

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CAMILA QUAGLIO NEVES

**EFEITO DO ÁCIDO ALFA LIPOICO SOBRE O ÍLEO DE RATOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL**

Maringá

2018

CAMILA QUAGLIO NEVES

**EFEITO DO ÁCIDO ALFA LIPOICO SOBRE O ÍLEO DE RATOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção de grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Nilza Cristina Buttow

Maringá

2018

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

N518e Neves, Camila Quaglio
Efeito do ácido alfa lipoico sobre o íleo de ratos submetidos à isquemia a reperfusão intestinal / Camila Quaglio Neves. -- Maringá, PR, 2018.
40 f.: il. col.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nilza Cristina Buttow.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2018.

1. Isquemia intestinal. 2. Reperfusão intestinal. 3. Estresse oxidativo. 4. Sistema nervoso entérico. I. Buttow, Nilza Cristina, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDD 23.ed. 573.3

Márcia Regina Paiva de Brito – CRB-9/1267

BIOGRAFIA

CAMILA QUAGLIO NEVES nasceu em Maringá/PR em 18/11/1993. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (2016). Tem experiência na área de morfologia, atuando principalmente sobre histologia do intestino e Sistema Nervoso Entérico de ratos com aplicação em patologias como diabetes e isquemia e reperfusão intestinal e tratamentos com substâncias antioxidantes.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por um artigo científico intitulado “EFEITO DO ÁCIDO ALFA LIPOICO SOBRE O ÍLEO DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL” que relaciona os efeitos da isquemia de 45 minutos seguida de reperfusão intestinal de 24 horas sobre o íleo de ratos tratados com o antioxidante ácido alfa lipoico. Em consonância com as regras do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, o artigo foi redigido de acordo com as normas da revista “Journal of Gastroenterology” que tem como FI 4,493 e como qualificação de extrato A2 de acordo com o Comitê de Ciências Biológicas I, CBI, CAPES.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO: Isquemia e reperfusão (IR) intestinal pode ser resultado de diversas condições clínicas incluindo trauma, hemorragia e transplante de intestino. Na isquemia, a interrupção do fluxo sanguíneo e a hipóxia, causam rapidamente alterações fisiológicas que se agravam para morte tecidual. Na reperfusão, o retorno do oxigênio leva a reações que produzem espécies reativas de oxigênio e favorecem o estabelecimento do estresse oxidativo. As defesas antioxidantes naturais do organismo não são suficientes para combater o estresse oxidativo gerado durante IR intestinal. O ácido alfa lipóico (AAL) por sua ação antioxidante e neuroprotetora, é candidato para o tratamento dos danos causados por IR intestinal. **OBJETIVO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com AAL sobre o íleo de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal. **MÉTODOS:** Os ratos foram submetidos à isquemia intestinal pela oclusão da artéria mesentérica superior por 45 minutos e reperfusão de 24 horas. O tratamento com AAL foi realizado via gavagem na dose de 100mg/kg de peso corporal diluído em óleo de milho. Os grupos *sham* passaram pela cirurgia, mas não sofreram isquemia intestinal. Foram realizadas análises de marcadores de estresse oxidativo e inflamação da parede intestinal, morfometria da parede e avaliação de neurônios e células gliais mientéricas do íleo dos animais. **RESULTADOS:** IR intestinal causou alterações na subpopulação nitrérgica e células gliais GFAP+ e aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase e mieloperoxidase e dos níveis de óxido nítrico. O tratamento com AAL foi eficiente contra as alterações gliais e da atividade da superóxido dismutase. **CONCLUSÃO:** O tratamento com 100 mg/kg de peso corporal de AAL foi capaz de amenizar alterações no estresse oxidativo e nos neurônios nitrérgicos e células gliais que foram causadas por isquemia de 45 minutos seguida de reperfusão de 24 horas.

