, Anderson M. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:11–760.

Mena S, Ortega A, Estrela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research* 2009; 674:36–44.

Michelone APC, Santos VLCG. Qualidade de vida de adultos com câncer colorretal com e sem ostomia. *Revista Latino-Americana de Enfermagem* 2004; 12: 875-83.

Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009.

Mitsui R, Komuro T. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of wild-type and Ws/Ws rats. *Anatomy and embryology* 2003; 206: 453–460.

Moraes SP, Cunha A, Reis-Neto JA, Barbosa H, Roncolato CAP, Duarte RF. Modelo Experimental de tumor de Walker. *Acta Cirurgica Brasileira* 2000; 15.

Morley JE. Pathophysiology of anorexia. *Clinics in Geriatric Medicine* 2002; 18:661-73.

Mund RC. Suplementação crônica com óleo de peixe reduz a taxa de crescimento do Tumor de Walker 256 – identificação dos mediadores participantes desse processo [Dissertação] Paraná, Universidade Federal do Paraná, 2004.

Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J, Aversa Z, Bauer JM, Biolo G, et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) “cachexia-anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics”. *Clinical Nutrition* 2010; 29: 154-9.

Nezami BG, Srinivasan S. Enteric nervous system in the small intestine: pathophysiology and clinical implications. *Current Gastroenterology Reports* 2010; 12:358-365.

Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances part 2. *Pediatr Dev Pathol* 2002; 5:329-49.

Nunes A. Avaliação Nutricional de Pacientes com câncer em tratamento quimioterápico. *Biological & Health Journal* 2008; 2:56.

Obrosova IG, Van Huysen C, Fathallah L, Xianghui C, Greene DA, Stevens MJ. Aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *Faseb J* 2002; 16:123-125.

Oliveira GP, Dias CM, Pelosi P, Rocco PR. Understanding the mechanisms of glutamine action in critically ill patients. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2010; 82: 417-430.

Oliveira PFM, Henrique IA, Rodrigues-Filho F, Almeida PRC, Moraes MO. Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de walker em estômago de rato. *Acta Cirúrgica Brasileira* 1998; 13:243-248.

Pasternak JJ. *Genética Molecular Humana. Mecanismos de Doenças hereditárias.* Manole 2002; 1:365-412.

Patterson LM, Zheng H, Ward SM, Berthoud HR. Immunohistochemical identification of cholecystokinin A receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle, and enteric neurons in rat pylorus. *Cell Tissue Res* 2001; 305:11-23.

Paz RC, Fortes RC, Toscano BAF. Processo de envelhecimento e câncer: métodos subjetivos de avaliação do estado nutricional em idosos oncológicos. *Comunicação em Ciências da Saúde* 2011; 22: 149.

Pereira ALB. Efeitos do celecoxibe em ratos submetidos ao modelo de câncer Walker-256 [Dissertação]. Paraná: Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

Pereira RV, Tronchini EA, Tashima CM, Alves EP, Lima MM, Zanoni JN. L-glutamine supplementation prevent myenteric neuron loss and has gliatrophic effects in the ileum of diabetic rats. *Digestive Diseases and Sciences* 2011; 56: 3507-68.

Pereira SRC, Darronqui E, Constantin J, Da Silva MH, Yamamoto NS, Bracht A. The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1688: 187-196.

Piotrowska AP, Solari V, Puri P. Distribution of interstitial cells of Cajal in the internal anal sphincter of patients with internal anal sphincter achalasia and Hirschsprung disease. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127: 1192-5.

Ramos EJB, Suzuki S, Marcas D, Inui A, Asakawa A, Mequid MM. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. *C Opin in Clin Nutrit and Metabolic Care* 2004; 7: 427-34.

Rintala RJ. Fecal incontinence in anorectal malformations, neuropathy, and miscellaneous conditions. *Seminars in Pediatric Surgery* 2006; 11: 75-82.

Roth E, Oehler R, Manhart N, Exner R, Wessner B, Strasser E, Spittler A. Regulative potential of glutamine-relation to glutathione metabolism. *Nutrition* 2002; 18: 217-221.

Rouse K, Nwokede E, Woodliff JE, Epsteins J, Klimberg VS. Glutamine enhances selectivity of chemotherapy through changes in glutathione metabolism. *Annals of Surgery* 1995; 221:420-426.

Rubin H. Cancer caquexia: its correlations and causes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100: 5384-5389.

Rumessen JJ. Ultrastructure of interstitial cells of Cajal at the colonic submuscular border in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1996; 111:1447-55.

Sacks GS. Glutamine supplementation in catabolic patients. *Ann Pharmacol* 1999; 33:348-354.

Salomão EM, Gomes-Marcondes MCC. Light aerobic physical exercise in combination with leucine and/or glutamine-rich diet can improve the body composition and muscle protein metabolism in young tumor-bearing rats. *J Physiol Biochem* 2012; 68: 493-501.

Sanders KM. A Case for Interstitial Cells of Cajal as Pacemakers and Mediators of Neurotransmission in the Gastrointestinal Tract. *Gastroenterological* 1996; 111: 492-515.

Sanders KM, Ordög T, Koh SD, Torihashi S, Ward SM. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* 1999; 11:11-38.

Sanders KM. Postjunctional electrical mechanisms of enteric neurotransmission. *Gut* 2000; 47:23-5.

Sanders KM, Ördög T, Koh SD, Ward SM. A novel pacemaker mechanism drives gastrointestinal rhythmicity. *News Physiol Sci* 2000; 15:291-298.

Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of cajal: a new perspective on smooth muscle function. *J Physiol* 2006; 576:721-6.

Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* 2006; 68:307–43.

Sanders KM, Zhu MH, Ward SM. Anoctamins and gastrointestinal smooth muscle excitability. *Exp Physiol* 2012; 97: 200–206.

Sanders KM, Ward SM, Koh, SD. Interstitial Cells: Regulators of Smooth Muscle Function. *Physiological Reviews* 2014; 94(3):859-907.

Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 2008; 134:1019–1029.

Seki K, Komuro T. Distribution of interstitial cells of Cajal and gap junction protein, Cx 43 in the stomach of wild-type and W/Wv mutant mice. *Anatomy and embryology* 2002; 206:57–65.

Sha L, Farrugia G, Harmsen WS, Szurszewski JH. Membrane potential gradient is carbon monoxide-dependent in mouse and human small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G438–45.

Silva LFG, Soares FSD, Anselmo JNN, Fé DMM, Cavalcante JLBG, Moraes MO, de Vasconcelos PRL. Modelo de tumor experimental em rim de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2002; 17.

Silva MPN. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2006; 52: 59-77.

Silva AC, Alves RC, Pinheiro LS. The implications of cachexia in cancer. *E-Scientia* 2011; 5: 49-56.

Stanich JE, Gibbons SJ, Eisenman ST, Bardsley MR, Rock JR, Harfe BD, Ördög T, Farrugia G. *Ano1* as a regulator of proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 301:G1044–G1051.

Strege PR, Bernard CE, Ou Y, Gibbons SJ, Farrugia G. Effect of mibefradil on sodium and calcium currents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G249–53.

Takaki M. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of cajal (ICC). *Journal Smooth Muscle Research* 2003; 39:137-61.

Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: Intestinal pacemaker cells? *Advances in Anatomy. Embryology and Cell Biology* 1982; 71: 1–130.

Tisdale MJ. Pathogenesis of cancer cachexia. *The J of supportive oncology* 2003; 1: 159-68.

Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 862-871.

Tisdale MJ. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. *Nutrition* 2000; 16: 1013-1014.

Townsend DM, Tew KD, Tapieiro H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine Pharmacotherapy* 2003; 57: 145-55.

Tsao AS, Kim ES, Hong WK. Chemoprevention of cancer. *CA - A cancer journal for clinicians* 2004; 54:150-180.

Urcini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta* 1985; 839:62-70.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International J of Bioche & Cell Biology* 2007; 39:44-84.

Vanderwinden JM, Rumessen JJ, Liu H, Descamps D, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ. Interstitial cells of Cajal in human colon and in Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 1996; 111: 901-10.

Vanderwinden J, Rumessen JJ, Bernex F, Schiffmann SN, Phantier JJ. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the mouse colon, using antibodies to Kit and Kit (W-lacZ) mice. *Cell Tissue Research* 2000; 302: 155-170.

Vicentino C, Constantin J, Bracht A, Yamamoto NS. Long-chain fatty acid uptake and oxidation in the perfused liver of Walker-256 tumour-bearing rats. *Liver* 2002; 22:342-350.

Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews Ann Arbor* 2004; 25(4): 612-628.

Violato, N.M. Avaliação do estado inflamatório em ilhotas de Langerhans de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu; 2013.

Watford M, Chellaraj V, Ismat A, Brown P, Raman P. Hepatic glutamine metabolism. *Nutrition* 2002, 28:301-303.

Wang XY, Paterson C, Huizinga JD. Cholinergic and nitrergic innervation of ICC-DMP and ICC-IM in the human small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 15:531-43.

Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM. Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* 1994; 480:91-7.

Ward SM, Morris G, Reese L, Wang XY, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterol* 1998a, 115:314-29.

Ward SM, Morris G, Reese I. Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterol* 1998b; 115:1-17.

Ward SM. Interstitial cells of cajal in enteric neurotransmission. *Gut* (SUPPL IV) 2000; 47: IV40–IV43

Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoji M, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci* 2000; 20: 1393–403.

Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *The Anatomical Record* 2001; 262: 125–135.

Ward SM, McLaren GJ, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine. *The Journal of Physiology* 2006; 573: 147-159.

Wedel T, Spiegler J, Soeller S, Roblick UJ, Schiedeck THK, Bruch HP, Krammer HJ. Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow transit constipation and megacolon. *Gastroenterology* 2002; 123: 1459-67.

West RB, Corlles CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am Jour of Pathology* 2004; 165: 107–113.

Won KJ, Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 14913–8.

Yaegashi N, Tsuiki A, Shimizu T, Kobayashi N, Sato S, Namiki T, et al. Ovarian carcinoid with severe constipation due to peptide YY production. *Gynecol Oncology* 1995; 56: 302–6.

Yamataka A, Ohshiro K, Kobayashi H. Abnormal distribution of intestinal pacemaker (C-KIT-positive) cells in an infant with chronic idiopathic intestinal pseudoobstruction. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 859–62.

Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 2008; 455: 1210–1215.

Yano CL, Ventrucchi G, Field WN, Tisdale MJ, Gomes-Marcondes MC. Metabolic and morphological alterations induced by proteolysis-inducing factor from Walker tumour-bearing rats in C2C12 myotubes. *BMC Cancer* 2008; 24(8).

Yoshida S, Kaibara A, Ishibashi N, Shirouzu K. Glutamine Supplementation in Cancer Patients. *Nutrition* 2001; 17: 766-768.

Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. Dietary Glutathione Protects Rats from Diabetic Nephropathy and Neuropathy. *Bioch and Mol Actions of Nutri Research Commun Nagoya* 2002; 132:897-900.

Zanoni JN, Miranda-Neto MH, Bazotte RB, de Souza RR. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arq de Neuro-Psiquiatria* 1997; 55: 696-702.

Zarate N, Mearin F, Wang XY, Hewlett B, Huizinga JD, Malagelada JR. Severe idiopathic gastroparesis due to neuronal and interstitial cells of Cajal degeneration: pathological findings and management. *Gut* 2003; 52: 966–70.

Zhu MH, Kim TW, Ro S, Yan W, Ward SM, Koh SD and Sanders KM. A Ca^{2+} -activated Cl^- conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity. *J Physiol* 2009; 587:4905–4918.

Ziegler DM. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem* 1985; 54: 305–329.

**A L-GLUTAMINA E O ÓXIDO NÍTRICO PROMOVEM A PLASTICIDADE DAS
CÉLULAS INTERSTICIAIS DE CAJAL EM RATOS PORTADORES DE TUMOR DE
WALKER-256**

**(EFEITO DA L-GLUTAMINA NO JEJUNO DE RATOS PORTADORES DE TUMOR
DE WALKER-256)**

L Fracaro*, F C. V. Frez*, B C. Silva*, G E. Vicentini*, S R. G. de Souza*, H A. Martins*, J N. Zanoni*

*-Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, n 5790 Bloco O-33, Maringá, PR CEP 87020-900, Brasil.

Autor para correspondência: Jacqueline Nelisis Zanoni, número de telefone: (+55) 443011-5944, e-mail: jzanoni@uem.br - Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, n 5790 Bloco O-33, Maringá, PR CEP 87020-900, Brasil.

Resumo

Antecedentes/Objetivos

Avaliar os efeitos da suplementação com L-glutamina 2% na caquexia e nas desordens da motilidade intestinal do jejuno, e a relação da enzima óxido nítrico sintase neuronal imunorreativa (nNOS-IR) com as células intersticiais de Cajal (CIC) em ratos portadores de Tumor de Walker-256.

Métodos

Trinta e dois ratos Wistar machos foram distribuídos em quatro grupos: controle (C), controle suplementados com L-glutamina (CG), portadores de Tumor de Walker-256 (TW), portadores de Tumor de Walker-256 suplementados com L-glutamina (TWG). Após 14 dias, os jejunos foram coletados e processados para técnicas imunohistoquímicas de preparado total e criocortes, e para análise do Western Blot. Análises quantitativas foram realizadas para Ano1 e nNOS.

Resultados

A redução da densidade das CIC e o aumento da expressão da proteína Ano1 foi observada no grupo TW em comparação ao C ($p < 0,05$). A maior produção de óxido nítrico (NO) estimulou a proliferação e manutenção das projeções celulares das CIC. A caquexia foi menor no grupo TWG em comparação com o TW ($p < 0,05$). A suplementação com L-glutamina no grupo TWG promoveu elevada plasticidade das CIC.

Conclusões

A suplementação com L-glutamina parece estar envolvida na regulação dos canais de Ca^{+2} e Cl^{-} . A expressão aumentada de NO juntamente com o tratamento antioxidante, parecem contribuir para a proteção e reparação das CIC no modelo de tumor de Walker 256.

Palavras-chave: antioxidantes, síntese protéica, sistema nervoso entérico, câncer.

Introdução

As células intersticiais de Cajal (CIC) foram descobertas e descritas pelo pesquisador espanhol Santiago Ramón y Cajal em 1911. Apresentam funções estabelecidas de geração e propagação do sinal de condução eletroquímica;¹⁰⁻⁵⁰ regulação dos potenciais de ação e do gradiente de potencial eletroquímico na membrana celular do músculo liso;²²⁻²⁶⁻⁵² sinalização da transmissão neural entérica,³⁸⁻⁴⁰⁻⁶⁴ e, parecem estar envolvidas na mecanotransdução.⁵³⁻⁶¹

As CIC são uma classe de células heterogêneas e especializadas, classificadas em vários subtipos conforme sua localização nas camadas de tecido do trato gastrointestinal (TGI) e suas características morfofuncionais.²⁴⁻³⁰ Na camada muscular longitudinal externa, acopladas ao plexo mientérico (MY), as CIC-MY caracterizam-se por possuir citoplasma multipolar e redes densas que se interconectam tridimensionalmente no plexo mientérico,⁷⁻³⁷ com função específica de gerar ondas lentas na musculatura, se comportando como células marca-passo no intestino delgado.³²⁻⁴⁰ Na camada muscular circular interna, próximas ao plexo muscular profundo (DMP), as CIC-DMP se apresentam como células multipolares com processos finos, capazes de interagir com as células musculares lisas e neurônios com funções inibitórias no trato gastrointestinal (TGI). Participam da neurotransmissão,^{5-58,59} e são em menor número quando comparadas com as CIC-MY.⁷⁻³⁷

A proteína anoctamin 1, Ano1 (*Tmem16A*) é um canal de cloro ativado por cálcio e apresenta expressão específica e elevada nas CIC.²⁰⁻⁶⁰ Alterna a despolarização e repolarização na condução do impulso de ondas lentas,²³⁻²⁷⁻³³ representando papel importante para o estudo das contrações rítmicas do músculo

liso intestinal.⁴⁻¹¹⁻⁵¹⁻⁶²⁻⁶⁵ A perda ou defeitos nas CIC, podem contribuir para distúrbios da motilidade, e as disfunções estão relacionadas aos processos inflamatórios, estresse oxidativo e apoptose.¹⁷⁻²⁵⁻³⁴

Doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer, são capazes de alterar a homeostase metabólica, e o quadro característico de desequilíbrio com o crescimento do tumor leva a uma síndrome denominada caquexia.⁵⁷ Os tumores aumentam a quantidade de substâncias pró-oxidantes e diminuem as atividades das enzimas antioxidantes em tecidos extra-tumorais, promovendo o aumento do estresse oxidativo e reduzindo a capacidade de resposta celular a esse processo.⁴²⁻⁴⁴⁻⁵⁶ Neste sentido, a suplementação com o uso de antioxidantes tem se mostrado eficiente para prevenir ou amenizar esses efeitos.

A L-glutamina é precursora da glutathione (GSH) que é um importante antioxidante endógeno. Em situações de estresse metabólico e de catabolismo intenso, a suplementação com L-glutamina resulta na melhora do quadro clínico pelo aumento da síntese protéica.¹⁻⁶⁻¹⁹ Os efeitos benéficos se resumem em potencializar as defesas antioxidantes; atenuar o processo inflamatório; preservar a função imune e atuar como precursora de nucleotídeos e glicose.²⁻⁴⁸

Apesar da relevância do assunto, ainda faltam informações acerca do papel da L-glutamina na proteção das CIC na condição do tumor induzido e o papel da neurotransmissão inibitória nessas células. Assim, o presente estudo apresenta como objetivo investigar o efeito da suplementação com L-glutamina a 2% sobre as CIC-MY e CIC-DMP e a relação da neurotransmissão inibitória dos neurônios nNOS gástricos e submucosos, na porção jejunal de ratos portadores de Tumor de Walker-256.

Materias e Métodos

Todos os procedimentos descritos no presente trabalho estão de acordo com os princípios éticos adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM) pelo parecer 099/2012.

Delineamento experimental

Foram utilizados trinta e dois ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 57 dias de idade, pesando $199,42 \pm 11,65$ g obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n = 8 por grupo): controle (C), controle suplementado com L-glutamina a 2% (CG), Tumor de Walker-256 (TW), Tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina a 2% (TWG). Os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 33 x 17 cm) por um período de 14 dias com um ciclo claro/escuro de 12/12/h e temperatura controlada ($24/\pm/2$ °C). Alimento e água estavam disponíveis *ad libitum*.

Nos grupos TW e TWG foram inoculadas, via subcutânea no flanco direito traseiro, uma suspensão contendo $8,0 \times 10^7$ células tumorais (Walker-256) viáveis, em 0,5 mL em tampão fosfato salino (PBS) 16,5 mM, pH 7,5 por animal. As células tumorais Walker 256 são mantidas no Laboratório de Fisiopatologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Nos grupos controles (C e CG) foram inoculados 0,5 mL de PBS 16,5 mM, pH 7,5 no mesmo local.²⁰⁻²⁹

A suplementação foi iniciada no mesmo dia após a indução do tumor. Os animais não suplementados (grupos C e TW) receberam ração padrão balanceada

Nuvital (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Para a suplementação experimental dos ratos pertencentes aos grupos CG e TWG, a L-glutamina (Deg, São Paulo, SP, Brasil) foi incorporada a ração padrão na proporção de 2 g/100 g de ração. A ração foi moída e acrescentada a L-glutamina, em seguida reconfecionada em pellets e posteriormente secos em estufas.² O consumo de ração foi avaliado a cada dois dias (g/dia).

Coleta e processamento do material

Ao final do período experimental de 14 dias, os animais foram pesados e receberam injeção endovenosa de sulfato de vincristina (0,5 mg/kg de peso corporal; Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) 2h antes da eutanásia. Após este período foram anestesiados pela via intraperitoneal com tiopental (40 mg/kg de peso corporal; Laboratórios Abbott, Chicago, IL, EUA) e mortos sob aproveitamento de anestésico.

Os animais passaram pelo procedimento de retirada da massa tumoral, a qual foi pesada para o cálculo da porcentagem (%) de perda de massa corpórea (índice de caquexia), de acordo com a equação:

$$\% \text{ Perda de massa corpórea} = \frac{[mie - mfe + (mt) + gmc]}{(mie + gmc)} \times 100$$

Onde: mie= massa corpórea inicial do animal com tumor; mfe= massa corpórea final do animal com tumor; mt= massa do tumor; gmc= ganho de massa do grupo controle.

Os jejunos foram coletados e lavados em tampão fosfato salina (PBS, 0,1 M, pH 7,4). Para identificação da dupla marcação da proteína Ano1 e enzima nNOS os

jejunos foram preenchidos com fixador acetona P.A 15 minutos a 4°C. Após a fixação, os jejunos foram cortados ao longo da borda mesentérica e lavados em PBS por 30 minutos. Os mesmos foram então armazenados a 4°C em PBS com a adição de azida sódica 0,08%. Para a identificação dos neurônios nNOS, os jejunos foram preenchidos com fixador Zamboni, em seguida, foram mantidos por 18 h na mesma solução a 4°C. Após a fixação, os jejunos foram cortados ao longo da borda mesentérica e lavados em álcool 80% até a remoção visível do fixador. A desidratação em séries crescentes de álcool (95 e 100%), a diafanização em xilol e a reidratação em séries decrescentes de álcool (100, 90, 80, e 50%) foram realizadas. Os mesmos foram então armazenados a 4°C em PBS com a adição de azida sódica 0,08%.

Posteriormente, os segmentos de jejuno foram dissecados sob estereomicroscópio Stemi DV4 (Zeiss, Jena, Alemanha) para obtenção de preparados totais para avaliar as CIC-MY e neurônios nNOS imunorreativos (nNOS-IR) mientéricos; e CIC-DMP e neurônios nNOS-IR submucosos.

Procedimentos de imunofluorescência

Os preparados totais foram lavados duas vezes em solução de PBS contendo Triton X-100 0,3% (Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 10 min. Após foram incubados por 2hrs em solução de bloqueio contendo PBS + Triton X-100 0,3% + albumina soro bovino 2% (BSA; Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Imunohistoquímica para dupla marcação da proteína Ano1 e da enzima nNOS

Para a dupla marcação da proteína Ano1 e da enzima nNOS, os preparados totais foram incubados em solução contendo ambos os anticorpos primários: anti-Ano1 (produzido em coelho; 1:200; ABCAM® discover more, EUA) e anti-nNOS (produzido em camundongo; 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), respectivamente. Após 48h de incubação a 4 °C, os jejunos foram lavados duas vezes em solução de PBS contendo Triton X-100 0,3% por 10 min e incubados por 2h em temperatura ambiente com os seguintes anticorpos secundários: Alexa Fluor 488 IgG anti-coelho produzido em cabra (1:200; Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA), e Alexa Fluor 568 IgG anti-camundongo produzido em burro (1:500; Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). Os preparados totais foram lavados duas vezes em solução de PBS, montados em lâminas com glicerol tamponado (9:1) e armazenados a 4°C. Para o controle negativo, o anticorpo primário foi omitido.

Análise da intensidade de brilho emitido nas imunomarcações para CIC nos preparados totais

A quantificação do brilho emitido nas imunomarcações para CIC foram realizadas por meio de imagens obtidas por amostragem, utilizando 30 imagens de cada animal do segmento jejuno nos preparados totais das CIC-MY e CIC-DMP em aumento de 40X. As imagens foram capturadas por câmera de alta resolução Moticam® 2500 5.0 Mega Pixel (Motic China Group Co., Shanghai, China) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência Olympus® BX40 (Olympus Co., Japão), transferidas para microcomputador pelo software Motic Images Plus® 2.0ML (Motic China Group Co., Shanghai, China) e gravadas.

O software de análise de imagens ImageJ® versão 1.43o (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, EUA) foi utilizado para a quantificação da intensidade de brilho emitido nas imunomarcações para Ano1 nas imagens gravadas para determinação da intensidade de brilho em RGB (Red-Green-Blue). As análises foram avaliadas de forma cega. Todas as imagens foram recodificadas antes da avaliação e as análises foram realizadas por um único pesquisador.

Modelagem em superfície 3D representativas da intensidade de imunopressão da proteína Ano1

O plugin *Interactive 3D surface plot v2.33* no programa ImageJ® versão 1.43o (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, EUA) foi usado para visualizar 30 imagens do segmento jejuno nos preparados totais para CIC-MY e CIC-DMP em aumento de 40X. A altura de pico e cor são representativos da intensidade de imunopressão da proteína Ano1. Foram utilizados os mesmos parâmetros de tamanho da grade, superfície, perspectiva e iluminação para todas as montagens 3D analisadas.¹⁵

Ocupação do espaço pelas redes celulares das CIC-MY e CIC-DMP e neurônios mientéricos e submucosos nNOS-IR nos preparados totais

Análise semi-quantitativa da proporção da área imunomarcada para CIC e a enzima nNOS realizada por meio de imagens obtidas por amostragem, utilizando 30 imagens dos preparados totais do jejuno, em aumento de 40X. As imagens foram capturadas por câmera de alta resolução Moticam® 2500 5.0 Mega Pixel (Motic

China Group Co., Shanghai, China) acoplada ao microscópio óptico de fluorescência Olympus® BX40 (Olympus Co., Japão), transferidas para microcomputador pelo software Motic Images Plus® 2.0ML (Motic China Group Co., Shanghai, China) e gravadas.

O software de análise de imagens ImageJ® versão 1.43o (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, EUA) foi utilizado na abordagem semi-quantitativa para estimar as variações ocorridas na densidade espacial das imunomarcações para Ano1 e nNOS nas imagens gravadas, as imagens foram convertidas para 16 bits e submetidas a função de binarização para remover a intensidade do fundo.¹⁵ As análises foram avaliadas de forma cega. Todas as imagens foram recodificadas antes da avaliação e as análises foram realizadas por um único pesquisador.

Reações imunohistoquímicas em cortes histológicos obtidos por criostato

Amostras de jejuno foram esticadas com a mucosa para cima sob cortiça com auxílio de espinhos e foram feitas lavagens repetidas com o tampão fosfato salino 0,1M pH 7,4 (PBS). Imediatamente após a lavagem, os tecidos foram mantidos em acetona P.A 15 minutos a 4°C. A seguir foram lavados em PBS por 30 minutos e estocados em solução de sacarose 18% em PBS 0,1M, por um período de 24 horas para crioproteção. Os tecidos foram cortados e envolvidos em meio de embebição (O.C.T. 4583 compound – Tissue-Tek). Após congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer de -80°C.

Posteriormente, foram feitos cortes transversais semi-seriados de 10µm em criostato (Leica Biosystems CM1860, Heidelberg, Alemanha), que foram dispostos em lâminas e armazenadas a -1° C. Dessa forma, os tecidos preparados foram

inicialmente bloqueados em solução de Triton 0,3% e BSA (BSA; Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 1% por duas horas em temperatura ambiente (T.A). Após o bloqueio, os tecidos foram incubados em solução contendo o anticorpo primário anti-Ano1 (produzido em coelho; 1:200; ABCAM® discover more, EUA), por 48 horas a 4° C em câmara úmida. O anticorpo primário foi diluído em PBS e BSA 1%. Em seguida os tecidos foram lavados por duas vezes em PBS e incubados com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 IgG anti-coelho produzido em cabra (1:200; Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA), diluído em PBS e BSA a 1%, por duas horas em temperatura ambiente. A seguir foram feitas três lavagens sucessivas em PBS, e montados em lâminas com Prolong Gold antifade com DAPI (Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) e armazenados na geladeira. O controle negativo foi realizado com a omissão do anticorpo primário.

Quantificação das CIC imunoreativas a proteína Ano1 em cortes histológicos

As imagens foram capturadas por câmera de alta resolução AxioCam (Zeiss, Jena, Alemanha) acoplada a um microscópio de luz Axioskop Plus (Zeiss, Jena, Alemanha), digitalizadas em um computador usando AxioVision versão 4.1. e gravadas em CD. 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. Para cada animal foram quantificadas todas as CIC presentes em um total de 30 imagens, capturadas em objetiva de 40X. Em cada corte foram obtidas 6 imagens e o total de 5 cortes foram utilizados. As análises foram avaliadas de forma

cega. Todas as imagens foram recodificadas antes da avaliação e as análises foram realizadas por um único pesquisador.

Análise quantitativa para Ano1 e nNOS por Western Blot

As amostras do jejuno foram lavadas, repetidas vezes, com solução tampão de Krebs-Ringer pH 7,4. O tecido foi lisado pela imersão em tampão de homogeneização contendo inibidor de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (Tris HCl 50 mM pH 7,2, NaCl 600 mM, EDTA 1 mM), e posteriormente centrifugado por 10 minutos, 4000 rpm. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80 °C até a sua utilização. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford⁸ (BioRad, Hercules, CA, EUA).

A técnica de Western Blot foi conduzida seguindo procedimentos padrões da Bio-Rad Mini Protean System. As alíquotas obtidas correspondente a 40 µg de proteína total foram separadas usando gel de poliacrilamida SDS Page 12% para Ano1 e nNOS, e foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Depois de verificar a eficiência da transferência por coloração com Ponceau S, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado em tampão TBS (Tris base 2,24 g/L e NaCl 8 g/L; pH 7,6) contendo 0,1% de Tween-20 por 1h em temperatura ambiente.

As membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-Ano1 (produzido em coelho; 1:500; ABCAM® discover more, EUA), anti-nNOS (produzido em coelho; 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) overnight a 4°C, depois foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-coelho (produzido em cabra; 1:2000; Pierce, Rockford, IL, EUA) por 2h. A

imunodeteccão foi realizada por meio do método de quimioluminescência com gerador de imagens ChemiDoc MP de acordo com as instruções do fabricante (V3 Western Workflow™, Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). O imunoblot foi analisado por meio de imagens obtidas do software Image Lab™ (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos).

Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando os programas Statistica 7.1 e GraphPad Prism 5.1 e foram expressos como média \pm erro padrão. Foi utilizada análise de variância one-way (ANOVA) seguida de teste de Tukey e teste T não paramétrico. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

Parâmetros fisiológicos

Não houve diferenças significativas no peso final quando comparados os grupos C e CG ($p > 0,05$). O peso final dos grupos TW e TWG foram menores em 16,5% e 11,0%, respectivamente quando comparados a C ($p < 0,05$; Tabela 1). A ingestão de alimentos dos quatro grupos durante os 14 dias de tratamento foram similares ($p > 0,05$; Tabela 1).

Ocorreu o desenvolvimento de massa tumoral no flanco direito dos animais portadores de tumor (TW e TWG) (Tabela 1). A caquexia foi evidenciada pela % de

perda de massa corpórea, no grupo TW foi verificada uma redução de $19,33 \pm 3,20\%$ e no grupo TWG uma proporção de $9,67 \pm 2,87\%$, sendo significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Análise da intensidade de brilho (RGB) e modelagem em superfície 3D para CIC-MY e CIC-DMP do jejuno imunomarcadas com Ano1

Quando comparada a intensidade de brilho (RGB) para CIC-MY não foram evidenciadas alterações entre os grupos C e CG ($p > 0,05$), por outro lado nas CIC-DMP foi verificado um acréscimo de 14% no grupo CG ($p < 0,0005$; Figura 1). O Tumor de Walker-256 (TW) promoveu um aumento na intensidade de brilho nas CIC-MY e CIC-DMP ($p < 0,05$). A suplementação com L-glutamina (TWG) aumentou a intensidade de brilho na CIC-MY ($p < 0,000008$; Figura 1). Os mesmos resultados foram observados na modelagem em superfície 3D, demonstrados na Figura 2.

Densidade das CIC-MY e CIC-DMP

O número das CIC-MY diminuiu 38% e 36% nos animais TW e TWG em relação ao C, respectivamente ($p < 0,05$; Figura 3). Para as CIC-DMP a densidade reduziu no grupo TW em 18% comparado com o C ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa na densidade com a suplementação com L-glutamina (TWG) em relação ao grupo C ($p > 0,05$; Figura 3).

Ocupação do espaço pelas redes celulares das CIC (Ano1-IR) e neurônios nNOS-IR

Para a ocupação do espaço das CIC-MY foi verificado um acréscimo de 9% entre os grupos C e CG ($p < 0,0004$), porém nas CIC-DMP não foi evidenciada alterações ($p > 0,05$; Figura 4). O Tumor de Walker-256 (TW) promoveu um aumento no espaço ocupado nas CIC-MY e CIC-DMP ($p < 0,05$). A suplementação com L-glutamina (TWG) aumentou a ocupação do espaço na CIC-MY em comparação ao C ($p < 0,000008$; Figura 4).

Os neurônios mientéricos nNOS-IR tiveram a ocupação do espaço reduzida no grupo TWG (11%) em comparação ao C ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças entre os grupos C e CG ($p > 0,05$; Figura 5), ao contrário dos neurônios submucosos, em que o CG aumentou 8% em relação ao C ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças entre os grupos C, TW e TWG ($p > 0,05$; Figura 5).

A dupla marcação para Ano1/nNOS está demonstrado na Figuras 6 e 7. Um íntimo contato foi observado entre as fibras nNOS-IR e as redes das CIC-DMP (Figura 7), ao contrário com o verificado com as CIC-MY.

Western Blot

A β -actina, Ano1 e nNOS migraram com uma banda de peso molecular de aproximadamente 42 kDa, 114 kDa e 160 kDa, respectivamente (Figura 8). O aumento da expressão da proteína Ano1 foi de 80% e 53%, nos grupos TW e TWG, respectivamente em relação ao C ($p < 0,05$; Figura 8A). Para a enzima nNOS houve um aumento da expressão em 54% e 48% nos grupos TW e TWG, respectivamente

em relação ao C ($p < 0,05$; Figura 8B). Não foram encontradas diferenças entre os grupos C e CG ($p > 0,05$; Figura 8).

Discussão

O modelo experimental de Tumor de Walker-256 utilizado neste estudo, foi estabelecido pela perda de peso, presença de massa tumoral no flanco e confirmação do estado caquético nos animais portadores de tumor (TW e TWG). Resultados similares foram encontrados nas mesmas condições experimentais.¹³⁻⁴⁷

A caquexia associada ao câncer é caracterizada pela perda de massa corpórea maior ou igual a 10% e complexas alterações metabólicas.^{47-54,55} No presente estudo, foi originada em consequência do aumento do catabolismo e com ausência da anorexia, pois não foi verificada alteração da ingestão de alimentos entre os grupos de estudo controles e/ou aqueles portadores de tumor. O mesmo padrão de desenvolvimento de caquexia foi descrito por Tisdale (2009).

Verificou-se que as CIC-MY e CIC-DMP, imunomarcadas pela proteína Ano1, apresentaram uma redução da densidade quando comparado o grupo TW (portadores de tumor) ao controle. Por outro lado, uma maior expressão dessa proteína foi verificada pela análise de Western Blot, aumento da intensidade de brilho e da ocupação do espaço pela imunomarcagem, no grupo TW em comparação com o grupo C. A redução da densidade das CIC parece estar relacionada ao estresse oxidativo que é elevado no câncer.⁴⁴ No diabetes mellitus, doença que também apresenta uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio, tem sido relatado na literatura a redução da densidade das CIC.²⁸⁻⁴³ Sugerindo então, que estas células são de fato sensíveis ao estresse oxidativo.

A redução da densidade das CIC no grupo TW foi acompanhada de uma plasticidade celular evidenciada por meio de diferentes análises realizadas. Nesta pesquisa, não foi avaliada a proliferação das CIC, entretanto, a plasticidade foi evidenciada pela manutenção das redes pelas projeções celulares presentes tanto nas imunomarcações para as CIC-MY como para as CIC-DMP. As redes formadas pelas projeções das CIC foram mantidas e recuperadas pela plasticidade, e com a elevação da expressão da proteína Ano1, a atividade dos canais de Ca^{2+} e Cl^- foram mantidas e a homeostasia intestinal provavelmente foi preservada.

Gibbons *et al.* (2009) em experimentos realizados com colo de humanos saudáveis, verificaram que as CIC morrem por mecanismos apoptóticos, mas as mesmas podem continuamente se regenerar mantendo suas redes intactas. Estudo para avaliação da plasticidade das CIC, após dano agudo das redes, mostrou a recuperação da função intestinal em 5 semanas, não sendo observado a restauração da densidade das CIC.³⁶ Alguns mecanismos vem sendo relacionados à plasticidade das CIC: a) reparação e proliferação pelas CIC adultas;²¹⁻⁴⁵ b) reposição por suas células precursoras;⁴¹ c) proteção pela heme oxigenase-1 (HO-1);¹⁸⁻⁴⁶ d) contribuição das vias de sinalização para a sobrevivência e proliferação, incluindo o NO derivado de neurônios.¹⁷

Foi evidenciado na avaliação de ocupação do espaço e expressão por Western Blot, que a enzima nNOS apresentou uma elevação de sua expressão, sendo um indicativo de uma maior produção de NO. Tem sido relatado na literatura que o NO está intimamente relacionado com a sobrevivência das CIC, podendo atuar como uma molécula citoprotetora.¹⁸ No presente estudo, evidências comprovam que houve uma maior expressão da nNOS e da proteína Ano1 no grupo TW, e acreditamos que com a maior produção de NO, as redes de CIC tanto a do

tipo MY como a DMP foram estimuladas a proliferar. A íntima relação da enzima nNOS foi revelada com a CIC-DMP, e uma menor associação com as CIC-MY, corroborando com os resultados Blair *et al.* (2012).

A suplementação com L-glutamina foi utilizada neste estudo, pois a caquexia presente no modelo experimental contribui para alterações no metabolismo de aminoácidos,³⁹⁻⁴⁹ incluindo a depleção de glutamina, como relatado por Choudry *et al.* (2006). Embora os tumores apresentam uma elevada atividade da enzima glutaminase, a suplementação com L-glutamina não estimulou o crescimento do mesmo, podendo inferir que a L-glutamina foi utilizada por outros tecidos do hospedeiro, como pelas células epiteliais do intestino delgado e tecido muscular.¹²⁻⁶⁴

A suplementação com L-glutamina parece diminuir a taxa de degradação e aumentar a síntese de proteína no músculo esquelético e na mucosa intestinal, e com seus níveis aumentados no plasma ajuda na redução da perda de peso.⁶⁴ No grupo suplementado com L-glutamina (TWG) houve o desenvolvimento de caquexia, sendo significativamente menor que no grupo TW. Um outro aspecto importante é o elevado estresse oxidativo originado em consequência do câncer,⁵⁶ onde células neuronais¹⁶⁻³¹ e CIC³⁵⁻⁶³ são susceptíveis aos efeitos deletérios da elevada produção de espécies reativas de oxigênio. A defesa antioxidante pode ser melhorada pela suplementação com L-glutamina, pois foi relatado que após suplementação os níveis de glutathione no jejuno aparecem aumentados.³⁻⁶⁴

A suplementação com L-glutamina no grupo TWG promoveu elevada plasticidade. As CIC-MY aumentaram a expressão da proteína Ano1, e a plasticidade celular foi evidenciada pela tentativa do rearranjo espacial das projeções celulares pela maior ocupação do espaço. Já para as CIC-DMP, a L-glutamina preveniu o dano sobre a densidade dessas células, restaurando a mesma.

Ainda, a suplementação pode estar estimulando algum mecanismo de resposta das CIC na ausência da doença, correspondendo ao aumento da ocupação do espaço pelas CIC-MY e maior intensidade de brilho para as CIC-DMP.

Os mecanismos de reparo das CIC não estão elucidados, porém é possível deduzir que a suplementação com L-glutamina pode estar envolvida na regulação dos canais de Ca^{+2} e Cl^- , e que o óxido nítrico pode contribuir para a restauração das CIC. A íntima relação entre as fibras nervosas submucosas nNOS-IR e as CIC-DMP podem ser evidenciadas pelas análises realizadas, mostrando o mesmo padrão de respostas para ambos. Conclui-se que o tratamento com antioxidante melhora o quadro de desequilíbrio homeostático provocado pela neoplasia, e parece estar contribuindo na proteção e reparação das CIC no modelo de Tumor de Walker-256.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação Araucária - PR pelo apoio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

1. Albertini SM, Ruiz, MA. O papel da glutamina na terapia nutricional do transplante de medula óssea. *Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy*. 2001; 23:41-47 (<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842001000100006>).
2. Alves EPB, Alves AMP, Pereira RVF, Miranda-Neto MH, Zanoni JN. Immunohistochemical study of vasoactive intestinal peptide (VIP) enteric neurons in diabetic rats supplemented with L-glutamine. *Nutritional Neuroscience*. 2010;13(1):43-51 (doi: 10.1179 / 147683010X12611460763841).
3. Austgen TR, Dudrick PS, Sitren H, Bland K, Copeland E, Souba WW. The Effects of Glutamine-enriched Total Parenteral Nutrition on Tumor Growth and Host Tissues. *Ann. Surg.* 1992, 107-113.
4. Bayguinov PO, Henning GW, Smith TK. Ca^{2+} imaging of activity in ICC-MY during local mucosal reflexes and the colonic migrating motor complex in the

- murine large intestine. *The Journal of Physiology*. 2010;588:4453–4474 (doi: 10.1113/jphysiol.2010.196824).
5. Beckett EA, Horiguchi K, Khoyi M, Sanders KM, Ward SM. Loss of enteric motor neurotransmission in the gastric fundus of SI/SI(d) mice. *The Journal of Physiology*. 2002;543:871–87.
 6. Biolo G, De Cicco M, Dal Mas V. Response of muscle protein and glutamine kinetics to branched-chain-enriched amino acids in intensive care patients after radical cancer surgery. *Nutrition*. 2006;22:1-8.
 7. Blair P, Rhee P-L, Sanders KM, Ward SM. The significance of Interstitial Cells in Neurogastroenterology. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2014;20(3): 294-317 (<http://dx.doi.org/10.5056/jnm14060>).
 8. Blair P, Bayguinov Y, Sanders KM, Ward SM. Relationship between enteric neurons and interstitial cells in the primate gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2012,24:e437-e449 (doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01975.x).
 9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;248-254 (doi: 10.1016 / 0003-2697 (76) 90527-3).
 10. Camborová, P; Hubka, P; Sulkava, I; Hulin, I. The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity. *Physiological Research*. 2003;52:275–284.
 11. Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galletta LJ. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science*. 2008;322:590–594 (doi: 10.1126/science.1163518).
 12. Carroll PV, Jackson NC, Russell-Jones DL, Treacher DF, Sonksen PH, Umpleby AM. Combined growth hormone/insulin-like growth factor I in addition to glutamine-supplemented TPN results in net protein anabolism in critical illness. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286: E151–E157.
 13. Cassola P, Moreira CC, Liboni TF, Zaia CT, Borba-Murad GR, Bazotte RB, de Souza HM. Changes in blood metabolic parameters during the development of Walker-256 tumour-induced cachexia in rats are not caused by decreased food intake. *Cell Biochem Funct* 2012, 30:265-270 (doi: 10.1002/cbf.2792).
 14. Choudry HA, Pan M, Karinch AM, Souba WW. Branched-Chain Amino Acid-Enriched Nutritional Support in Surgical and Cancer Patients. *Journal of Nutrition* 2006,136: S314-S318.
 15. Chaudhury A, Miranda-Neto MH, Pereira RVF, Zanoni JN. Myosin Va but not nNOS α is significantly reduced in jejunal musculomotor nerve terminals in

- diabetes mellitus. *Frontiers in Medicine/Gastroenterology* 2014;1(17) (doi: 10.3389/fmed.2014.00017).
16. Chandrasekharan B, Anitha M, Blatt R, Shahnava N, Kooby D, Staley C, Mwangi S, Jones DP, Sitaraman SV, Srinivasan S. Colonic motor dysfunction in human diabetes is associated with enteric neuronal loss and increased oxidative stress. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23(2): 131–e26 (doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01611.x).
 17. Choi KM, Gibbons SJ, Roeder JL, Lurken MS, Zhu J, Wouters MM, Miller SM, Szurszewski JH, Farrugia G. Regulation of interstitial cells of Cajal in the mouse gastric body by neuronal nitric oxide. *Neurogastroenterol Motil.* 2007;19:585–595.
 18. Choi KM, Gibbons SJ, Nguyen TV, Stoltz GJ, Lurken MS, Ordog T, Szurszewski JH, Farrugia G. Heme Oxygenase-1 Protects Interstitial Cells of Cajal From Oxidative Stress and Reverses Diabetic Gastroparesis. *Gastroenterology* 2008;135:2055–2064 (doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.003).
 19. Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, Corless M, Newsholme P. Molecular mechanisms of glutamine action. *Journal of Cellular Physiology.* 2005;204: 392-401.
 20. Espinosa I, Lee CH, Kim MK, Rouse BT, Subramanian S, Montgomery K, Varma S, Corless CL, Heinrich MC, Smith KS, Wang Z, Rubin B, Nielsen TO, Seitz RS, Ross DT, West RB, Cleary ML; van de Rijn M. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol.* 2008;32:210–218
 21. Farrugia, G. Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterology and Motility* 2008; 20: 54–63 (doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01109.x).
 22. Farrugia G, Lei S, Lin X. A major role for carbon monoxide as an endogenous hyperpolarizing factor in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:67–70.
 23. Ferrera L, Caputo A, Ubbi I, Bussani E, Zegarra-Moran O, Ravazzolo R, Pagani F, Galletta LJ. Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry* 2009;284: 33360–33368 (doi: 10.1074/jbc.M109.046607).
 24. Gfroerer F, Role U. Interstitial cells of Cajal in the normal human gut and in Hirschsprung disease. *Pediatric Surgery International.* 2013;29:89-97 (doi: 10.1007/s00383-013-3364-y).
 25. Gibbons SJ, Strega PR, Sha L., Roeder JL, Mazzone A., Ou Y., Rich A., Farrugia G. The α_1H Ca²⁺ channel subunit is expressed in mouse jejunal interstitial cells of Cajal and myocytes. *J. Cell. Mol. Med.* 2009;13(4):422-443 (doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00623.x).