PALAVRAS-CHAVE: hipóxia, estresse oxidativo, antioxidante, sistema nervoso entérico

ABSTRACT

INTRODUCTION: Intestinal ischemia/reperfusion (IR) injury as consequence of many clinical conditions, include intestinal transplantation. During the ischemia, the interruption of blood flow and the hypoxia, induce metabolic changes and cell death. During the reperfusion, the restore of oxygen lead to generation of reactive oxygen species and establishment of oxidative stress. Alpha lipoic acid (ALA) has antioxidant activity and is a candidate to treatment on the injury induced by intestinal IR. **AIMS:** The aim of the present study was assess the intestinal IR injury effects and the ALA treatment effects about the rat ileum. **METHODS:** Male rats were submitted to intestinal IR by occlusion of superior mesenteric artery for 45 minutes and the reperfusion period was 24 hours. The treatment was performed by gavage with 100 mg/kg of ALA. The groups Sham was submitted of surgery but without occlusion of superior mesenteric artery. Oxidative stress, intestinal wall inflammation, histological and analyses of neurons and glial cells were performed in the rat ileum. **RESULTS:** Intestinal IR induce changes in nitrergic neurons (nNOS+) and glial cells (S100+), increase of superoxide dismutase, myeloperoxidase and nitric oxide levels. ALA treatment was effective against glial injury and oxidative stress. **CONCLUSION:** The treatment with 100mg/kg of body weight of AAL was able to reduce alterations in oxidative stress and in nitrergic neurons and glial cells that was consequence of 45 minutes of ischemia followed by reperfusion of 24 hours.

KEY WORDS: oxidative stress, hypoxia, antioxidant, enteric nervous system

EFEITO DO ÁCIDO ALFA LIPOICO SOBRE O ÍLEO DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

RESUMO

Introdução: Isquemia e reperfusão (IR) intestinal pode ser resultado de diversas condições clínicas incluindo transplante de intestino. Na isquemia, a interrupção do fluxo sanguíneo e a hipóxia, causam rapidamente alterações fisiológicas que se agravam para morte tecidual. Na reperfusão, o retorno do oxigênio leva a reações que favorecem o estresse oxidativo. O ácido alfa lipoico (AAL) por sua ação antioxidante, é candidato para o tratamento dos danos causados por IR intestinal. Portanto, o objetivo foi avaliar os efeitos do tratamento com AAL sobre o íleo de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal. *Métodos:* Ratos foram submetidos à isquemia intestinal pela oclusão da artéria mesentérica superior por 45 minutos seguida de reperfusão de 24 horas. O tratamento com AAL foi realizado via gavagem na dose de 100mg/kg de peso corporal. Os grupos *sham* passaram pela cirurgia, mas não sofreram isquemia intestinal. Foram realizadas análises de marcadores de estresse oxidativo e inflamação da parede intestinal, morfometria da parede e avaliação de neurônios e células gliais mientéricas do íleo dos animais. *Resultados:* IR intestinal causou alterações na subpopulação nitrérgica e células gliais GFAP+ e aumento dos níveis de superóxido dismutase, mieloperoxidase e óxido nítrico. O tratamento com AAL amenizou as alterações gliais e de estresse oxidativo. *Conclusão:* O tratamento com 100 mg/kg de peso corporal de ácido alfa lipoico foi capaz de amenizar alterações de estresse oxidativo e nos neurônios nitrérgicos e células gliais que foram causadas por isquemia de 45 minutos seguida de reperfusão de 24 horas.

Palavras-chave: hipóxia, antioxidante, sistema nervoso entérico

INTRODUÇÃO

Isquemia e reperfusão (IR) intestinal é uma emergência clínica com risco para a vida [1] que pode ser resultado de trauma, embolia, trombose venosa, doenças inflamatórias, dano por radiação [2], hipovolemia, hemorragia e transplantes [3]. A isquemia é caracterizada pela interrupção do suprimento sanguíneo que chega ao tecido, causando rapidamente alterações fisiológicas [1]. Quanto maior o tempo de isquemia, mais severo é o dano causado por ela, podendo resultar em morte tecidual [4]. Sendo assim, a restauração do fluxo sanguíneo é necessária para manter a função celular, mas a reperfusão inicia cascatas de respostas que levam ao dano tecidual adicional [1]. Portanto, a reperfusão causa mais injúria do que somente a isquemia [5].