26. Gibbons SJ, Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol.* 2004;556:25–36 (doi:10.1113/jphysiol.2003.056556).
27. Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Bardsley MR, Lorincz A, Pozo MJ, Pasricha PJ, Van de Rijn M, West RB, Sarr MG, Kendrick ML, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Ordog T; Farrugia G. Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G1370–G1381 (doi: 10.1152/ajpgi.00074.2009).
28. Grover M, Bernard CE, Pasricha PJ, Lurken MS, Fausone-Pellegrini MS, Smyrk TC, Parkman HP, Abell TL, Snape WJ, Hasler WL, McCallum RW, Nguyen L, Koch KL, Calles J, Lee L, Tonascia J, Ünalp-Arida A, Hamilton FA, Farrugia G. Clinical-histological associations in gastroparesis: results from the Gastroparesis Clinical Research Consortium. *Neurogastroenterol Motil.* 2012; 24 (6): 531-9, E249. (doi: 10.1111 / j.1365-2982.2012.01894.x).
29. Guarner FA, Cecchini AL, Suzukawa AA, Maragno AL, Simão AN, Gomes MD, Cecchini R. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. *Muscle and Nerve.* 2010;42:950-958 (doi: 10.1002/mus.21798).
30. Hanani M, Farrugia G, Komuro T. Intercellular coupling of interstitial cells of Cajal in the digestive tract. *International Review of Cytology.* 2005;242:249–282.
31. Hermes-Uliana C , Panizzon CP , Trevizan AR , Sehaber CC , FV Ramalho , Martins HA , Zanoni JN. Is L-glutathione more effective than L-glutamine in preventing enteric diabetic neuropathy? *Dig Dis Sci.* 2014, 59 (5): 937-48. (doi: 10.1007 / s10620-013-2993-2).
32. Hirst GDS, Garcia-Londoño AP, Edwards FR. Propagation of slow waves in the guinea-pig gastric antrum. *J Physiol.* 2006;571:165–177
33. Hwang SJ, Blair PJA, Britton FC, O'Driscoll KE, Hennig G, Bayguinov YR, Rock JR, Harfe BD, Sanders KM; Ward SM. Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. *J Physiol* 2009;587:4887–4904 (doi: 10.1113/jphysiol.2009.176198).
34. Iwasaki H, Kajimura M, Osawa S, Kanaoka S, Furuta T, Ikuma M, Hishida A. A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol.* 2006;41:1076–1087.
35. Kashyap P, Farrugia G. Oxidative stress: key player in gastrointestinal complications of diabetes. *Neurogastroenterol Motil.* 2011; 23, 111–114 (doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01659.x).
36. Klein S, Seidler B, Kettenberger A, Sibaevev A, Feil R, Hofmann F, Vanderwinden J-M, Allescher H-D, Schemann M, Storr M A, Schimid R M,

- Schneider G, Saur D. Interstitial cells of Cajal plasticity rather than regeneration restores slow-wave activity and enteric neurotransmission upon acute damage. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2013, 14(Suppl1):P34.
37. Komuro, T. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Journal of Physiology*. 2006;576:653–658.
38. Lee H-T, Hennig GW, Fleming NW, Keef KD, Spencer NJ, Ward SM, Sanders KM, Smith TK. The mechanism and spread of pacemaker activity through myenteric interstitial cells of Cajal in human small intestine. *Gastroenterology*. 2007;132:1852–1865
39. Lima MMR, Melo MAR, Cury R. Walker 256 tumour growth causes marked changes of glutamine metabolism in rat small intestine. *Cell Biochem Funct*. 2002; 20(2):107-13 (doi: 10.1002/cbf.961).
40. Lino, S, Horiguchi, K. Interstitial Cells of Cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Acta Histochem Cytochem*. 2006;39:145-153.
41. Lorincz A, Redelman D, Horváth VJ, Bardsley MR, Chen R, Ordög T. Progenitors of Interstitial Cells of Cajal in the Postnatal Murine Stomach. *Gastroenterology* 2008;134:1083–1093 (doi: 10.1053/j.gastro.2008.01.036.).
42. Mantovani G, Madeddu C, Macciò A, Gramignano G, Lusso MR, Massa E, Astara G, Serpe R. Cancer-Related Anorexia/Cachexia Syndrome and Oxidative Stress: An Innovative Approach beyond Current Treatment. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2004;13.
43. Mazzone A, Bernard CE, Strege PR, Beyder A, Galletta LJ, Pasricha PJ, Rae JL, Parkman HP, Linden DR, Szurszewski JH, Ördög T, Gibbons SJ, Farrugia G. Altered expression of *Ano1* variants in human diabetic gastroparesis. *J Biol Chem*. 2011;286(15):13393-403 (doi: 10.1074/jbc.M110.196089).
44. Mena S, Ortega A, Estrela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research* 2009, 674:36–44.
45. Mei F, Zhu J, Guo S, Zhou DS, Han J, Yu B, Li SF, Jiang ZY, Xiong CJ. An age-dependent proliferation is involved in the postnatal development of interstitial cells of Cajal in the small intestine of mice. *Histochem Cell Biol*. 2009;131(1):43-53. (doi: 10.1007/s00418-008-0515-7).
46. Mogami S, Suzuki H, Tsugawa H, Fukuhara S, Hibi T. Impaired heme oxygenase-1 induction in the gastric antrum induces disruption of the interstitial cells of Cajal network in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Neurogastroenterol Motil*. 2013, 25, 609-465 (doi: 10.1111/nmo.12122).
47. De Morais H, Cassola P, Moreira CC, Bôas SK, Borba-Murad GR, Bazotte RB, de Souza HM. Decreased response to cAMP in the glucose and glycogen

- catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats. *Mol Cell Biochem.* 2012, 368:9-16. (doi: 10.1007/s11010-012-1337-4).
48. Oliveira GP, Dias CM, Pelosi P, Rocco PR. Understanding the mechanisms of glutamine action in critically ill patients., *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 2010;82:417-430.
 49. Salomão EM, Gomes-Marcondes MCC. Light aerobic physical exercise in combination with leucine and/or glutamine-rich diet can improve the body composition and muscle protein metabolism in young tumor-bearing rats. *J Physiol Biochem* 2012, 68:493-501 (doi: 10.1007/s13105-012-0164-0.).
 50. Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:307–343.
 51. Schroeder BC, Cheng T, Jan YN; Jan LY. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell.* 2008;134:1019–1029.
 52. Sha L, Farrugia G, Harmsen WS, Szurszewski JH. Membrane potential gradient is carbon monoxide-dependent in mouse and human small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293:G438–450.
 53. Strege PR, Bernard CE, Ou Y, Gibbons SJ, Farrugia G. Effect of mibefradil on sodium and calcium currents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289:G249–253.
 54. Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2:862-871.
 55. Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev* 2009;89:381–410 (doi: 10.1152/physrev.00016.2008.).
 56. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007, 39:44-84.
 57. Violato NM. Avaliação do estado inflamatório em ilhotas de Langerhans de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Botucatu SP, 2013.
 58. Wang XY, Paterson C, Huizinga JD. Cholinergic and nitrergic innervation of ICC-DMP and ICC-IM in the human small intestine. *Neurogastroenterol Motil.* 2009;15:531-43.
 59. Ward SM, McLaren GJ, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine. *The Journal of Physiology.* 2006;573:147-159 (doi: 10.1002/1097-0185(20010101)262:1<125::AID-AR1017>3.0.CO;2-I).

60. West RB, Corlles CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zull S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC, Van de Rijn M. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *American Journal of Pathology*. 2004;165:107–113.
61. Won KJ, Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:14913–8.
62. Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK, Oh U. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature*. 2008;455:1210–1215 (doi: 10.1038/nature07313).
63. Yarandi SS, Srinivasan S. Diabetic gastrointestinal motility disorders and the role of enteric nervous system: Current status and future directions. *Neurogastroenterol Motil*. 2014; 26, 611–624 (doi: 10.1111/nmo.12330).
64. Yoshida S, Kaibara A, Ishibashi N, Shirouzu K. Glutamine Supplementation in Cancer Patients. *Nutrition* 2001, 17: 766-768.
65. Zhu MH, Kim TW, Ro S, Yan W, Ward SM, Koh SD and Sanders KM. A Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity. *J Physiol*. 2009;587:4905–4918 (doi: 10.1113 / jphysiol.2009.176206).

Tabela 1. Parâmetros fisiológicos: peso final (PF) (71 dias de idade), consumo de ração (CR) e massa tumoral (MT) do flanco direito. Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), Tumor de Walker-256 (TW) e Tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG).

	C	CG	TW	TWG
PF (g)	298,0±6,7 ^a	286,1±5,2 ^a	248,9±4,9 ^b	265,1±5,6 ^b
CR (g/dia)	23,3±0,6 ^a	22,9±0,4 ^a	21,4±0,6 ^a	21,4±0,4 ^a
MT (g)	-	-	26,8±1,6 ^a	20,9±2,8 ^a

Resultados expressos como média ± erro padrão. Valores médios seguidos por letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). $n = 7$ ratos por grupo.

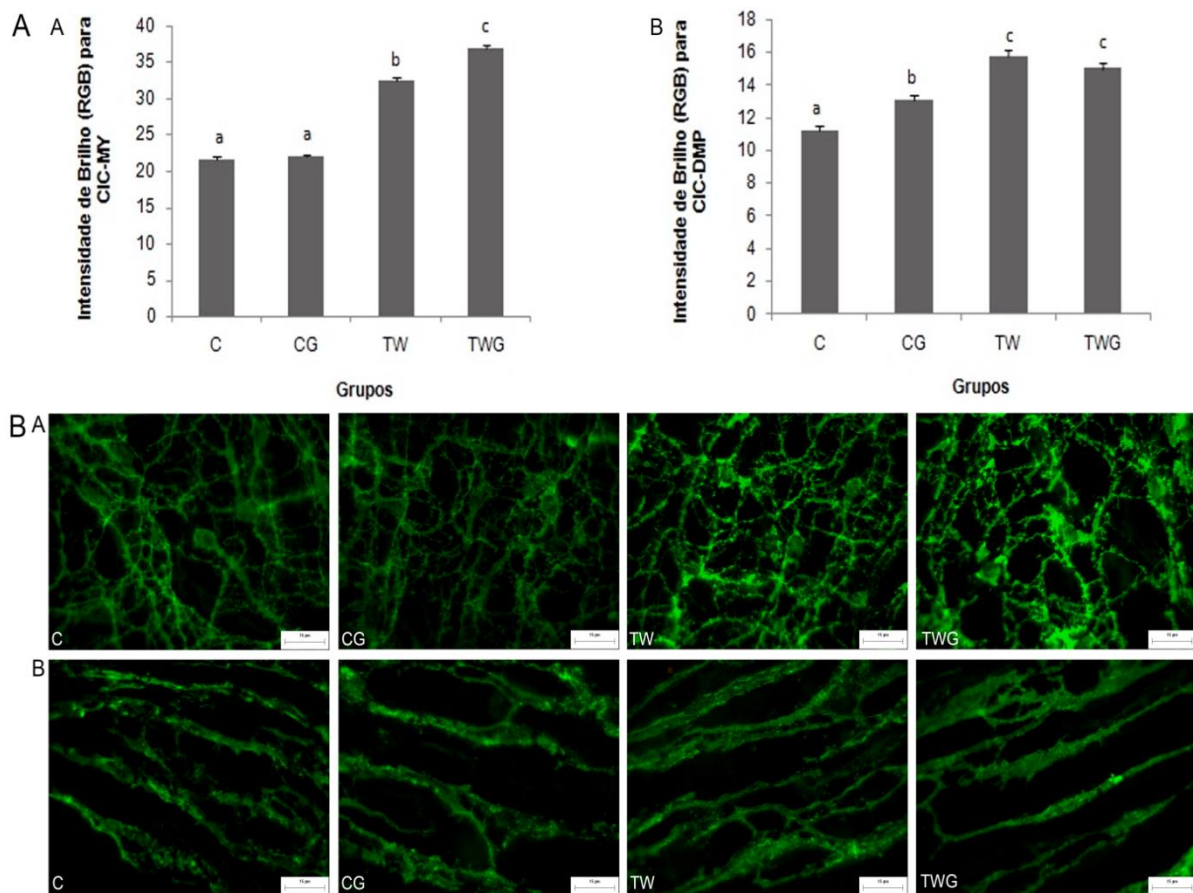


Figura 1A. Intensidade de brilho (RGB) para CIC-MY (A) e CIC-DMP (B). Resultados expressos como média \pm erro padrão. Valores médios seguidos por letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). $n = 8$ ratos por grupo. **1B.** Fotomicrografias em preparado total das CIC-MY (A) e CIC-DMP (B) imunomarcadas pela proteína Ano1 no jejuno. *Barra de calibração* 15 μm . Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG).

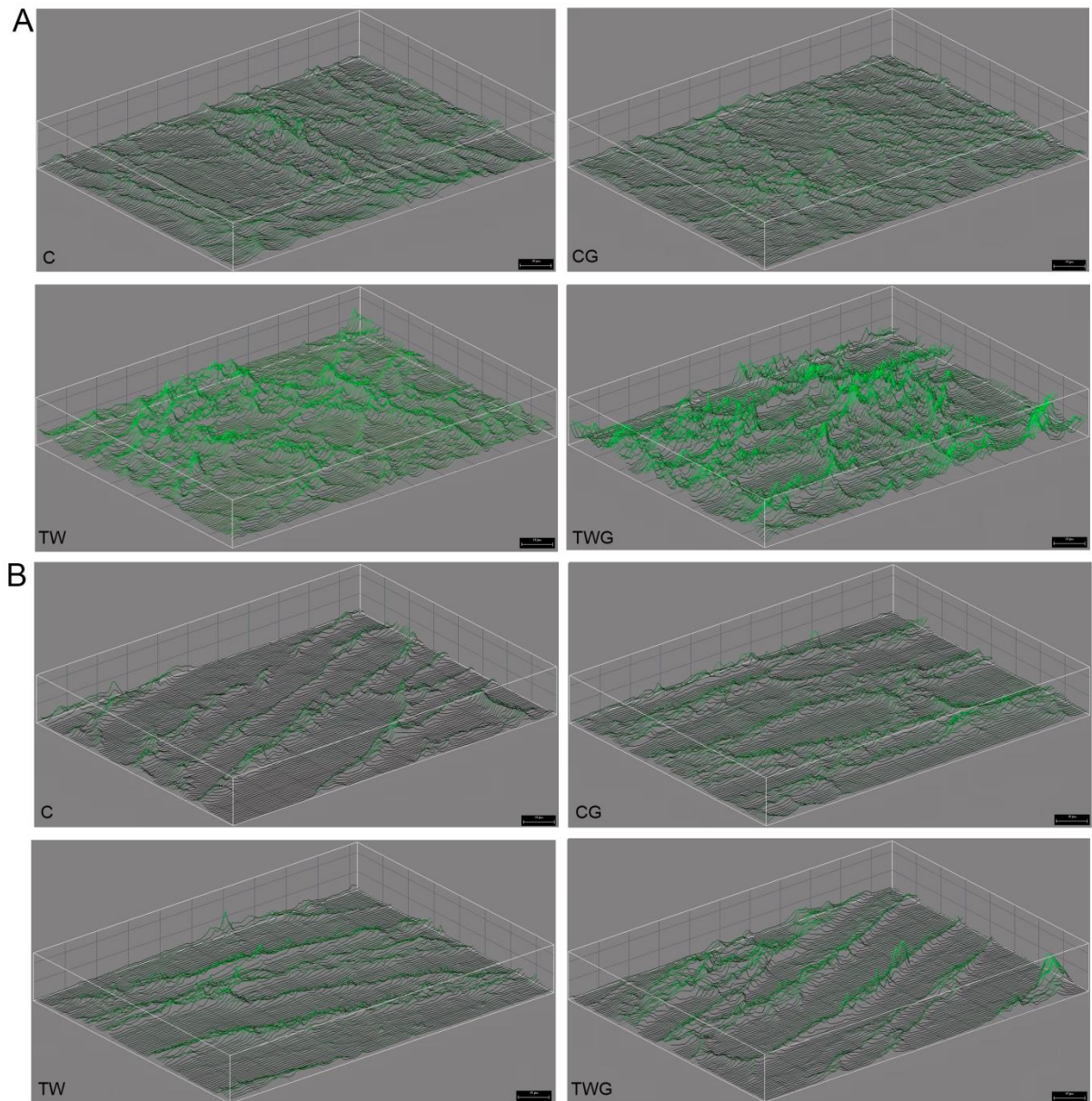


Figura 2. Modelagem em superfície 3D representativas da intensidade de brilho (RGB) das CIC-MY (A) e CIC-DMP (B). Grupos: controle (C), controle suplementado com glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com glutamina (TWG). *Barra de calibração 15 µm.*

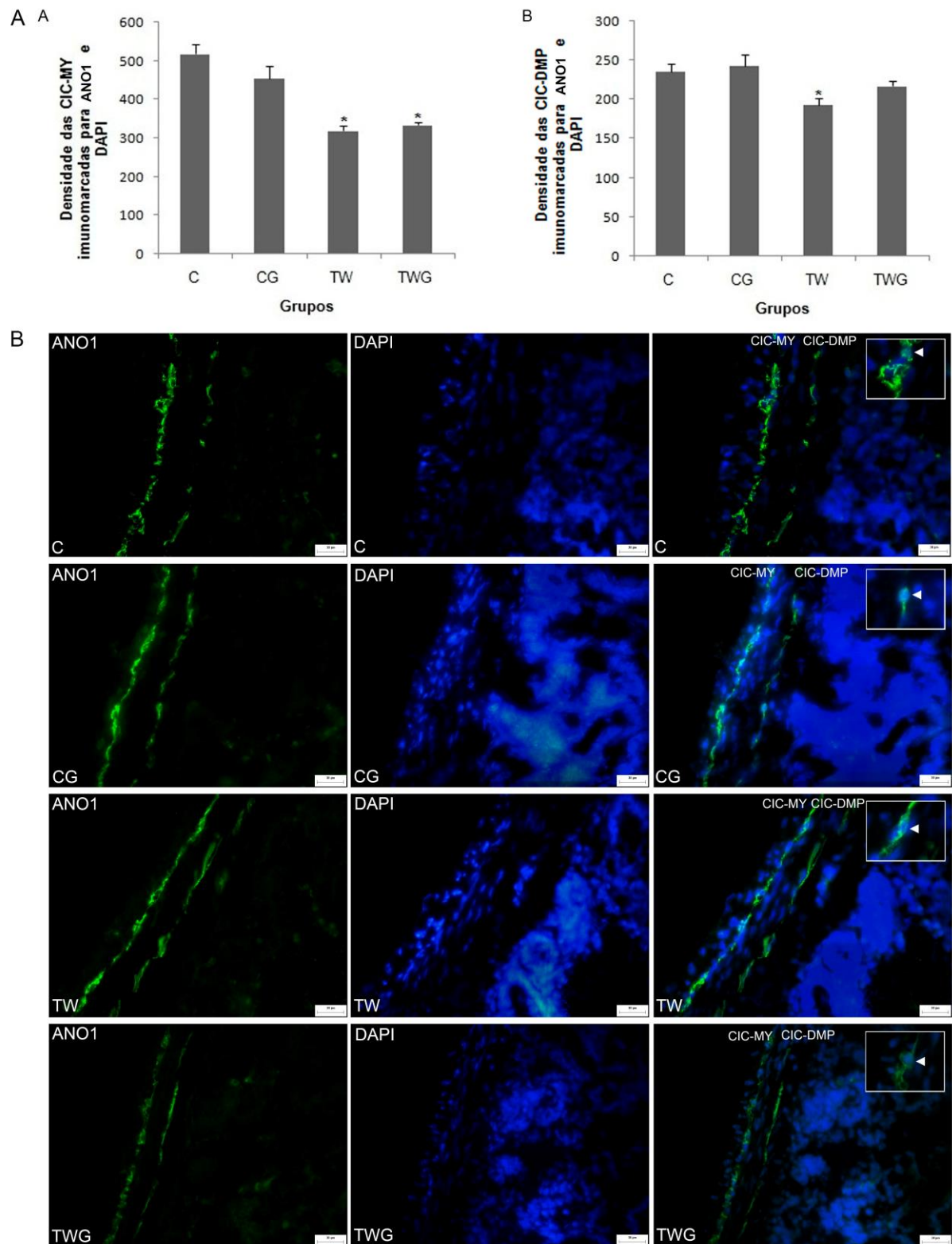


Figura 3A. Densidade das CIC-MY (A) e CIC-DMP (B). Resultados expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ quando comparado a C. $n = 8$ ratos por grupo. **3B.** Fotomicrografias em corte histológico das CIC-MY e CIC-DMP. As setas indicam a co-localização das CIC/DAPI. Barra de calibração 30 μ m. Grupos: controle (C),

controle suplementado com L-glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG).

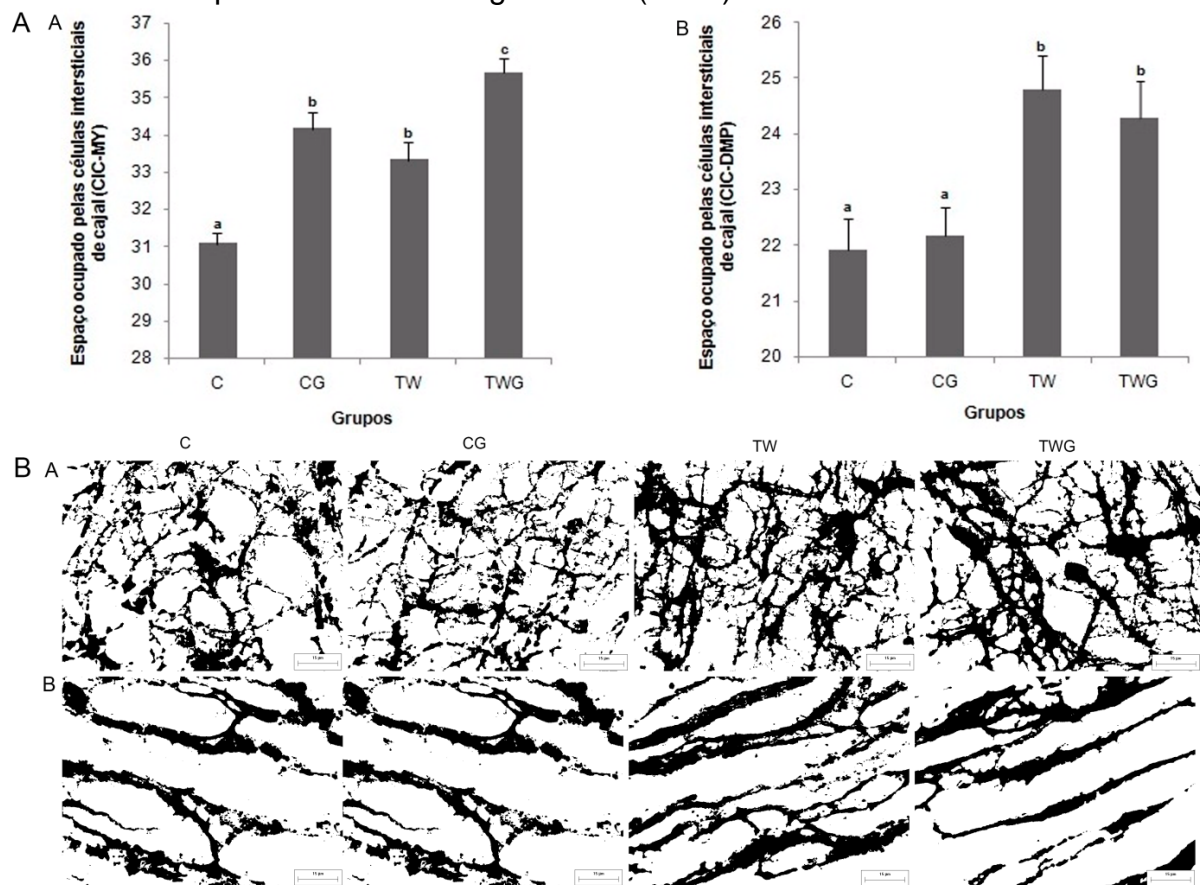


Figura 4A. Ocupação do espaço pelas redes celulares CIC-MY (A) e CIC-DMP (B). Resultados expressos como média \pm erro padrão. Valores médios seguidos por letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). $n = 8$ ratos por grupo. **4B.** Fotomicrografias em preparado total das CIC-MY (A) e CIC-DMP (B), imagens 16-bit. *Barra de calibração* 15 μm . Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG).

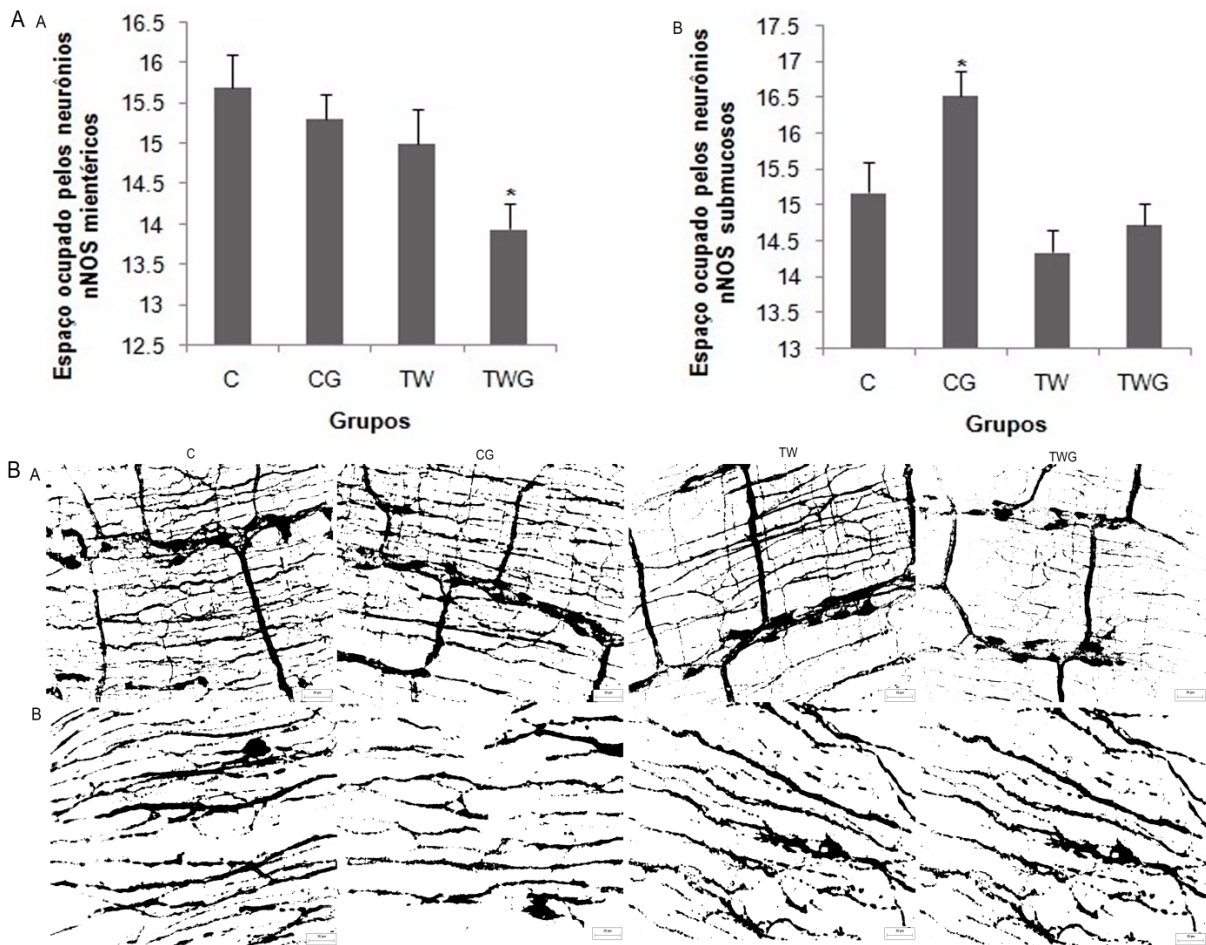


Figura 5A. Ocupação do espaço pelos neurônios nNOS-IR mientéricos (A) e submucosos (B). Resultados expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ quando comparado a C. $n = 8$ ratos por grupo. **5B.** Fotomicrografias representativas dos nNOS-IR mientéricos (A) e submucosos (B), imagens 16-bit. *Barra de calibração* 30 μm . Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG).

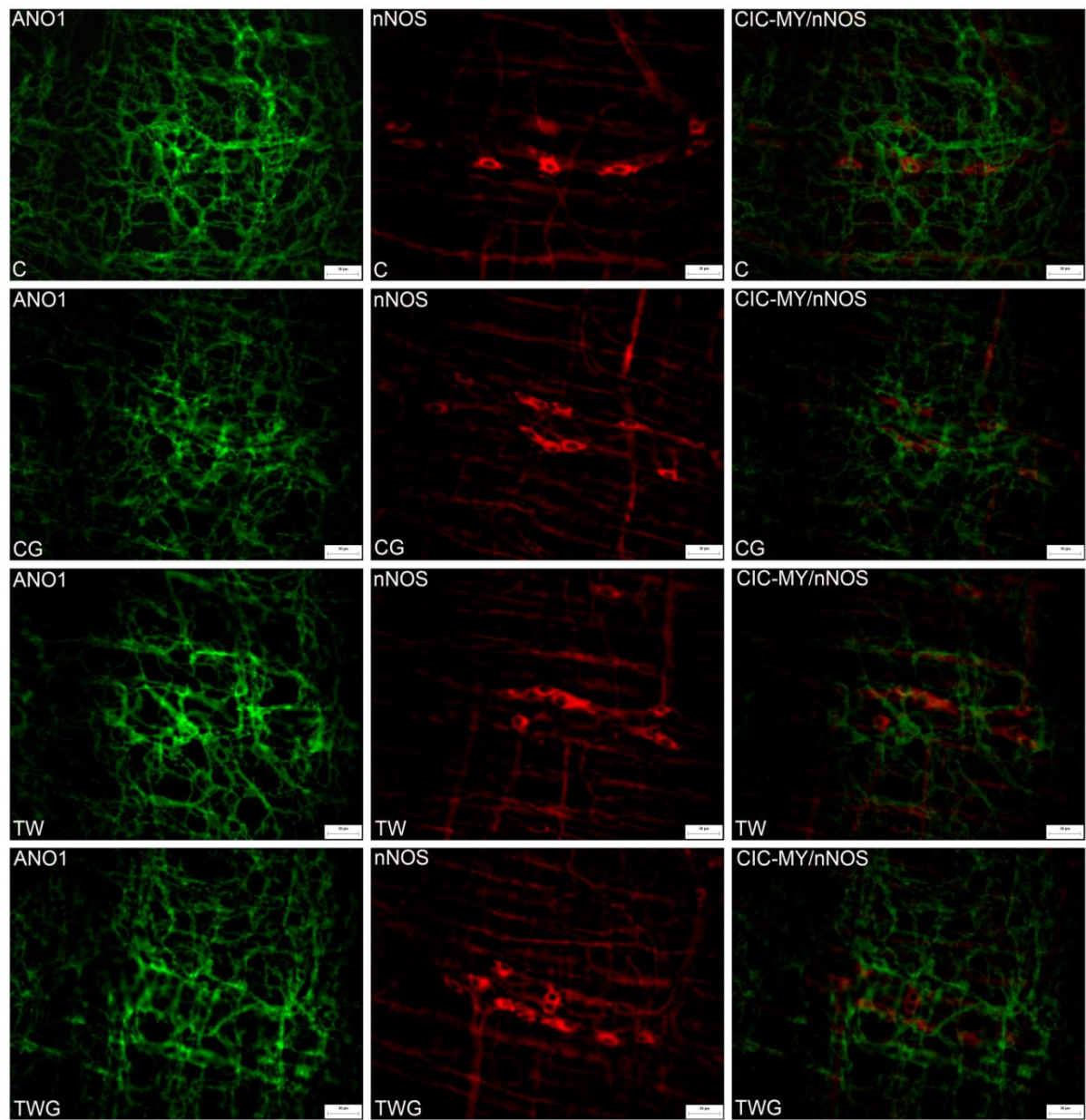


Figura 6. Fotomicrografias para Ano1 (CIC-MY), nNOS e CIC-MY/nNOS. *Barra de calibração* 30 µm. Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG).

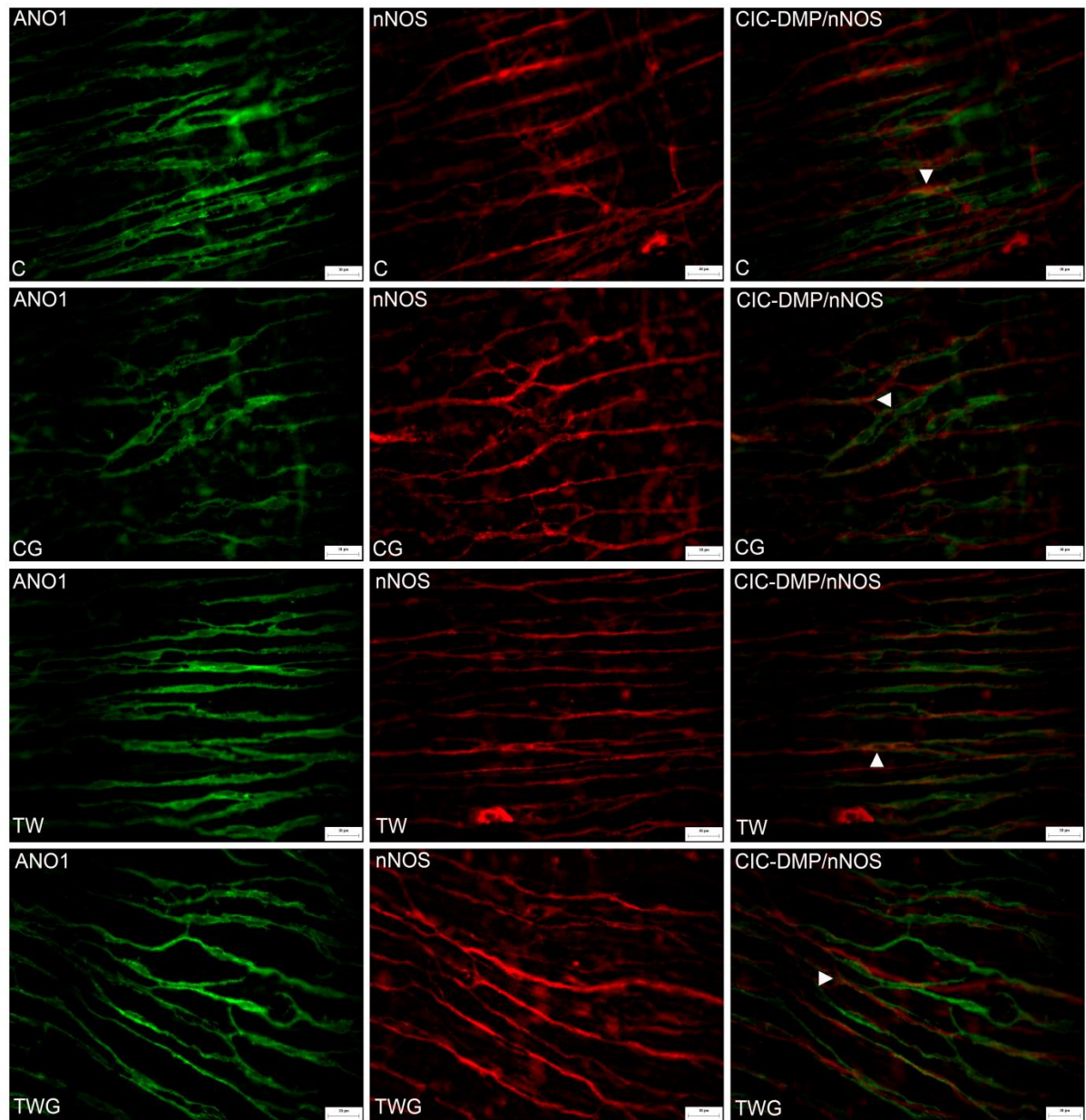


Figura 7. Fotomicrografias para Ano1 (CIC-DMP), nNOS e CIC-DMP/nNOS. As cabeças de setas indicam exemplos de fibras nervosas nNOS-IR e redes das CIC-DMP co-localizadas. *Barra de calibração* 30 µm. Grupos: controle (C), controle suplementado com L-glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com L-glutamina (TWG).

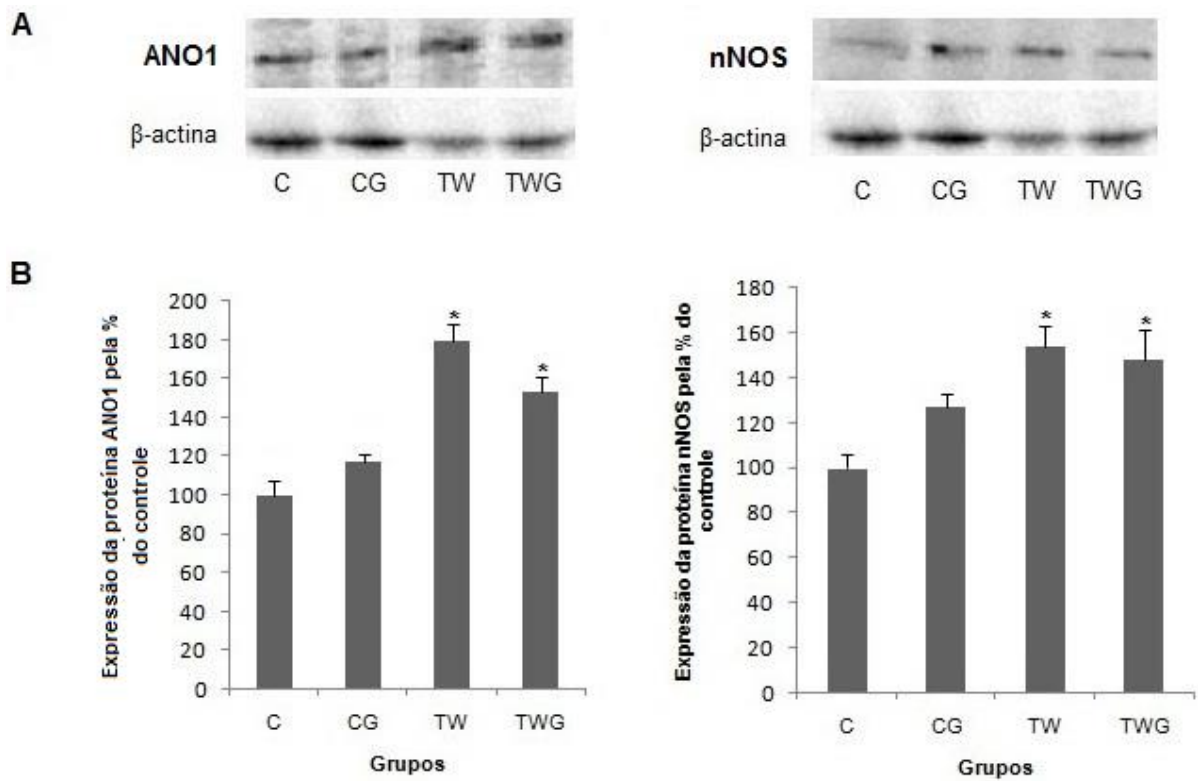


Figura 8A. Imunoblot para AnO1 e nNOS. **8B.** Resultados expressos pela porcentagem do grupo controle. * $p < 0,05$ quando comparado a C. $n = 4$ ratos por grupo. Grupos: controle (C), controle suplementado com glutamina (CG), tumor de Walker-256 (TW) e tumor de Walker-256 suplementado com glutamina (TWG).

**L-GLUTAMINE AND NITRIC OXIDE PROMOTE PLASTICITY IN INTERSTITIAL
CELLS OF CAJAL IN WALKER 256 TUMOR-BEARING RATS
(EFFECT OF L-GLUTAMINE IN THE JEJUNUM OF WALKER 256 TUMOR-
BEARING RATS)**

L Fracaro*, F C. V. Frez*, B C. Silva*, G E. Vicentini*, S R. G. de Souza*, H A. Martins*, J N. Zanoni*

*-Department of Morfological Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, n 5790 Bloco O-33, Maringá, PR CEP 87020-900, Brazil.

Corresponding author: Jacqueline Nelisis Zanoni, phone number: (+55) 443011-5944, e-mail: jnzanoni@uem.br - Department of Morfological Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, n 5790 Bloco O-33, Maringá, PR CEP 87020-900, Brazil.

Abstract

Background/Aims

Evaluate the effects of supplementation with L-glutamine 2% in cachexia and in disorders of intestinal motility in the jejunum, and the relationship between enzyme nitric oxide synthase immunoreactive neural (nNOS-IR) and interstitial cells of Cajal (ICC) in Walker 256 tumor-bearing rats.

Methods

Thirty-two male Wistar rats were divided into four groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT), and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG). After 14 days, the jejunums were processed for immunohistochemical techniques including whole mounts and cryosections and Western blot analysis. Quantitative analyses were performed for Ano1 and nNOS.