Durante a isquemia, a hipóxia limita a produção de ATP e faz com que ele seja catabolizado para a produção de hipoxantina. Ao mesmo tempo, a conversão de xantina desidrogenase em xantina oxidase é favorecida [4,5]. A depleção do ATP resulta na perda da regulação de canais iônicos dependentes de ATP da membrana celular, promovendo a entrada de Na^+ , Ca^{2+} e H_2O [3] e a saída de K^+ e Mg^{2+} [6]. Na reperfusão, a restauração do fluxo sanguíneo promove a reintrodução do oxigênio, que reage com hipoxantina e xantina dando origem a espécies reativas de oxigênio (EROs) [3,4].

O organismo possui defesas antioxidantes naturais, mas que são insuficientes para proteger o tecido da produção exagerada de EROs e dos danos causados por eles [6] tendo em vista que em 3 horas de reperfusão já é possível observar alteração nos parâmetros de estresse oxidativo [7]. Por isso, substâncias com efeito antioxidante têm sido utilizadas como tratamento contra o dano causado pela IR intestinal [8-9] inclusive sobre neurônios entéricos [10]. Nesse caso, a injúria pode ser observada precocemente pela apoptose de neurônios a partir de 6 horas de reperfusão no íleo de camundongos após 60 minutos de isquemia [11] e em 24 horas de reperfusão na alteração da densidade de neurônios entéricos e células da glia em ratos que sofreram isquemia de 35 minutos [12]. Além dos neurônios entéricos, alterações na parede intestinal também são observadas após IR intestinal, como dano na camada muscular [13] e na camada mucosa, incluindo destruição das vilosidades [14].

O ácido alfa lipoico (AAL) ou ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico ($\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}_2$), é um composto com ação antioxidante determinada pelo seu anel ditiolano [15]. Derivado do ácido octanóico, tem importante papel no metabolismo energético por ser cofator

para desidrogenases mitocondriais [16]. Apresenta-se nas formas oxidada e reduzida (ácido dihidrolipoico) que formam um potente par redox. Pode agir diretamente como antioxidante reagindo com EROs, indiretamente através da regeneração de outros antioxidantes e também age como quelante sobre metais [15]. O AAL tem sido estudado como tratamento em modelos de isquemia e reperfusão da aorta [17], isquemia cerebral [18], colite ulcerativa [19], contaminação com aflatoxina [20], diabetes [21], entre outros. A dose de 100 mg/kg de peso corporal é utilizada por autores [17, 22] inclusive mostrando que a proteção antioxidante do AAL é dada de maneira dose dependente, com melhores resultados sobre a nefrotoxicidade em ratos nessa dose [23].

Sabe-se que IR intestinal pode afetar o Sistema Nervoso Entérico, mucosa intestinal, permeabilidade e barreira intestinal e estresse oxidativo, e que o AAL demonstra efeito neuroprotetor e antioxidante. Porém, não há estudos sobre os efeitos do tratamento do AAL sobre a isquemia e reperfusão intestinal. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do AAL sobre o estresse oxidativo e inflamação intestinal, sobre os neurônios e células gliais mientéricas e também sobre a morfometria da parede intestinal em ratos que sofreram 45 minutos de isquemia seguida de 24 horas reperfusão intestinal.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O estudo foi realizado de acordo com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá sob o protocolo 6265010416 de 2016. Ratos machos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)*, com peso corporal 273 ± 3 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá foram alojados durante o período experimental no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas. Os animais ficaram sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas). Receberam ração padrão NUVILAB® e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 5 grupos (n= 8):

Grupo C: não operado e tratado com veículo;

Grupo SC: (falso operado) submetido à laparotomia, porém sem a oclusão da artéria mesentérica superior (AMS) e tratado com veículo;

Grupo ST: (falso operado) submetido à laparotomia, sem oclusão da AMS e tratado com AAL;

Grupo IRC: submetido à isquemia intestinal por oclusão da AMS, tratado com veículo;

Grupo IRT: submetido à isquemia intestinal por oclusão da AMS, tratado com AAL.