Results

The reduced density of ICC and the increase in Ano1 protein expression was observed in the WT group compared to the C group ($p < 0.05$). Greater production of nitric oxide (NO) stimulated proliferation and maintenance of ICC-MY and ICC-DMP cell projections. Cachexia was lower in the WTG group compared to WT ($p < 0.05$). Supplementation with L-glutamine in the WTG group promoted high plasticity in ICC.

Conclusions

Supplementation with L-glutamine seems to be involved in the regulation of Ca^{+2} and Cl^{-} channels. Increased expression of NO together with the antioxidant treatment, appear to contribute to the protection and repair of the ICC in the Walker 256 tumor model.

Key words: antioxidants, protein synthesis, enteric nervous system, cancer.

Introduction

The interstitial cell of Cajal (ICC) was discovered and described by the Spanish researcher Santiago Ramón y Cajal in 1911. It has been established that its function is to generate and propagate electrochemical signaling;¹⁰⁻⁵⁰ regulate the action potentials and gradient of electrochemical potential in the smooth muscle cell membrane,²²⁻²⁶⁻⁵² enteric neural signaling transmission,³⁸⁻⁴⁰⁻⁶⁴ and they also appear to be involved in mechanotransduction.⁵³⁻⁶¹

The ICC are a heterogeneous, specialized class of cells, classified into several subtypes depending on their location in the tissue layers of the gastrointestinal tract (GIT) and their morphological and functional characteristics.²⁴⁻³⁰ In outer longitudinal muscle layer, coupled to the myenteric plexus (MY), ICC-MY cells are characterized by multipolar cytoplasm and dense networks that interconnect three-dimensionally in the myenteric plexus,⁷⁻³⁷ their specific function is to generate slow waves in the muscles, behaving as pacemaker cells in the small intestine.³²⁻⁴⁰ In inner circular muscle layer, next deep muscular plexus (DMP), ICC-DMP are multipolar cells with thin processes along the nerve fibers in the deep muscular plexus, capable of interacting with the smooth muscle cells and neurons with inhibitory functions in the GI tract. Participate in neurotransmission,^{5-58,59} and they are fewer in number compared with the ICC-MY.⁷⁻³⁷

The protein anoctamin 1, Ano1 (*Tmem16A*) is a calcium-activated chloride channel and presents specific and high expression in the ICC.²⁰⁻⁶⁰ It alternates depolarization and repolarization in the impulse conduction of slow waves,²³⁻²⁷⁻³³ a role that is important to the study of the rhythmic contractions of intestinal smooth muscle.⁴⁻¹¹⁻⁵¹⁻⁶²⁻⁶⁵ Loss of or defects in ICC can contribute to motility disorders, and

dysfunctions are related to inflammatory processes, oxidative stress, and apoptosis.¹⁷⁻²⁵⁻³⁴

Chronic non-transmittable diseases such as cancer are capable of altering metabolic homeostasis, and the characteristic scenario of imbalance with tumor growth leads to a syndrome known as cachexia.⁵⁷ Tumors increase the amount of pro-oxidant substances and decrease the activities of antioxidant enzymes in non-tumor tissues, promoting increased oxidative stress and reducing cellular responsiveness to this process.⁴²⁻⁴⁴⁻⁵⁶ In this sense, supplementation with antioxidants has been effective to prevent or mitigate these effects.

L-glutamine is a precursor of glutathione (GSH), which is an important endogenous antioxidant. In situations of metabolic stress and intense catabolism, supplementation with L-glutamine results in clinical improvement by increasing protein synthesis.¹⁻⁶⁻¹⁹ The beneficial effects are summarized by enhancing antioxidant defenses, attenuating the inflammatory process, preserving immune function, and acting as a precursor of nucleotides and glucose.²⁻⁴⁸

Despite the relevance of this issue, data are still lacking about the role of L-glutamine in protecting ICC in induced tumors and the role of ICC in inhibitory neurotransmission. Thus, the objective of this present study was to investigate the effect of supplementation with L-glutamine 2% on ICC-MY and ICC-DMP and the relation inhibitory neurotransmission in the myenteric and submucosal nNOS neurons in the jejunum of Walker 256 tumor-bearing rats.

Materials and Methods

All procedures described in this present study are consistent with the ethical principles adopted by the Brazilian Society for Laboratory Animal Science (SBCAL) and were approved by the Universidade Estadual de Maringá (UEM) Ethics Committee on Animal Experimentation in opinion 099/2012.

Experiment design

Thirty-two male 57-day-old Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used; these weighed 199.42 ± 11.65 g, and were obtained from the Central Animal Facility of the Universidade Estadual de Maringá. The animals were randomly divided into four groups (n = 8 per group): control (C), control supplemented with L-glutamine 2% (CG), Walker tumor-256 (WT), and Walker tumor-256 supplemented with L-glutamine 2%. (WTG). The 57 day old rats were kept in polypropylene cages (40 x 33 x 17 cm) for a period of 14 days with a 12h/12h dark/light cycle and a controlled temperature ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Food and water were available *ad libitum*.

In the WTG and WT groups were inoculated subcutaneously in the right rear flank, a suspension contained 8.0×10^7 viable tumor cells (Walker 256) in 0.5 ml in phosphate buffered saline (PBS) 16.5 mM, pH 7.5 per animal. Walker 256 tumor cells are maintained in the Laboratory of Pathophysiology at the Universidade Estadual de Londrina (UEL). The controls (C and CG) were inoculated with PBS 16.5 mM, pH 7.5 in the same location.²⁰⁻²⁹

Supplementation was initiated on the same day after induction of the tumor. The unsupplemented animals (C and WT groups) received standard balanced

Nuvital feed (Nuvilab, Colombo, PR, Brazil). For experimental supplementation of rats in the CG and WTG groups, L-glutamine (Deg, São Paulo, SP, Brazil) was incorporated into the standard feed in the proportion of 2 g/100 g of feed. The feed was ground and the L-glutamine was added; this mixture was then made into pellets and subsequently dried in ovens.² Feed intake was assessed every other day (g / day).

Collection and processing of the material

At the end of the experimental period of 14 days, the animals were weighed and received injection of vincristine sulfate (0.5 mg/kg body weight; Eurofarma Laboratories, São Paulo, SP, Brazil) two hours before euthanasia. After they were anesthetized intraperitoneally with thiopental (40 mg/kg body weight; Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA) and killed under anesthetic recovery.

The tumor mass was removed from the animals and then weighed to calculate the percent (%) loss of body mass index (rate of cachexia) according to the equation:

$$\% \text{ Loss of body mass} = \frac{[\text{ibm} - \text{fbm} + (\text{mt}) + \text{gmc}]}{(\text{ibm} + \text{gmc})} \times 100$$

Where: ibm = initial body mass of the tumor-bearing animal; fbm = final body mass of the tumor-bearing animal; mt = mass of the tumor; gmc = mass gain of the control group.

The jejunums were collected, washed in phosphate buffered saline (PBS, 0.1M, pH 7.4). To identify the protein Ano1, the jejunums were filled with acetone PA fixative for 15 minutes at 4°C. After fixation, the jejunums were cut along the mesenteric border and rinsed in PBS for 30 minutes. They were stored at 4°C in PBS

with the addition of 0.08% sodium azide. For identification of nNOS neurons, the jejunums were filled with Zamboni fixative, and then was maintained for 18 h in the same solution at 4 °C. After fixation, the jejunums were cut along the mesenteric border and rinsed in 80% alcohol to remove the fastener visible. The dehydrated in increasing ethanol series (95 and 100%), the leaf clearing in xylene and rehydrated in decreasing ethanol series (100, 90, 80, and 50%) were obtained. They were then stored at 4 °C in PBS with the addition of 0.08% sodium azide.

Subsequently, the segments of jejunum were dissected under a Stemi DV4 stereomicroscope (Zeiss, Jena, Germany) to obtain the whole mounts to assess ICC-MY and myenteric nNOS immunoreactive neurons (nNOS-IR); and ICC-DMP and nNOS-IR submucosal neurons.

Immunofluorescence procedures

All total preparations were washed twice in PBS solution containing Triton X-100 0.3% (Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for 10 min. They were then incubated for 1 h in blocking solution containing PBS Triton X-100 0.5% + 2% bovine serum albumin (BSA; Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Double labeling immunohistochemistry for the Ano1 protein and nNOS enzyme

For double labeling of the Ano1 protein and nNOS enzyme, the whole-mounts were incubated in a solution containing both primary antibodies: rabbit anti-Ano1 (1:200; ABCAM® discover more, USA) and mouse anti-nNOS (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), respectively. After 48h incubation at 4°C, the

jejunums were washed twice in PBS containing Triton X-100 0.3% for 10 min and incubated for 2 h at room temperature with the following secondary antibodies: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:200; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) and Alexa Fluor 568e donkey anti-mouse IgG (1:500; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Whole-mounts were washed twice in PBS, mounted on slides with buffered glycerol (9:1) and stored at 4°C. For the negative control, the primary antibody was omitted.

Analysis of the brightness intensity emitted in immunostaining prepared for ICC in the whole-mounts

The brightness intensity emitted in immunostaining for ICC was quantified through images obtained by sampling, using 30 images of the jejunum in the total preparations of ICC-MY and ICC-DMP at 40X magnification. The images were captured by a high resolution 5.0 Mega Pixel Moticam® 2500 camera (Motic China Group Co., Shanghai, China) coupled to an Olympus BX40 optical fluorescence microscope (Olympus Co., Japan), and transferred to the PC using Motic Images Plus® 2.0ML software (Motic China Group Co., Shanghai, China) and recorded.

ImageJ® version 1.43o image analysis software (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD, USA) was used to quantify the brightness intensity emitted in immunostaining for Ano1 in the recorded images to determine the brightness in RGB (Red-Green-Blue). The analyses were evaluated blindly. All of the images were recoded before the evaluation, and the analysis was conducted by one researcher.

3D Modeling representing the immunostaining intensity of the Ano1 protein

The Interactive 3D surface plot v2.33 plugin for ImageJ® software version 1.43o (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA) was used to view 30 images of the jejunum in the whole mounts for ICC-MY and ICC-DMP at 40X magnification. The peak height and color represent the immunostaining intensity of the Ano1 protein. The same parameters of grid size, surface, perspective and lighting were used for all the analyzed 3D assemblies.¹⁵

Space occupancy by the cellular networks of ICC-MY and ICC-DMP and myenteric and submucosal nNOS-IR neurons in the whole-mounts

Semi-quantitative analysis was used to estimate the variations in the distribution of flat images of the ICC and nNOS-IR nerve terminals after Walker 256 tumor induction and supplementation with L-glutamine 2%. The proportion of the area immunostained for ICC and the nNOS enzyme was assessed through images obtained by sampling, using 30 images of the jejunum in the preparations at 40X magnification. The images were captured by a high resolution 5.0 Mega Pixel Moticam® 2500 camera (Motic China Group Co., Shanghai, China) coupled to an Olympus BX40 optical fluorescence microscope (Olympus Co., Japan), transferred to the PC using Motic Images Plus® 2.0ML software (Motic China Group Co., Shanghai, China) and recorded.

ImageJ® version 1.43o image analysis software (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA) was used in the semi-quantitative approach to estimate the variations in the spatial density of immunostaining for Ano1 and nNOS

in the recorded images; the images were converted into 16 bits and subjected to binarization function to remove background intensity.¹⁵ The analyses were evaluated blindly. All of the images were recoded before the evaluation, and the analysis was conducted by one researcher.

Immunohistochemical reactions in tissue sections obtained by cryostat

The jejunal segments were stretched with the mucosa facing up, fixed onto cork with the aid of thorns and they were washed repeatedly with 0.1 M phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS). Immediately after washing, the tissues were maintained in acetone PA for 15 minutes at 4°C. Next, they were washed in PBS for 30 minutes and stored after this process for cryoprotection in 18% sucrose solution in PBS 0.1M for a period of 24 hours. The tissues were cut and immersed in the soaking medium (OCT 4583 compound - Tissue-Tek). Frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80 °C.

Subsequently, semi-serial 10µm cryostat sections were made, arranged on slides, and stored at -1°C. For the tissue of each rat, a slide was made with seven slices to conduct immunofluorescence for the ICC.

Accordingly, the prepared tissues were initially blocked in Triton solution 0.3% and BSA 1% (BSA; Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for two hours at room temperature (RT). After blocking, the tissues were incubated in a solution containing the rabbit anti-Ano1 primary antibody (1:200; ABCAM® discover more, USA) for 48 hours at 4° C in a moist chamber. The solution to dilute the primary antibody was PBS and BSA 1%. Next, the tissues were washed twice in PBS and incubated with the secondary Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG antibody (1:200; Molecular

Probes, Eugene, Oregon, USA) diluted in PBS and BSA 1% for two hours at room temperature. Subsequently, three successive washes were performed with PBS, and the tissues were mounted on slides using Prolong Gold antifade with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) and buffered glycerol (9:1) and stored in the refrigerator. The negative control was performed by omitting the primary antibody.

Quantification of ICC immunoreactive to the Ano1 protein in histological slides

The images were captured by a high resolution AxioCam camera (Zeiss, Jena, Germany) coupled to a Axioskop Plus light microscope (Zeiss, Jena, Germany), digitized on a computer using AxioVision version 4.1. software, and recorded on a CD. Image-Pro Plus version 4.5.0.29 image analysis software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) was used to perform the quantification. For each animal, the total ICC present were quantified in a total of 30 images were captured in a 40X objective. For each view, 6 images were obtained, and a total of 5 views were used. The analyses were evaluated blindly. All of the images were recoded before the evaluation, and the analysis was conducted by one researcher.

Quantitative analysis for Ano1 and nNOS using Western blot

The jejunums were removed immediately after the animals were euthanized, and were washed with Krebs-Ringer buffer solution pH 7.4 until complete removal of the contents. Jejunal samples were obtained by lysis of the tissue in a homogenization buffer containing protease inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

USA) (Tris HCl 50 mM pH 7.2, NaCl 600 mM, EDTA 1mM) and then centrifuged for 10 minutes at 4000 rpm. The supernatant was collected and stored at -80°C until use. The total protein concentration was determined by the Bradford method⁸ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

The Western blot test was conducted following the standard procedures of the Bio-Rad Mini Protean System. The aliquots obtained corresponding to 40 µg of total protein were separated using Page SDS polyacrylamide gel 12% for Ano1 and nNOS, and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). After checking the transfer efficiency by Ponceau S staining, the membranes were blocked with 5% nonfat dried milk in TBS buffer (Tris base 2.24g/L and NaCl 8 g/L; pH 7.6) containing 0.1% Tween-20 for 1 h at room temperature.

The membranes were incubated with primary rabbit anti-Ano1 antibodies (1:500; ABCAM® discover more, USA), rabbit anti-nNOS antibodies (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) overnight at 4° C, then incubated with the secondary antibody conjugated with goat anti-rabbit peroxidase (1:2000; Pierce, Rockford, IL, USA) for 2 h. Immunodetection was performed using the chemiluminescence method with a ChemiDoc MP imager according to the manufacturer's instructions (V3 Western Workflow™, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Immunostaining was analyzed through images obtained from Image Lab™ software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Statistical Analysis

The data were statistically analyzed using Statistica 7.1 and GraphPad Prism 5.1 software, and were expressed as mean ± standard error. One-way analysis of

variance (ANOVA) was used, followed by the Tukey test and nonparametric t test. P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Physiological parameters

There were no significant differences in final weight when comparing groups C and CG ($p > 0.05$). The final weight for groups WT and WTG were lower by 16.5% and 11.0%, respectively, when compared to C ($p < 0.05$; Table 1). Food intake for the four groups over the 14 days of treatment was similar ($p > 0.05$, Table 1).

The presence of tumor mass in the right flank established the tumor model (Table 1). Cachexia was evidenced by loss of body mass: in the WT group a reduction of $19.33 \pm 3.20\%$ was seen, and in the WTG group $9.67 \pm 2.87\%$, both significantly different ($p < 0.05$).

Brightness intensity (RGB) analysis and 3D surface modeling for ICC-MY and ICC-DMP in the jejunum immunostained with Ano1

When the brightness intensity (RGB) was compared for ICC-MY, no changes were seen between groups C and GC ($p > 0.05$); on the other hand, for ICC-DMP, an increase of 14% was seen ($p < 0.0005$; Figure 1). The Walker 256 tumor (WT) provoked an increase in brightness intensity in ICC-MY and ICC-DMP ($p < 0.05$). Supplementation with L-glutamine (WTG) increased the brightness intensity of ICC-

MY ($p < 0.000008$; Figure 1). The same results were observed in the 3D surface modeling, shown in Figure 2.

Density of ICC-MY and ICC-DMP

The number of ICC-MY decreased by 38% and 36% in the WTG and WT animals compared to C, respectively ($p < 0.05$; Figure 3). For ICC-DMP, density decreased 18% in the WT group compared to C ($p < 0.05$). There was no significant difference in density with L-glutamine supplementation (WTG) compared with the C group ($p > 0.05$; Figure 3).

Space occupancy by ICC-MY and ICC-DMP cellular networks (Ano1-IR) and nNOS-IR neurons

For the space occupancy by ICC-MY, an increase of 9% was observed between groups C and CG ($p < 0.0004$), but in ICC-DMP there was no evidence of change ($p > 0.05$; Figure 4). The Walker 256 tumor (WT) provoked an increase in the space occupancy in ICC-MY and ICC-DMP ($p < 0.05$). Supplementation with L-glutamine (WTG) increased the space occupancy in ICC-MY compared with C ($p < 0.000008$; Figure 4).

The nNOS-IR myenteric neurons occupied less space in the WTG group (11%) compared to C ($p < 0.05$). No differences were found between groups CG and C ($p > 0.05$; Figure 5), which was not the case with the submucosal neurons, where CG increased 8% compared to C ($p < 0.05$). No differences were found between groups C, WT, and WTG ($p > 0.05$; Figure 5).

The double labeling for Ano1/nNOS is shown in Figures 6 and 7. Close contact was observed between the nNOS-IR fibers and ICC-DMP networks, the opposite of what was seen with ICC-MY (Figure 7).

Western Blot

The β -actin, Ano1, and nNOS migrated with a molecular weight band of approximately 42 kDa, 114 kDa, and 160 kDa, respectively (Figure 8). The increase in expression of the Ano1 protein was 80% and 53% in the WT and WTG groups compared to C ($p < 0.05$; Figure 8A). The increase in expression of the nNOS enzyme was 54% and 48% in the WT and WTG groups compared to C ($p < 0.05$; Figure 8B). No differences were found between groups C and CG ($p > 0.05$; Figure 8).

Discussion

The experimental model of the Walker 256 tumor used in this study was established by weight loss, presence of tumor in the flank, and confirmation of the cachectic state in the tumor-bearing animals (WT and WTG). Similar results have been observed under the same experimental conditions.¹³⁻⁴⁷

The cachexia associated with cancer is characterized by a loss of at least 10% of body mass and complex metabolic changes.^{47-54,55} In this study, was caused by increased catabolism, and in the absence of anorexia, because no changes in food intake were observed between the control groups and the tumor groups. The same pattern of development of cachexia has been described by Tisdale (2009).

it was verified that ICC-MY and ICC-DMP, immunostained by Ano1 protein, showed a reduction in density when the WT group (tumor-bearing) was compared with the control. Furthermore, enhanced expression of the Ano1 protein was verified by Western blot analysis, increased brightness intensity, and occupation of space in immunostaining in the WT group compared with group C. The reduced density of ICC can be related to oxidative stress, which is high in this disease.⁴⁴ In diabetes mellitus, a disease that also has a high production of oxygen-reactive species, reduced density of ICC has been reported in the literature.²⁸⁻⁴³ This suggests that these cells are indeed sensitive to oxidative stress.

The reduced density of ICC in the WT group was accompanied by a cellular plasticity evidenced by the various analyses which were performed. This study did not evaluate the proliferation of ICC, however, plasticity was evidenced by maintenance of the network by the cellular projections present in the immunostaining for both ICC-MY and ICC-DMP. The networks formed by the projections of the ICC were maintained and recovered by plasticity, and with elevated expression of the Ano1 protein, hence Ca^{2+} and Cl^- channel activity was maintained and intestinal homeostasis was probably preserved.

Gibbons *et al.* (2009), in experiments with healthy human colon, noted that ICC die by apoptotic mechanisms, but they can continuously regenerate and maintain intact networks. A study evaluating the plasticity of ICC, after acute damage of networks, showed recovery of intestinal function in 5 weeks, not observable restoration of density of ICC.³⁶ Some mechanisms have been related to the plasticity of ICC: a) repair and proliferation by adult ICC;²¹⁻⁴⁵ b) replacement for their precursor cells;⁴¹ c) protection through the heme oxygenase-1 (HO-1);¹⁸⁻⁴⁶ d) signaling

pathways contribute to the survival and proliferation of ICC, including neuron-derived NO.¹⁷

It was shown in space occupancy evaluation and expression by Western blotting that the nNOS enzyme had increased expression, an indicator of greater NO production. It has been reported in the literature that NO is closely related to the survival of ICC, and can act as a cytoprotective molecule.¹⁸ In the experiment, the evidence shows that there was a greater expression of nNOS and the Ano1 protein in the WT group, and we believe that with the increased production of NO, the ICC networks (both the MY type as well as the DMP type) were stimulated to proliferate. A close relationship between the nNOS enzyme and ICC-DMP was shown, and a smaller association with ICC-MY, in line with the study done by Blair *et al.* (2012).

Supplementation with L-glutamine was used in this study, because the cachexia present in the experimental model contributes to changes in amino acid metabolism,³⁹⁻⁴⁹ including glutamine depletion, as reported by Choudry *et al.* (2006). Although tumors have high glutaminase activity, supplementation with L-glutamine did not stimulate tumor growth. It can be inferred that L-glutamine was used other tissues in the host, such as the epithelial cells of the small intestine and muscle tissue.¹²⁻⁶⁴

Supplementation with L-glutamine decreases the rate of degradation and increases protein synthesis in the skeletal muscle and intestinal mucosa, and increased levels in plasma helps in reducing weight loss.⁶⁴ The group supplemented with L-glutamine (WTG) developed cachexia, but significantly less than in the WT group. Another important aspect is the high oxidative stress as a result of cancer,⁵⁵ where neuronal cells,¹⁶⁻³¹ and ICC³⁵⁻⁶³ are susceptible to the deleterious effects of high production of oxygen-reactive species. The antioxidant defense can be

improved by supplementation with L-glutamine, as it has been reported that after supplementing, glutathione levels in the jejunum appear to increase.³⁻⁶⁴

Supplementation with L-glutamine in the WTG group promoted high plasticity. Expression of ICC-MY increased, and cellular plasticity was evidenced in the attempt at spatial rearrangement by the cellular projections to occupy more space. As for ICC-DMP, L-glutamine prevented damage to the density of these cells, restoring them. Additionally, supplementation may be encouraging some response mechanism in the ICC in the absence of disease, corresponding to the increased use of space by ICC-MY and greater brightness intensity in ICC-DMP.

The repair mechanisms of ICC have not been explained, but it is possible to deduce that L-glutamine may be involved in the regulation of Ca^{+2} e Cl^- channels, and nitric oxide can contribute to the restoration of the ICC. The intimate relationship between submucosal nNOS-IR and ICC-DMP can be evidenced by the assays which were conducted and showed the same pattern of responses for both. In conclusion the antioxidant treatment improves the homeostatic imbalance of process induced by cancer, and appears to be contributing to the protection and repair of ICC in Walker-256 tumor model.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação Araucária - PR and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

References

1. Albertini SM, Ruiz, MA. O papel da glutamina na terapia nutricional do transplante de medula óssea. *Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy*. 2001; 23:41-47 (<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842001000100006>).
2. Alves EPB, Alves AMP, Pereira RVF, Miranda-Neto MH, Zanoni JN. Immunohistochemical study of vasoactive intestinal peptide (VIP) enteric neurons in diabetic rats supplemented with L-glutamine. *Nutritional Neuroscience*. 2010;13(1):43-51 (doi: 10.1179 / 147683010X12611460763841).
3. Austgen TR, Dudrick PS, Sitren H, Bland K, Copeland E, Souba WW. The Effects of Glutamine-enriched Total Parenteral Nutrition on Tumor Growth and Host Tissues. *Ann. Surg.* 1992, 107-113.
4. Bayguinov PO, Henning GW, Smith TK. Ca²⁺ imaging of activity in ICC-MY during local mucosal reflexes and the colonic migrating motor complex in the murine large intestine. *The Journal of Physiology*. 2010;588:4453–4474 (doi: 10.1113/jphysiol.2010.196824).
5. Beckett EA, Horiguchi K, Khoyi M, Sanders KM, Ward SM. Loss of enteric motor neurotransmission in the gastric fundus of SI/SI(d) mice. *The Journal of Physiology*. 2002;543:871–87.
6. Biolo G, De Cicco M, Dal Mas V. Response of muscle protein and glutamine kinetics to branched-chain-enriched amino acids in intensive care patients after radical cancer surgery. *Nutrition*. 2006;22:1-8.
7. Blair P, Rhee P-L, Sanders KM, Ward SM. The significance of Interstitial Cells in Neurogastroenterology. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. 2014;20(3): 294-317 (<http://dx.doi.org/10.5056/jnm14060>).
8. Blair P, Bayguinov Y, Sanders KM, Ward SM. Relationship between enteric neurons and interstitial cells in the primate gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2012,24:e437-e449 (doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01975.x).
9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;248-254 (doi: 10.1016 / 0003-2697 (76) 90527-3).
10. Camborová, P; Hubka, P; Sulkava, I; Hulin, I. The pacemaker activity of interstitial cells of Cajal and gastric electrical activity. *Physiological Research*. 2003;52:275–284.
11. Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galletta LJ. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science*. 2008;322:590–594 (doi: 10.1126/science.1163518).

12. Carroll PV, Jackson NC, Russell-Jones DL, Treacher DF, Sonksen PH, Umpleby AM. Combined growth hormone/insulin-like growth factor I in addition to glutamine-supplemented TPN results in net protein anabolism in critical illness. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286: E151–E157.
13. Cassola P, Moreira CC, Liboni TF, Zaia CT, Borba-Murad GR, Bazotte RB, de Souza HM. Changes in blood metabolic parameters during the development of Walker-256 tumour-induced cachexia in rats are not caused by decreased food intake. *Cell Biochem Funct* 2012, 30:265-270 (doi: 10.1002/cbf.2792).
14. Choudry HA, Pan M, Karinch AM, Souba WW. Branched-Chain Amino Acid-Enriched Nutritional Support in Surgical and Cancer Patients. *Journal of Nutrition* 2006,136: S314-S318.
15. Chaudhury A, Miranda-Neto MH, Pereira RVF, Zanoni JN. Myosin Va but not nNOS α is significantly reduced in jejunal musculomotor nerve terminals in diabetes mellitus. *Frontiers in Medicine/Gastroenterology* 2014;1(17) (doi: 10.3389/fmed.2014.00017).
16. Chandrasekharan B, Anitha M, Blatt R, Shahnavaaz N, Kooby D, Staley C, Mwangi S, Jones DP, Sitaraman SV, Srinivasan S. Colonic motor dysfunction in human diabetes is associated with enteric neuronal loss and increased oxidative stress. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23(2): 131–e26 (doi:10.1111/j.1365-2982.2010.01611.x).
17. Choi KM, Gibbons SJ, Roeder JL, Lurken MS, Zhu J, Wouters MM, Miller SM, Szurszewski JH, Farrugia G. Regulation of interstitial cells of Cajal in the mouse gastric body by neuronal nitric oxide. *Neurogastroenterol Motil.* 2007;19:585–595.
18. Choi KM, Gibbons SJ, Nguyen TV, Stoltz GJ, Lurken MS, Ordog T, Szurszewski JH, Farrugia, G. Heme Oxygenase-1 Protects Interstitial Cells of Cajal From Oxidative Stress and Reverses Diabetic Gastroparesis. *Gastroenterology* 2008;135:2055–2064 (doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.003).
19. Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, Corless M, Newsholme P. Molecular mechanisms of glutamine action. *Journal of Cellular Physiology.* 2005;204: 392-401.
20. Espinosa I, Lee CH, Kim MK, Rouse BT, Subramanian S, Montgomery K, Varma S, Corless CL, Heinrich MC, Smith KS, Wang Z, Rubin B, Nielsen TO, Seitz RS, Ross DT, West RB, Cleary ML; van de Rijn M. A novel monoclonal antibody against DOG1 is a sensitive and specific marker for gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol.* 2008;32:210–218
21. Farrugia, G. Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterology and Motility* 2008; 20: 54–63 (doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01109.x).

22. Farrugia G, Lei S, Lin X. A major role for carbon monoxide as an endogenous hyperpolarizing factor in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:67–70.
23. Ferrera L, Caputo A, Ubbly I, Bussani E, Zegarra-Moran O, Ravazzolo R, Pagani F, Galletta LJ. Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry* 2009;284: 33360–33368 (doi: 10.1074/jbc.M109.046607).
24. Gfroerer F, Role U. Interstitial cells of Cajal in the normal human gut and in Hirschsprung disease. *Pediatric Surgery International.* 2013;29:89-97 (doi: 10.1007/s00383-013-3364-y.).
25. Gibbons SJ, Strege PR, Sha L., Roeder JL, Mazzone A., Ou Y., Rich A., Farrugia G. The alpha1H Ca²⁺ channel subunit is expressed in mouse jejunal interstitial cells of Cajal and myocytes. *J . Cell. Mol. Med.* 2009;13(4):422-443 (doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00623.x.).
26. Gibbons SJ, Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol.* 2004;556:25–36 (doi:10.1113/jphysiol.2003.056556).
27. Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Bardsley MR, Lorincz A, Pozo MJ, Pasricha PJ, Van de Rijn M, West RB, Sarr MG, Kendrick ML, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Ordog T; Farrugia G. Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G1370–G1381 (doi: 10.1152/ajpgi.00074.2009).
28. Grover M, Bernard CE, Pasricha PJ, Lurken MS, Fausone-Pellegrini MS, Smyrk TC, Parkman HP, Abell TL, Snape WJ, Hasler WL, McCallum RW, Nguyen L, Koch KL, Calles J, Lee L, Tonascia J, Ünalp-Arida A, Hamilton FA, Farrugia G. Clinical-histological associations in gastroparesis: results from the Gastroparesis Clinical Research Consortium. *Neurogastroenterol Motil.* 2012; 24 (6): 531-9, E249. (doi: 10.1111 / j.1365-2982.2012.01894.x).
29. Guarnier FA, Cecchini AL, Suzukawa AA, Maragno AL, Simão AN, Gomes MD, Cecchini R. Time course of skeletal muscle loss and oxidative stress in rats with Walker 256 solid tumor. *Muscle and Nerve.* 2010;42:950-958 (doi: 10.1002/mus.21798).
30. Hanani M, Farrugia G, Komuro T. Intercellular coupling of interstitial cells of Cajal in the digestive tract. *International Review of Cytology.* 2005;242:249–282.
31. Hermes-Uliana C , Panizzon CP , Trevizan AR , Sehaber CC , FV Ramalho , Martins HA , Zanoni JN. Is L-glutathione more effective than L-glutamine in preventing enteric diabetic neuropathy? *Dig Dis Sci.* 2014, 59 (5): 937-48. (doi: 10.1007 / s10620-013-2993-2).
32. Hirst GDS, Garcia-Londoño AP, Edwards FR. Propagation of slow waves in the guinea-pig gastric antrum. *J Physiol.* 2006;571:165–177

33. Hwang SJ, Blair PJA, Britton FC, O'Driscoll KE, Hennig G, Bayguinov YR, Rock JR, Harfe BD, Sanders KM; Ward SM. Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. *J Physiol* 2009;587:4887–4904 (doi: 10.1113/jphysiol.2009.176198).
34. Iwasaki H, Kajimura M, Osawa S, Kanaoka S, Furuta T, Ikuma M, Hishida A. A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol.* 2006;41:1076–1087.
35. Kashyap P, Farrugia G. Oxidative stress: key player in gastrointestinal complications of diabetes. *Neurogastroenterol Motil.* 2011; 23, 111–114 (doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01659.x.).
36. Klein S, Seidler B, Kettenberger A, Sibaev A, Feil R, Hofmann F, Vanderwinden J-M, Allescher H-D, Schemann M, Storr M A, Schimid R M, Schneider G, Saur D. Interstitial cells of Cajal plasticity rather than regeneration restores slow-wave activity and enteric neurotransmission upon acute damage. *BMC Pharmacology and Toxicology.* 2013, 14(Suppl1):P34.
37. Komuro, T. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Journal of Physiology.* 2006;576:653–658.
38. Lee H-T, Hennig GW, Fleming NW, Keef KD, Spencer NJ, Ward SM, Sanders KM, Smith TK. The mechanism and spread of pacemaker activity through myenteric interstitial cells of Cajal in human small intestine. *Gastroenterology.* 2007;132:1852–1865
39. Lima MMR, Melo MAR, Cury R. Walker 256 tumour growth causes marked changes of glutamine metabolism in rat small intestine. *Cell Biochem Funct.* 2002; 20(2):107-13 (doi: 10.1002/cbf.961).
40. Lino, S, Horiguchi, K. Interstitial Cells of Cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Acta Histochem Cytochem.* 2006;39:145-153.
41. Lorincz A, Redelman D, Horváth VJ, Bardsley MR, Chen R, Ordög T. Progenitors of Interstitial Cells of Cajal in the Postnatal Murine Stomach. *Gastroenterology* 2008;134:1083–1093 (doi: 10.1053/j.gastro.2008.01.036.).
42. Mantovani G, Madeddu C, Macciò A, Gramignano G, Lusso MR, Massa E, Astara G, Serpe R. Cancer-Related Anorexia/Cachexia Syndrome and Oxidative Stress: An Innovative Approach beyond Current Treatment. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2004;13.
43. Mazzone A, Bernard CE, Strege PR, Beyder A, Galletta LJ, Pasricha PJ, Rae JL, Parkman HP, Linden DR, Szurszewski JH, Ördög T, Gibbons SJ, Farrugia G.

Altered expression of Ano1 variants in human diabetic gastroparesis. *J Biol Chem.* 2011;286(15):13393-403 (doi: 10.1074/jbc.M110.196089).

44. Mena S, Ortega A, Estrela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research* 2009, 674:36–44.

45. Mei F, Zhu J, Guo S, Zhou DS, Han J, Yu B, Li SF, Jiang ZY, Xiong CJ. An age-dependent proliferation is involved in the postnatal development of interstitial cells of Cajal in the small intestine of mice. *Histochem Cell Biol.* 2009;131(1):43-53. (doi: 10.1007/s00418-008-0515-7).

46. Mogami S, Suzuki H, Tsugawa H, Fukuhara S, Hibi T. Impaired heme oxygenase-1 induction in the gastric antrum induces disruption of the interstitial cells of Cajal network in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Neurogastroenterol Motil.* 2013, 25, 609-465 (doi: 10.1111/nmo.12122).

47. De Moraes H, Cassola P, Moreira CC, Bôas SK, Borba-Murad GR, Bazotte RB, de Souza HM. Decreased response to cAMP in the glucose and glycogen catabolism in perfused livers of Walker-256 tumor-bearing rats. *Mol Cell Biochem.* 2012, 368:9-16. (doi: 10.1007/s11010-012-1337-4).

48. Oliveira GP, Dias CM, Pelosi P, Rocco PR. Understanding the mechanisms of glutamine action in critically ill patients., *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 2010;82:417-430.

49. Salomão EM, Gomes-Marcondes MCC. Light aerobic physical exercise in combination with leucine and/or glutamine-rich diet can improve the body composition and muscle protein metabolism in young tumor-bearing rats. *J Physiol Biochem* 2012, 68:493-501 (doi: 10.1007/s13105-012-0164-0.).

50. Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:307–343.

51. Schroeder BC, Cheng T, Jan YN; Jan LY. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell.* 2008;134:1019–1029.

52. Sha L, Farrugia G, Harmsen WS, Szurszewski JH. Membrane potential gradient is carbon monoxide-dependent in mouse and human small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293:G438–450.

53. Strege PR, Bernard CE, Ou Y, Gibbons SJ, Farrugia G. Effect of mibefradil on sodium and calcium currents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289:G249–253.

54. Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2:862-871.

55. Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev* 2009;89:381–410 (doi: 10.1152/physrev.00016.2008.).

56. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2007, 39:44-84.
57. Violato NM. Avaliação do estado inflamatório em ilhotas de Langerhans de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Botucatu SP, 2013.
58. Wang XY, Paterson C, Huizinga JD. Cholinergic and nitrergic innervation of ICC-DMP and ICC-IM in the human small intestine. *Neurogastroenterol Motil.* 2009;15:531-43.
59. Ward SM, McLaren GJ, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine. *The Journal of Physiology.* 2006;573:147-159 (doi: 10.1002/1097-0185(20010101)262:1<125::AID-AR1017>3.0.CO;2-I).
60. West RB, Corlles CL, Chen X, Rubin BP, Subramanian S, Montgomery K, Zull S, Ball CA, Nielsen TO, Patel R, Goldblum JR, Brown PO, Heinrich MC, Van de Rijn M. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *American Journal of Pathology.* 2004;165:107-113.
61. Won KJ, Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102:14913-8.
62. Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK; Oh U. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature.* 2008;455,1210-1215 (doi: 10.1038/nature07313).
63. Yarandi SS, Srinivasan S. Diabetic gastrointestinal motility disorders and the role of enteric nervous system: Current status and future directions. *Neurogastroenterol Motil.* 2014; 26, 611-624 (doi: 10.1111/nmo.12330).
64. Yoshida S, Kaibara A, Ishibashi N, Shirouzu K. Glutamine Supplementation in Cancer Patients. *Nutrition* 2001, 17: 766-768.
65. Zhu MH, Kim TW, Ro S, Yan W, Ward SM, Koh SD and Sanders KM. A Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity. *J Physiol.* 2009;587:4905-4918 (doi: 10.1113 / jphysiol.2009.176206).

Table 1. Physiological parameters: final weight (FW) , feed intake (FI) and mass of tumor (MT) of the right flank. Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG).

	C	CG	TW	TWG
FW (g)	298,0±6,7 ^a	286,1±5,2 ^a	248,9±4,9 ^b	265,1±5,6 ^b
FI (g/dia)	23,3±0,6 ^a	22,9±0,4 ^a	21,4±0,6 ^a	21,4±0,4 ^a
MT (g)	-	-	26,8±1,6 ^a	20,9±2,8 ^a

Results were expressed as mean ± standard error. Mean values followed by different letters in the same row are statistically different ($p < 0.05$). n = 7 rats per group.

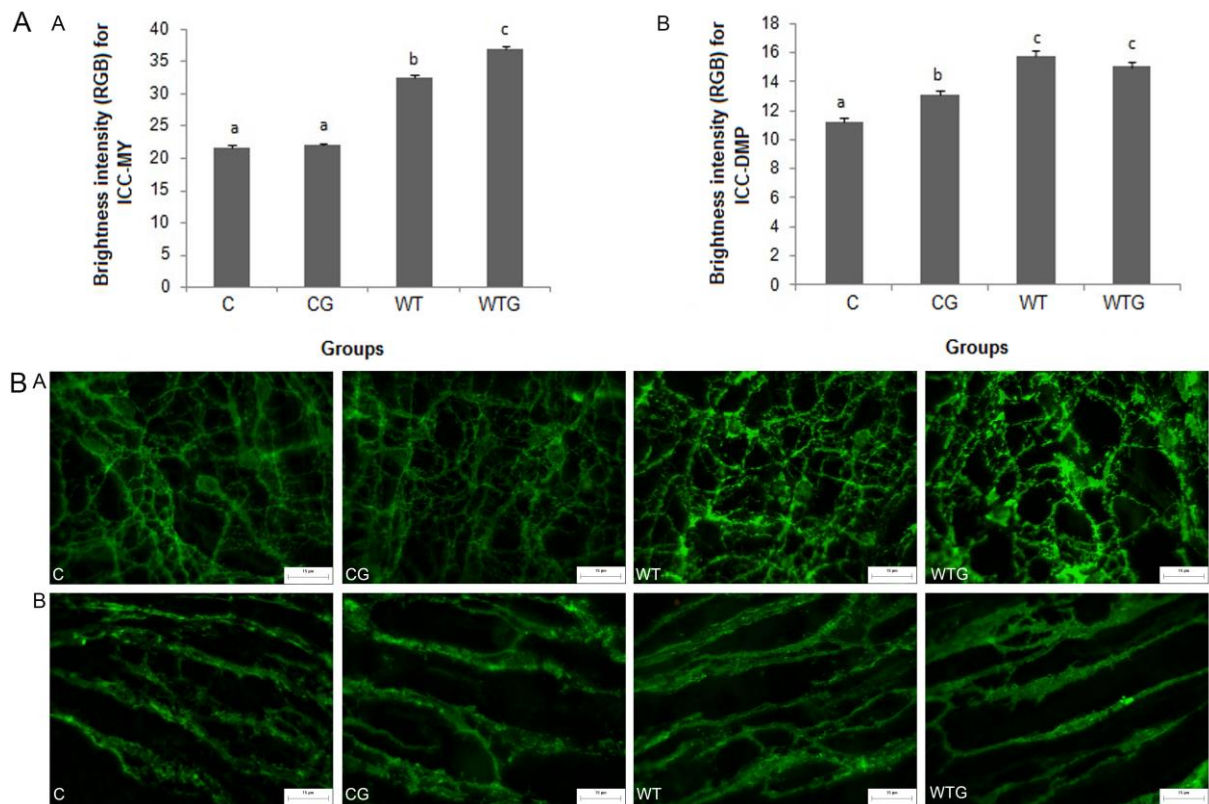


Figure 1A. Brightness intensity (RGB) for ICC-MY (A) and ICC-DMP (B). Results were expressed as mean \pm standard error. Mean values followed by different letters are statistically different ($p < 0.05$). $n = 8$ rats per group. **1B.** Photomicrographs of the whole-mounts of ICC-MY (A) and ICC-DMP (B) immunostained with the An1 protein in rat jejunums. Calibration bar 15 μm . Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG).