Isquemia e Reperusão Intestinal

Após jejum de 15 horas, todos os animais foram anestesiados com a mistura de Ketamina® (100 mg/kg de peso corporal) (Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, SP, Brasil) e Xilazina® (20 mg/kg de peso corporal) (Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, SP, Brasil), via intramuscular. Solução salina a 37 °C foi utilizada para hidratar e manter a temperatura interna do animal durante o procedimento cirúrgico. Todos os grupos, exceto o controle sofreram laparotomia abdominal. Os animais dos grupos SC e ST sofreram somente a exposição do intestino e posterior sutura abdominal.

A isquemia intestinal nos grupos IRC e IRT foi estabelecida pela oclusão da artéria mesentérica superior por um *clamp* vascular e por amarrações laterais para bloqueio do fluxo sanguíneo durante 45 minutos. Após o período de isquemia, as amarrações e o *clamp* foram retirados e o fluxo foi reestabelecido iniciando a reperusão. O abdômen dos animais foi suturado e estes foram mantidos em gaiolas individuais durante as 24 horas de reperusão.

Tratamento

O tratamento dos grupos ST e IRT foi realizado via gavagem com ácido alfa lipoico (100 mg/kg de peso corporal) diluído em óleo de milho (1,5 mL/kg de peso corporal). Os outros grupos receberam somente veículo (óleo de milho) via gavagem. O tratamento foi realizado 1 hora antes da isquemia e 12 horas antes da eutanásia.

Coleta das amostras

Os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésico Tiopental Sódico® (Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, SP, Brasil) (120 mg/kg de peso corporal). A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca e o sangue foi centrifugado a velocidade de 3000 rpm durante 10 minutos. O plasma foi armazenado sob refrigeração para posterior análise.

O fêo delimitado pela isquemia foi coletado, lavado em Tampão Fosfato de Sódio (PBS) pH 7,4 e distribuído para as técnicas: estresse oxidativo, reação de Griess, histológico e imunofluorescência.

Para a reação de Griess, 1 cm do segmento foi triturado e adicionado em 3 mL de PBS para posterior centrifugação. O sobrenadante foi armazenado a -80 °C. Já para o estresse oxidativo, outra parte do segmento foi congelada em nitrogênio líquido.

A porção destinada para as análises imunofluorescência preenchida com paraformaldeído 4% pH 7,4, submersa nesse fixador por 3 horas e posteriormente armazenada em PBS + azida sódica (0,08 %). Para o processamento histológico, o segmento foi aberto na borda mesentérica, acomodado em placa de isopor e fixado em paraformaldeído 4 % pH 7,4 por 6 horas.

Estresse oxidativo e inflamação

As amostras congeladas foram homogeneizadas em um triturador em Tampão Fosfato de Potássio 200 mM pH 6,5 na proporção 1:3. Parte do homogenato foi separado para a técnica de grupos sulfídricos não proteicos (GSH). O restante foi centrifugado por 20 minutos a 9.000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para as técnicas: superóxido dismutase (SOD), glutathione s-transferase (GST), lipoperoxidação (LOOH) e proteínas. O pellet foi usado nas técnicas: mieloperoxidase (MPO), n-acetilglicosaminidase (NAG) e proteínas. As análises foram realizadas em placa de 96 poços e a leitura em espectrofotômetro (FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices).

A quantificação de proteínas do pellet e do sobrenadante das amostras foi realizada através de kit comercial (Pierce BCA Protein - Assay Kit, Thermo Fisher Scientific), com leitura da absorbância em 562 nm.