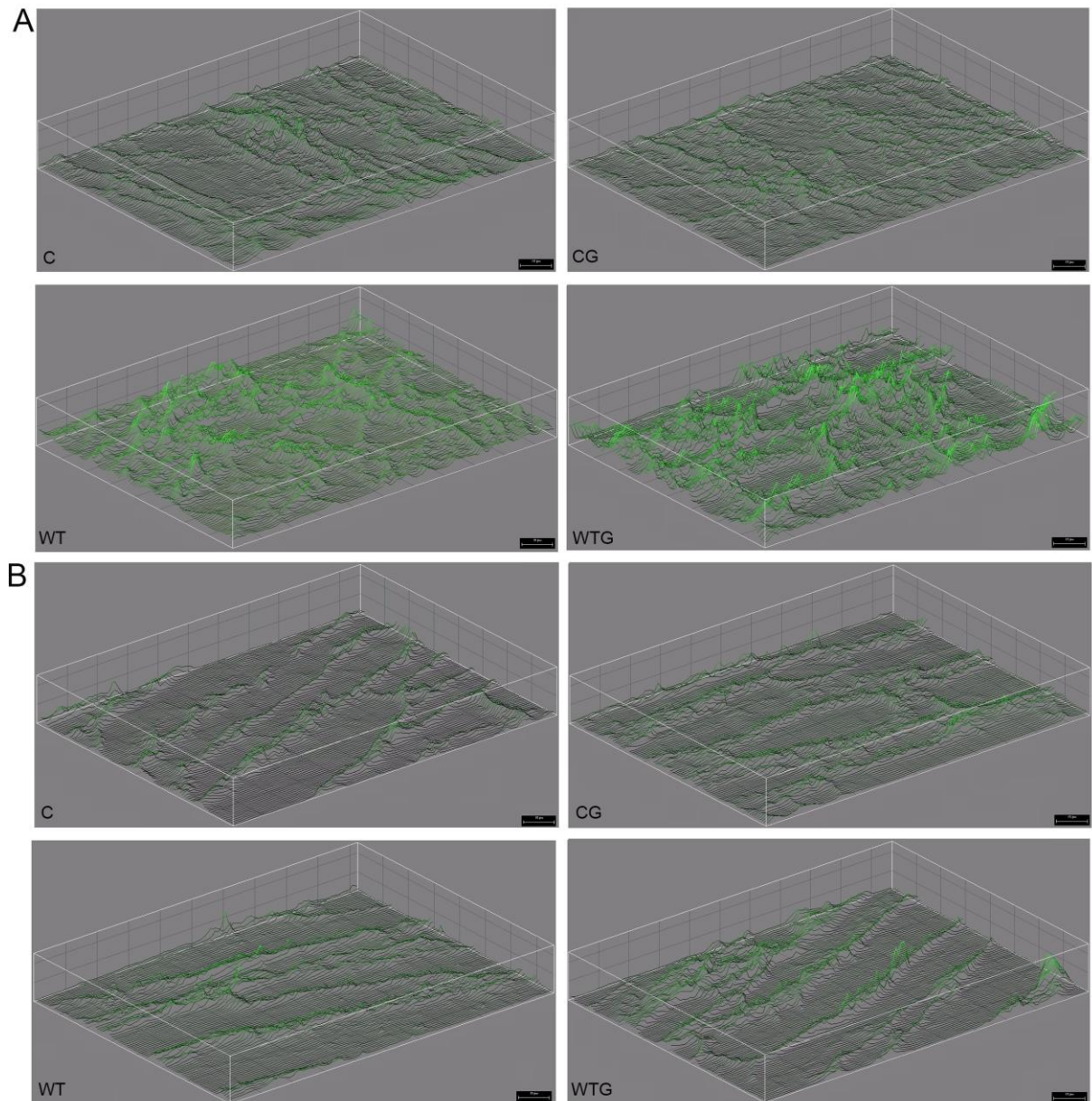


Figure 2. 3D surface modeling representing brightness intensity (RGB) for ICC-MY (A) and ICC-DMP (B). Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG). Calibration bar 15 μm.

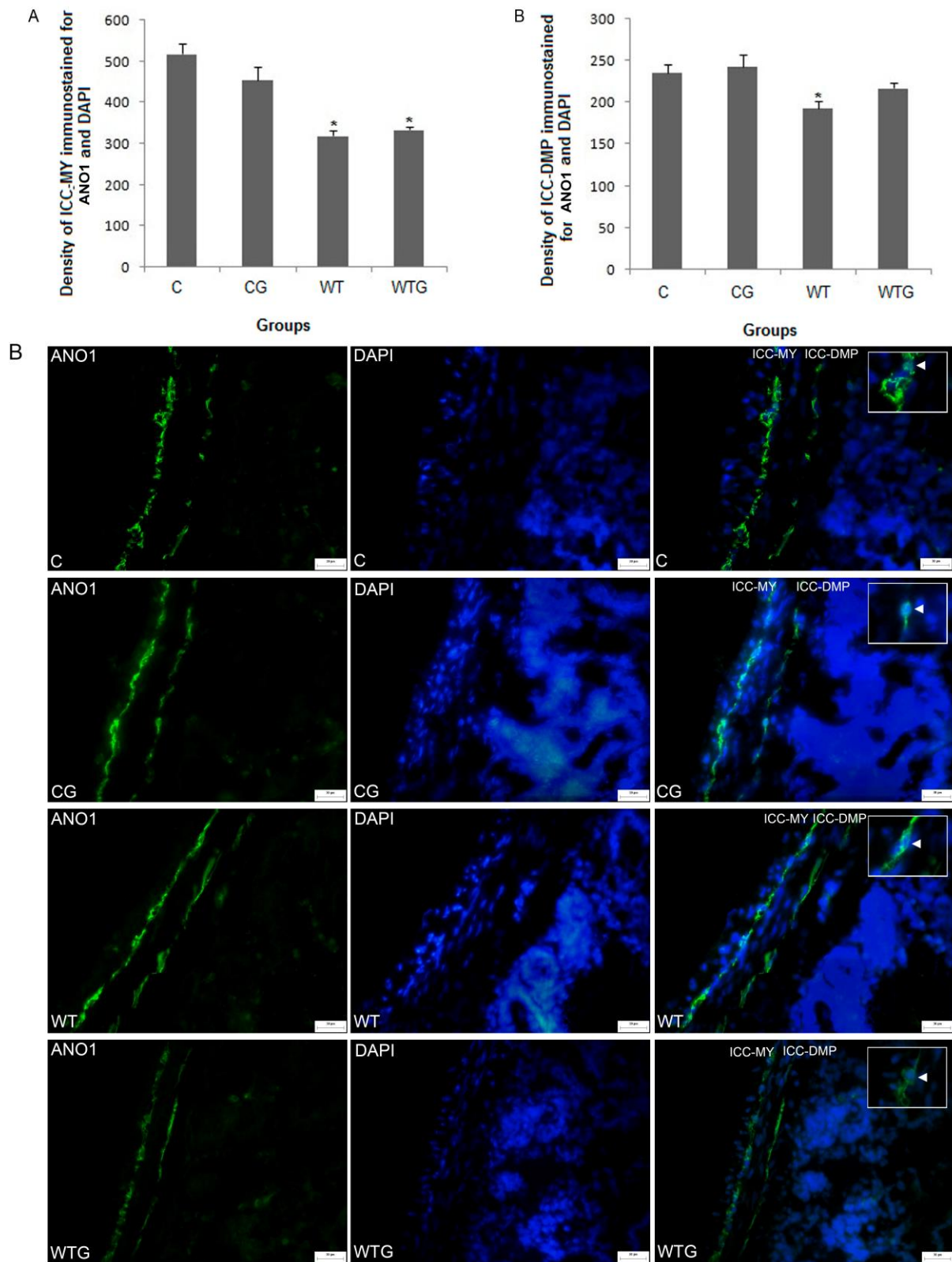


Figure 3A. Density for ICC-MY (A) and ICC-DMP (B). Results were expressed as mean \pm standard error. * $p < 0,05$ when compared to C. $n = 8$ rats per group. **3B.** Photomicrographs of the histological section of ICC-MY and ICC-DMP. The arrows indicate co-localization of ICC/DAPI. Calibration bar 30 μm . Groups: control (C),

control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG).

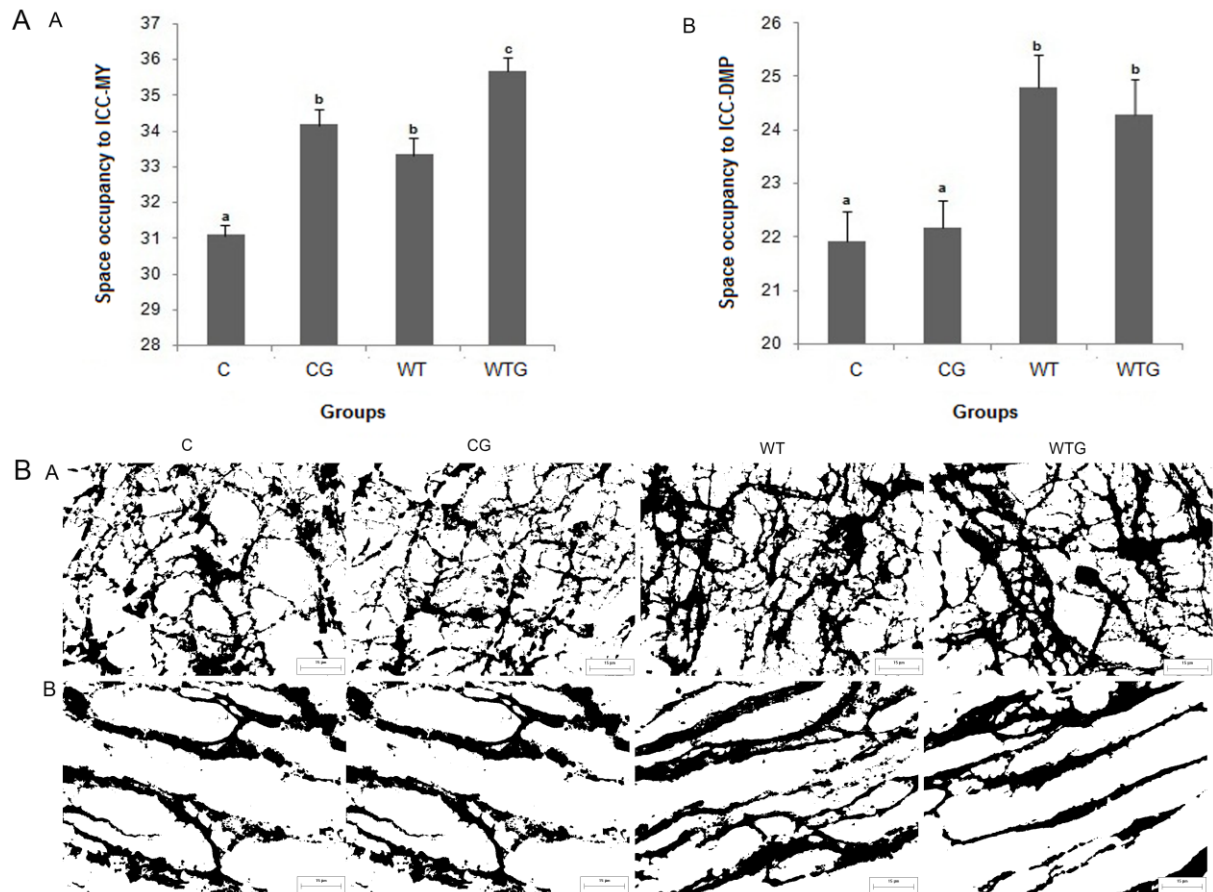


Figure 4A. Space occupancy by the ICC-MY (A) and ICC-DMP (B) cellular networks. Results were expressed as mean \pm standard error. Mean values followed by different letters are statistically different ($p < 0.05$). $n = 8$ rats per group. **4B.** Photomicrographs of whole-mount preparations of ICC-MY (A) and ICC-DMP (B), 16-bit images. Calibration bar 15 μm . Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG).

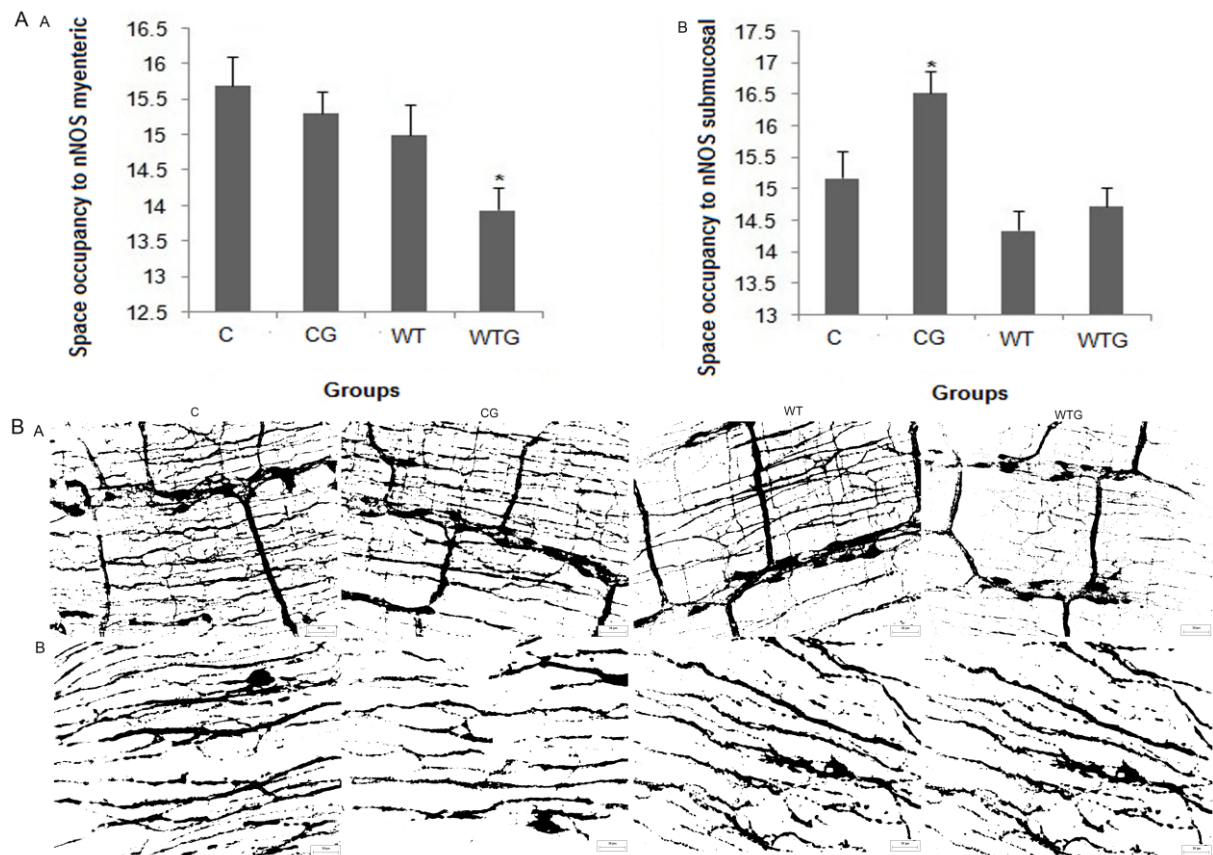


Figure 5A. Space occupancy by the nNOS-IR neurons myenteric (A) and submucosal (B). Results were expressed as mean \pm standard error. $p < 0,05$ when compared to C. $n = 8$ rats per group. **5B.** Photomicrographs of whole-mount preparations of nNOS-IR myenteric (A) and submucosal (B), 16-bit images. Calibration bar 30 μm . Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG).

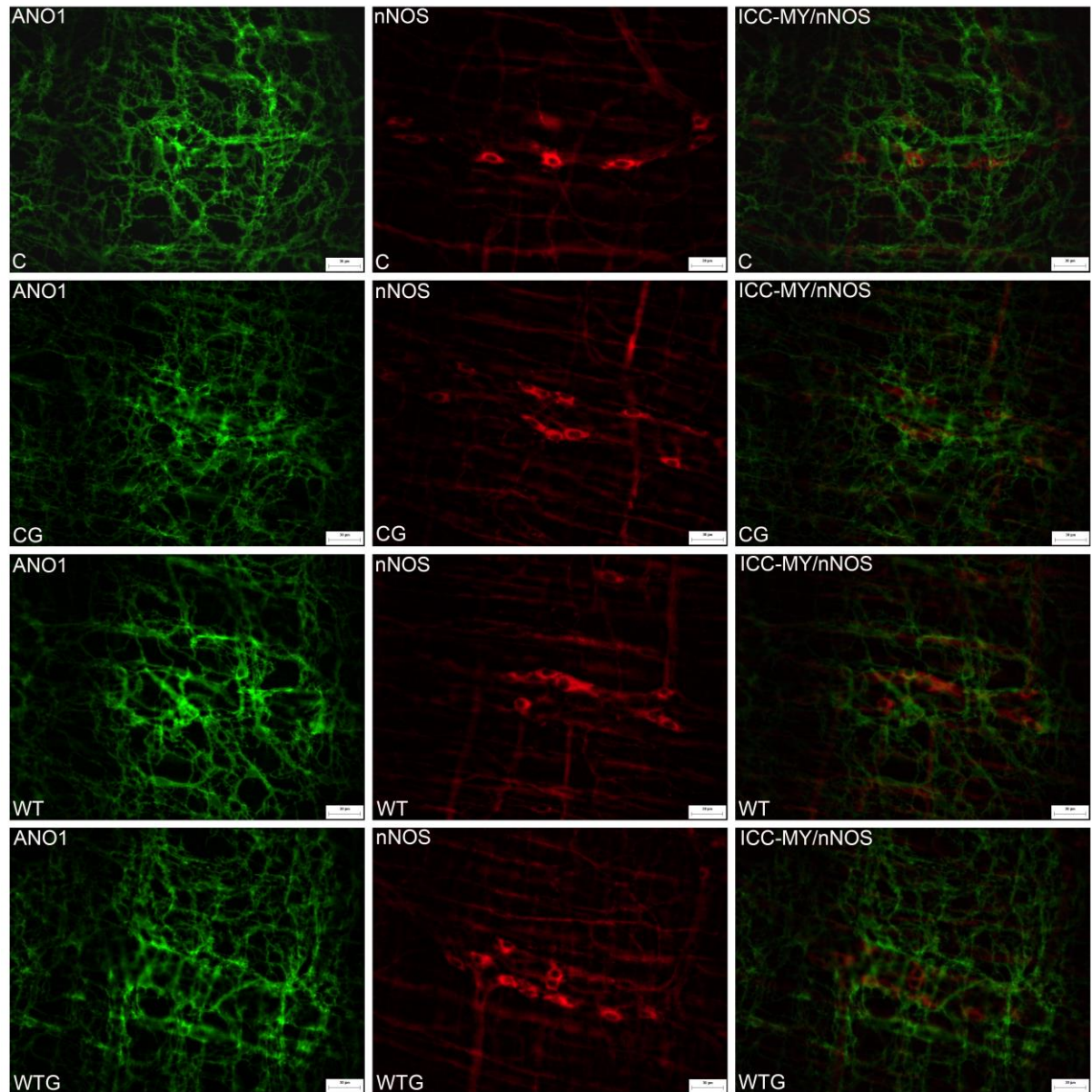


Figure 6. Photomicrographs to Ano1 (ICC-MY), nNOS and ICC-MY/nNOS. Calibration bar 30 µm. Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG).

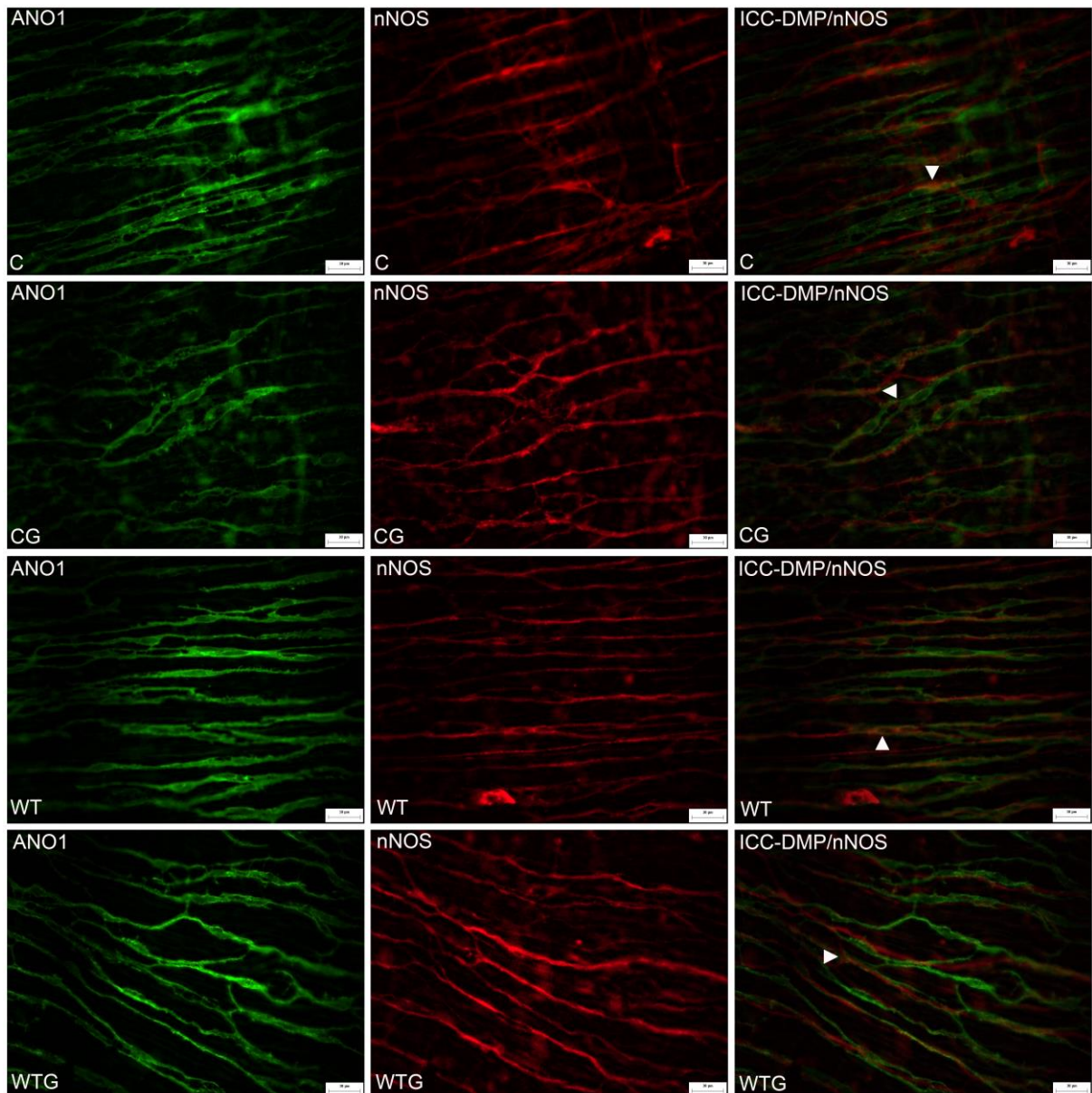


Figure 7. Photomicrographs to Ano1 (ICC-DMP), nNOS and ICC-DMP/nNOS. Arrowheads indicate examples of nNOS-IR nerve fibers and networks of ICC-DMP co-located. *Calibration bar* 30 μm. Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG).