Para estresse oxidativo, o GSH foi analisado pela reação do DTNB com os grupos sulfídricos presentes na amostra. A leitura foi realizada em 412 nm com resultados expressos em µg/g de tecido. Os níveis da enzima SOD foram quantificados pelo método de Marklund e Marklund [24] através da capacidade da SOD de inibir a auto-oxidação do pirogalol. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 405 nm e os resultados expressos em U/mg de tecido. O GST foi determinado pela reação entre 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), GSH e amostra. A leitura em 340 nm mostrou resultados em mmol/min/mg de proteína. O método de oxidação do ferro II na presença

de xilenol laranja [25] foi utilizado para a determinação do total de hidroperóxidos lipídicos na parede do íleo. A leitura a 560nm apresentou resultados expressos em mmol/min/mg de tecido.

Para inflamação, os níveis enzimáticos de MPO e NAG na parede do íleo foram analisados. O pellet foi ressuspendido em Tampão Fosfato de Potássio 0,08 M com HTAB pH 5,4. Os níveis de MPO foram quantificados pela reação do peróxido de hidrogênio com tetrametilbenzidina na amostra. A absorbância de 620 nm demonstrou resultados em mD.O./mg de proteína. Já para a NAG a solução com n-acetilglicosaminidase foi adicionada a amostra na presença dos tampões citrato e glicina. A leitura em 405 nm demonstrou resultados em mD.O./mg de proteína.

Nítrito

Para a avaliação dos níveis de óxido nítrico, seu subproduto, o nitrito, foi quantificado através da Reação de Griess. Ao sobrenadante da amostra foi adicionado, a solução A (contendo ácido fosfórico, silfanilamida e H₂O) e posteriormente a solução B (contendo N-1-naphitiletlenodiamida e H₂O). A leitura foi realizada em comprimento de onda 540 nm.

Imunofluorescência

Porções de 1 cm de largura foram dissecados para exposição do plexo mientérico e obtenção do preparado total de membrana sob estereomicroscópio com auxílio de pinça. Os preparados totais passaram por três lavagens com PBS + Triton-X100 0,5 % e foram incubados em solução de bloqueio contendo PBS + Triton-X100 0,5 %, soro de burro não imune 20 % e albumina de soro bovino (BSA) 3 % por 1 hora. Após a retirada do bloqueio, os preparados totais foram incubados em anticorpo primário para a realização de duplas marcações HuC/D + nNOS e S100 + GFAP (conforme Tabela 1) em solução contendo PBS, soro de burro 2 % e BSA 2 % permanecendo por 48 horas. Após o anticorpo primário, foram realizadas cinco lavagens com PBS e foram incubadas, em anticorpo secundário (Tabela 1) por 2 horas. Por fim, foram lavadas novamente cinco vezes em PBS e as lâminas foram montadas com Antifade® (Life Technologies do Brasil Com. Ind. Prod. Biotec. Ltda, SP, Brasil).

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência FSX-100 (Olympus Life Science). Para análise de perfil celular das marcações HuC/D e nNOS

foram realizadas medidas em 100 corpos celulares e, para análise de densidade, todos os corpos celulares presentes em 30 imagens capturadas foram contados. Para as marcações de células da glia GFAP e S100, foram capturadas imagens de 30 gânglios. Para análise do S100, foram contadas todas as células da glia marcadas nessas 30 imagens, enquanto para o GFAP foi realizada a medida da intensidade de brilho emitida pela marcação dos gânglios. Nesse último caso, todas as imagens foram capturadas com o tempo de exposição (1 / 10 sec).

Para quantificação e morfometria da população geral (HuC/D) e subpopulação nitrérgica (nNOS) e para a quantificação de células da glia S100 reativas, o programa Image Pro Plus foi utilizado. Para a medida da intensidade de brilho de GFAP, o programa Image J foi utilizado. Nesse caso, os resultados expressos em RGB mostram a média da marcação emitida pelo gânglio marcado e delimitado.