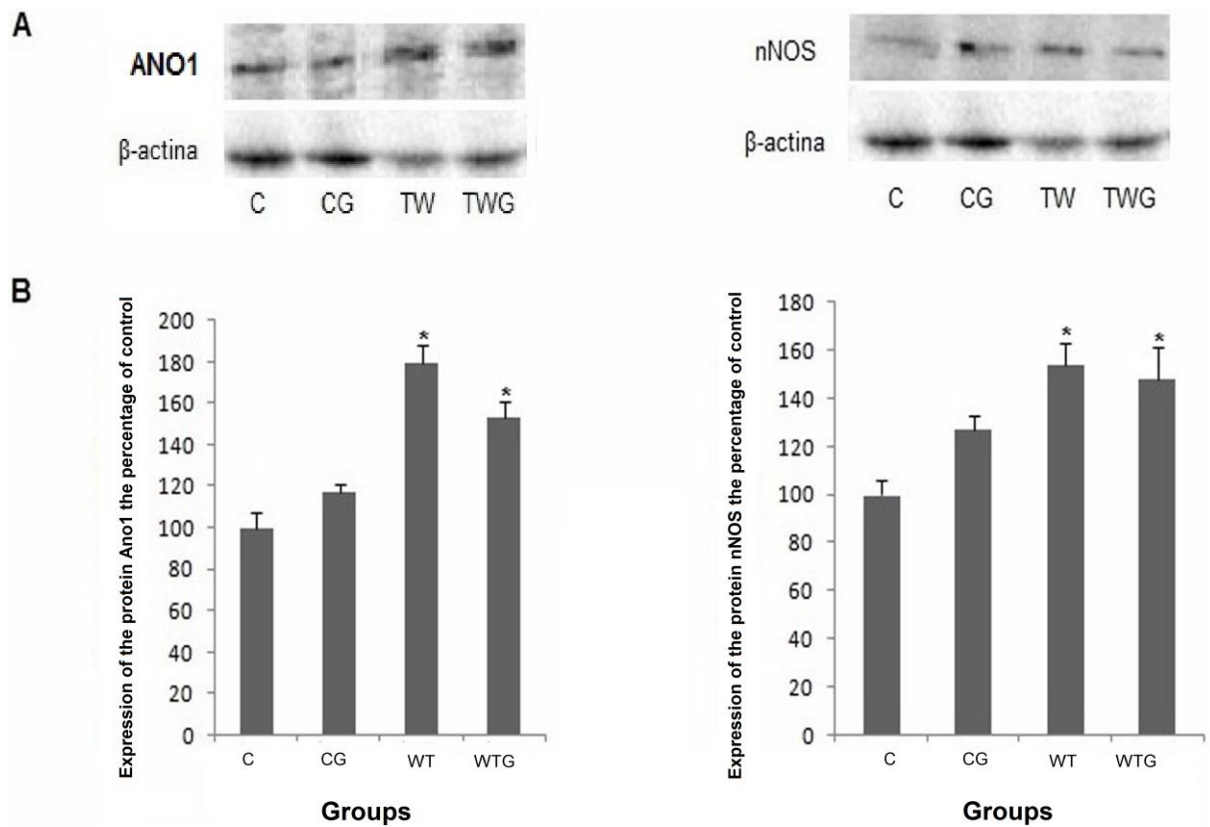


Figure 8A. Immunoblot for Ano1 and nNOS. **8B.** Results expressed by the percentage of the control group. * $p < 0,05$ when compared to C. $n = 4$ rats per group. Groups: control (C), control supplemented with L-glutamine (CG), Walker 256 tumor (WT) and Walker 256 tumor supplemented with L-glutamine (WTG).

ANEXO

Normas do Periódico:

**Neurogastroenterology and
Motility**

Author Guidelines

Effective with the 2014 volume, this journal will be published in an online-only format.

PUBLICATION POLICY

Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere, that all authors (defined below) have read and approved the content, that authors have declared all competing interests and the work has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review.

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions
http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services
http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

Ethics

The Journal's ethical policies are outlined in the separate document Ethical Policies of *Neurogastroenterology & Motility*. Submitted work must comply with this policy, which is based on the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines on good publication and comply with their Code of Conduct.

Please note that the journal employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to the journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

Accepted Articles

Upon acceptance for publication, all authors must complete and submit

- a Conflict of Interests Form (COI)

Authors are responsible for securing (and funding) permission to use any figures or tables previously published. Accepted papers will not be transferred for publication until these permissions are in place.

SUBMISSION

Neurogastroenterology & Motility only accepts submission at <http://mc.manuscriptcentral.com/nmo>. This enables rapid and effective peer review. Contributions will be acknowledged automatically by the editors and assigned a unique manuscript number that must be quoted in correspondence. Papers and Reviews are refereed by experts in the field; the Editors reserve the right to reject an article without review.

Full uploading instructions and support are available online from the submission site via the "Get Help Now" button. Please submit your covering letter or comments to the editor as well as the names of potential referees when prompted online.

Manuscripts that do not meet the formal criteria listed below will be returned for reformatting, which will delay the review process and possible acceptance. Exceptions to these guidelines may be made in certain circumstances, at the discretion of the Editors. If you require an exemption, please indicate this in your cover letter.

Over the past few years, *Neurogastroenterology & Motility* has become one of the leading journals in the field of gastroenterology and related areas of physiology. This is reflected by the steadily increasing number of high-quality manuscripts submitted to the Journal. The length of a manuscript needs to be closely adhered to, with any additional material to be published as supporting information. Authors need not pay for the publication of figures in colour.

Manuscripts that do not meet these formal criteria will be returned for reformatting, which will delay the review process and possible acceptance.

Article types

Original Articles

Original Articles describe the results of basic or clinical studies, clinical trials or significant **Case Reports**. The length of an Original Article should be no longer

than **5000** words, excluding acknowledgements and disclosures, references, tables, figures, table legends and figure legends, and to limit the number of figures and tables to a maximum of eight in the regular edition of the Journal (e.g. five figures and three tables) in normal circumstances, with any additional material to be published as supporting information.

We work together with Wiley's open access journal, *Clinical Case Reports*, to enable rapid publication of good quality case reports that we are unable to accept for publication in our journal. Authors of case reports rejected by our journal will be offered the option of having their case report, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by the *Clinical Case Reports* editorial team. Authors will not need to reformat or rewrite their manuscript at this stage, and publication decisions will be made a short time after the transfer takes place. *Clinical Case Reports* will consider case reports from every clinical discipline and may include clinical images or clinical videos. *Clinical Case Reports* is an open access journal, and article publication fees apply. For more information please go to www.clinicalcasesjournal.com.

Review Articles

Topical reviews of basic or clinical areas are commissioned by the Reviews Editor. Review Articles are focused topical accounts that highlight new and/or controversial areas. Manuscript length is limited to **5000** words. All Review articles are subject to review by experienced referees. The Journal welcomes un-solicited Reviews, but the Reviews Editor reserves the right to reject these without formal review. As Reviews are commissioned by the Editors far in advance of publication, if you wish to submit a non-commissioned review please contact the Reviews Editor Gary Mawe for consideration.

Hot Topics

Manuscripts submitted for the "Hot Topics" section should be no more than **1500** words in total and include only one figure. They will be reviewed and accepted by the Editors on the basis of their outstanding scientific value and the presentation of novel insights into neural control on gut functions in health or disease. "Hot Topics" articles will be only accepted with minor changes. Publication will be in the next available issue with the aim to publish the manuscript about two months after submission. The Editors reserve the right to reject manuscripts without formal review. Rejection for inclusion in the "Hot Topics" section does not disqualify manuscripts for resubmission as an Original Article.

Letters to the Editor

Letters to the Editor offer opinions on papers published in *Neurogastroenterology & Motility*. Text should not exceed **400** words. Letters commenting on papers are sent to the authors of those papers for a response. Letters are selected for their importance, relevance, and originality; not all letters submitted can be published.

Technical Notes

Technical Notes papers are restricted to a maximum of **1500** words. The manuscript

should focus on technique, validation of the technique, and include relevant references and up to two figures.

Book Reviews

Neurogastroenterology & Motility does not publish Book Reviews.

Revisions

To make it easier for re-review, we encourage authors to make the revisions in their manuscript using a colored font (blue or red) and/or a colored highlighter (yellow). They should also provide a point by point response to the editor of the changes that were made in a letter that describes the requested change and the responses.

The editors have designated three types of revision for manuscripts in the Journal: (i) Minor revisions: these in general require only changes to the manuscript or easily conducted experiments. Revised manuscripts must be submitted in their final form no later than four weeks of receipt of a revision letter from the Editor. (ii) Major revisions: these require changes to the manuscript and significant additional experiments. Revised manuscripts must be submitted in their final form within three months of receipt of a revision letter from the editor.

In all cases, resubmissions after the allotted time will be considered as new submissions.

Language

Please note that the Journal uses American spelling (e.g. 'esophagus', not 'oesophagus'). Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication. Authors of manuscripts with a poor standard of English will be directed towards the abovementioned editing services.

PRESENTATION

Acceptable file formats

Text: Manuscript should be submitted as one text file in either Word document (.doc), or RTF (.rtf). Manuscripts submitted as PDF (.pdf) will be rejected and delay the submission process.

Tables: Should form an integral part of the text file. Tables submitted as photographs or graphics will be rejected and delay the submission process.

Figures for review: Must be uploaded separately.

Figures for publication: On acceptance, you will be required to upload high resolution graphics files. Unlabelled micrographs (tone) should be supplied as TIFF (.tif), and will not be accepted as PDF (.pdf) format. Labelled micrographs

(combination) or charts/ graphs/ diagrams (line) must be supplied as PDF (.pdf) or as EPS (.eps) format and created in vector based software.

Text

Manuscripts should be typed in a standard, easy to read font, either 11 or 12pt in size. Manuscripts should be double-spaced, with 2.5cm (1 inch) margins on all sides and run in one single column. Please ensure that you have turned “track changes off” and removed any reviewing notes from your manuscripts else these will be visible throughout the review process. Place the page number and first author's last name in the upper right-hand corner of each page.

Review articles should be divided onto the following sections and appear in the following order: (1) title page (with short running page heading, title, authors names and affiliations), (2) abstract and keywords, (3) body of the article, (4) acknowledgments, funding, and disclosures; (5) references, (6) tables, (7) figure legends, and (8) figures.

Original articles should be divided into the following sections and appear in the following order: (1) title page (with short running page heading, title, authors names and affiliations) (2) abstract and keywords, (3) introduction, (4) materials and methods, (5) results, (6) discussion, (7) acknowledgments, funding, and disclosures, (8) references, (9) appendices, (10) supporting information, (11) tables, (12) figure legends, and (13) figures.

Title Page

On the title page, provide the complete title and a running title (not to exceed 45 characters and spaces). List each contributor's name and institutional affiliation. Provide the name, postal and e-mail address, fax and telephone number of the contributor responsible for the manuscript and proofs. This is the person to whom all correspondence and reprints will be sent. The corresponding author is responsible for keeping the editorial office updated with any change in details until the paper is published.

Abstract and Keywords

The abstract must not exceed 250 words. It should summarize the aim of the study and describe the work undertaken, results and conclusions. For Original Articles and Technical Notes, the abstract should be structured under four subheadings: **Background, Methods, Key Results and Conclusions & Inferences**. For Review Articles, the abstract should be structured under **Background and Purpose**. For Mini-review editorials, “Hot Topics” and Case Reports, the abstract should be unstructured, i.e. without the subheadings. In addition, you should list up to six keywords in alphabetical order. For ideas on optimising your abstract, see [here](#).

Key Messages

Key Messages are required for the following articles: Hot Topics, Original Articles, Reviews, and Technical Notes.

Your Key Messages must include the following:

- A general statement briefly describing the main conclusion/take home message of your paper - why it is important.
- The aims/goals of the research undertaken.

- The basic methodology of your study (e.g. "The bowel tissue from 26 mice were used for this study. XX software was used for YY.").
- 1 to 2 sentences briefly summarizing the Results section.

A key message box will added to your paper on publication.

Introduction

This section should not exceed more than 500 words and should not have a separate heading. The Introduction should briefly discuss the objectives of the study and provide the background information to explain why the study was undertaken, and what hypotheses were tested.

Materials and methods

Animal preparation and experimentation should cite the approving governing body. Equipment and apparatus should cite the make and model number and the company name and address (town, state/city, country) at first mention.

Give all measurements in metric units and use negative indexing (mg mL^{-1} , not mg/mL). Use generic names of drugs. Symbols, units and abbreviations should be expressed as Système International (SI) units. In exceptional circumstances, others may be used, provided they are consistent. If necessary, please contact the editorial office for further advice.

Results

Tables and text should not duplicate each other.

Discussion

This section should not exceed more than 1500 words and should be concise. The Discussion should include a brief statement of the principal findings, a discussion of the validity of the observations, a discussion of the findings in light of other published work dealing with the same or closely related subjects, and a statement of the possible significance of the work. Authors are encouraged to conclude with a brief paragraph that highlights the main findings of the study.

Acknowledgments, Funding, and Disclosures

It is the duty of authors to acknowledge funding sources, technical assistance, provision of materials or reagents and other matters that relevant to the paper. Authors must acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research. If the work was sponsored by an organization, charity or industry, it is essential this be declared and, in the case of industry-sponsored research, the authors need to indicate that they had complete access to the data that supports the publication. If the paper was written by a professional medical writer, this must be disclosed and follow the Ethical Policies of *Neurogastroenterology & Motility*. The Journal insists that authors disclose their contributions to the work described in the submitted manuscript. Some examples include:

- AB performed the research
- CD designed the research study
- EF contributed essential reagents or tools

- GH analyzed the data
- IJ wrote the paper.

An author may list more than one contribution, and more than one author may have contributed to the same element of the work.

Example:

- AB performed the research; AB & CD analyzed the data and wrote the paper; EF contributed the knockout mice for the study and GH designed the research study and wrote the paper.

All sources of funding must be disclosed clearly and in full via a Funding Statement. This statement will be published in the Funding section of the paper (please see further information on NIH funding below). List governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources of funding used for the studies described in the manuscript. Attribution of these funding sources is preferred. Please indicate "No funding declared" if no funding is associated with the paper.

Examples:

- This work was supported by a grant from the National Institutes of Health, USA (DKxxxx to AB).
- This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (grant to AB and CD).
- This work was supported by a grant from Big Pharma Inc. (to AB) and equipment was donated by Small Pharma Inc. EF received a graduate studentship award from the University of xxxxx.

The Journal insists on full disclosure of competing financial and other interests from all authors. This is mandatory and a condition of publication. At the end of the acknowledgments section, there must to be a statement of these interests or the following statement: "No competing interests declared". Authors are also required to submit a Conflicts of Interests (COI) form upon acceptance (see Supporting Documents).

References

The reference style is Vancouver (numbered). References must be numbered consecutively and cited in the text using Arabic numerals within parentheses. The reference list should conform to the style used by the National Library of Medicine and Index Medicus. Work that has not been accepted for publication should not appear in the reference list. It may be cited in the text as unpublished data.

Journals: List all authors when eight or fewer; when nine or more, list only the first eight and add et al. Journal titles should be cited in full:

Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Bolling-Sternevald E, Vieth M, Stolte *Met al.* Prevalence of Barrett's esophagus in the general population: an endoscopic study. *Gastroenterology* 2005; **129**:1825–31.

Online Articles: The Journal encourages citation of online articles before they are published in final form when they become available in PubMed or from journal/publisher websites, e.g. Early View articles from the *Neurogastroenterology & Motility* website. The citation must take the following form:

Eyden B, Curry A, Wang G. Stromal cells in the human gut show ultrastructural features of fibroblasts and smooth muscle cells but not myofibroblasts. *J Cell Mol Med* 2010; in press (doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01132.x)

Once an article appears in the digital environment, it is assigned a unique Digital Object Identifier (DOI), and adding this ensures the article can be found through PubMed.

Any article that lacks a year of publication or a DOI will not be considered a valid reference citation and cannot be cited.

Books and Monographs: Personal author - Bateson M, Bouchier I. Clinical Investigation and Function, 2nd edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1981.

Corporate author - The Geological Society. List of serial publications held in the library of the Geological Society, London. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1987.

Editor, Compiler, Chairman as author - Booth CC, Neal AB, eds. Disorders of the Small Intestine. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1985.

Chapter in book - Morson BC, Dawson IMP. Mechanical disorders In: Morson BC, Dawson IMP, eds. Gastrointestinal Pathology, 2nd edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1979: 267-71.

Abbreviations

Include in the manuscript a list of new or special abbreviations along with the spelled out form or definition. For commonly accepted abbreviations, word usage, symbols, etc., authors are referred to the CBE Style Manual published by the American Institute of Biological Sciences or Units, Symbols and Abbreviations published by the Royal Society of Medicine. The abbreviations should be derived from the American spelling convention [e.g. 'TLESR' (American: esophagus), not 'TLOS R' (British: oesophagus)].

Tables

Tables should be numbered consecutively within the text. Tables and text should not duplicate each other. If possible, hold tables to one standard manuscript page; if the table continues past one page, repeat all column headings and the stub (left-hand column). Explain all abbreviations in a footnote. Provide a number and title for each table. Regardless of authorship or publisher, permission must be received in writing for its use if a table has been previously published. Include an acknowledgment of the original source in a footnote. Tables should not be submitted as photographs or graphics files.

Figures

Labelling should be in 8pt Helvetica or Arial. Figure sections should be designated with upper case letters. Magnification (scale) bars should be given on electron and light micrographs. Details of the magnification bar should be noted in the figure legends. Guidance on the preparation and submission of figures, links to useful websites and access to both the Wiley house and journal-specific style guides can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/author.asp>.

Manipulation of images

The Journal follows the guidelines and procedures established by the Council of Science Editors for digital imaging data. Please note the following in particular:

- Images cannot be modified to change the overall appearance or appearance of any specific feature.
- Adjustments of brightness and contrast or colour balance are acceptable but must be applied to the entire image.
- Features cannot be obscured and any rearrangements must be explicitly indicated by the insertion of dividing lines.
- Images will be examined for any indication of improper modifications. The final acceptance of all manuscripts is contingent on any concerns raised in our review of the figures being resolved.

Figure and table legends

Cite all tables and figures in the text, numbering them sequentially as they are cited. Each figure must have a corresponding legend. The legend must be numbered with an Arabic number that corresponds to the illustration as it appears in the text. Each should begin with a short title for the figure. Legends to tables (where necessary) and figures should contain sufficient information to be understood without reference to the text. Explain all symbols, arrows, numbers, or letters used in the figure and provide information on scale and/or magnification. For photomicrographs, include information on the method of staining or preparation.

Supporting Information

Quantitative or qualitative data too extensive for inclusion in the regular edition of the Journal may be presented as supporting information. It must be included as part of the original submission and will be reviewed as an integral part of the paper. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript, to appear after the references at the end of the paper, providing titles of figures, tables, etc. formatted as if the material was to appear in the print edition. We welcome audio and video material, if relevant to your paper. Full details on how to submit supporting information, including videos, can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>.

SUPPORTING DOCUMENTS

The Conflict of Interests (COI) form must accompany your accepted manuscript and is a condition of publication. It is available for download from the *Neurogastroenterology* & *Motility* submission site at <http://mc.manuscriptcentral.com/nmo>. It can either be uploaded as a supporting document to your manuscript (preferred), or where this is not possible, e-mailed to the journal managing editor Mrs. Maggy Barber at maggy.barber@gmail.com.

Conflict of Interests (COI) Form

Authors are required to disclose financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding, etc.) in any company or institution that might benefit from their publication. All authors must provide details of any other potential competing interests of a personal nature that readers or editors

might consider relevant to their publication. Upon acceptance for publication, all authors must complete the Conflicts of Interests (COI) form.

POST ACCEPTANCE

NIH-Funded Articles and Open Access

Authors can continue to publish in the journal safe in the knowledge that they will be compliant with the NIH mandate, which applies to all articles based on research that has been wholly or partially funded by the NIH that have been accepted for publication on or after 7 April 2008. The accepted version of these articles will be deposited into PubMed Central upon acceptance by the journal. There will be an embargo period of 12 months. The accepted version is the version that incorporates all amendments made during peer review, but prior to the publisher's copy editing and typesetting. The publisher will deposit the accepted version on the author's behalf.

Authors should ensure that they **clearly** mark their research as funded by the NIH (or other funding body) via a Funding statement, which is published at the end of their article. If it is not clearly labelled as funded, this could affect the archiving process.

Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. See the full list of terms and conditions.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website here. Prior to acceptance, there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Article Tracking

Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit http://authorservices.wiley.com/bauthor/tracking_production.asp for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Proofs

Proofs will be available as a PDF to download from the e-proofing website. Full instructions will be sent via e-mail notification when the proof is ready for review. Adobe Acrobat Reader is required in order to read this file, which can be downloaded (free of charge) from <http://get.adobe.com/reader>.

In your absence, please arrange for a named colleague to correct on your behalf. Major alterations will be charged to the author and could delay publication.

Proofs must be returned by fax/email only to the proof collator within three days of receipt of the e-proofing notification e-mail. We will not accept proofs by snail-mail, and any late return of proofs will lead to delayed publication of your paper to avoid any delay in publication of an issue. Authors will receive one set of proofs only. Please check these carefully.

Offprints

A PDF is provided upon publication to the corresponding author. Paper offprints can be purchased upon print publication [here](#).

Archiving Policy

Unless specifically requested at submission, the publisher will dispose of all material submitted 2 months post publication.