Histologia: análise das células caliciformes e morfometria da parede intestinal

O fragmento do íleo destinado à histologia, após fixação foi desidratado, diafanizado em xilol e emblocado em parafina. Cortes semisseriados foram feitos e o material foi submetido às colorações: Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina e Eosina (HE).

Para a análise da proporção das células caliciformes coradas com PAS foram contadas o total de 2500 células presentes na cripta e vilosidade observando a proporção entre células caliciformes e as outras células epiteliais. Este estudo foi realizado com o auxílio de microscópio óptico em aumento de 100X. As lâminas coradas com HE foram utilizadas para a realização das análises morfométricas e para isto foram capturadas 30 imagens em microscópio (Nikon Eclipse 80iC) para cada animal. Altura e largura das vilosidades, profundidade de cripta, espessura da camada submucosa, espessura da camada muscular e espessura da parede total foram analisadas pela mensuração de 30 medidas/parâmetro/animal.

Análise Estatística

Foi realizada pelo programa GraphPad Prism 5. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e para os dados que apresentaram distribuição normal foi utilizada a análise de variância One-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey. Os dados que não apresentaram

distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunns. Para todos os casos, o valor de p considerado estatisticamente significativo foi menor que 0,05.

RESULTADOS

Estresse Oxidativo

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou diminuição nos grupos ST (28 %) e IRC (30 %) quando comparados ao grupo C, enquanto os grupos SC e IRT apresentaram níveis semelhantes ao controle (Fig. 1a). Nas outras análises (GSH, GST e LPO) de estresse oxidativo, não foram observadas alterações após IR intestinal ou tratamento com AAL (Fig. 1b, c e d).

Inflamação

Os resultados da inflamação são apresentados na Figura 2. Os grupos isquêmicos IRC (144 %) e IRT (101 %) apresentaram aumento significativo da atividade da MPO quando comparados ao grupo C (Fig. 2a). Os grupos SC e ST apresentaram valores semelhantes ao grupo C. Já os níveis de NAG não mostraram-se alterados em nenhum grupo (Fig. 2b).

Nítrito

A avaliação indireta do óxido nítrico através da quantificação de seu subproduto, o nitrito (Fig. 2c) se apresentou elevada no grupo IRC (142 %) em relação ao grupo C. Os outros grupos apresentaram valores similares ao grupo C.

Parede Intestinal

A análise histológica da parede intestinal do íleo dos animais apresentou-se alterada, principalmente nos grupos isquêmicos. Na camada mucosa, os grupos SC e IRT apresentaram vilosidades mais altas (22 e 28 %, respectivamente) e mais largas (21 %) no grupo SC e (24 %) no grupo IRT (Fig. 3a e 3b) quando comparados ao grupo C. Os grupos ST e IRC apresentaram valores semelhantes ao grupo C. A profundidade de cripta (Fig. 3c) apresentou-se maior somente no grupo IRT (24 %) quando comparado ao grupo C.

Na análise da espessura da camada submucosa (Fig. 3d), observou-se que dois grupos apresentaram aumento significativo nesse parâmetro: SC (25 %) e IRT (26 %) em relação ao grupo C. Os outros grupos (ST e IRC) não mostraram alteração. A espessura da camada muscular (Fig. 3e) também sofreu alteração, onde os grupos SC (35 %), IRC (34 %) e IRT (22 %) apresentaram aumento da espessura em relação ao grupo C. Nesse caso, o grupo ST apresentou espessura semelhante ao grupo C. Conseqüentemente, apresentaram aumento da espessura da parede total (Fig 3f), quando comparados ao grupo C, os grupos SC (20 %); IRC (10 %) e IRT (31 %). Enquanto o tratamento com AAL no grupo ST mostrou recuperação nesse parâmetro.

A quantificação de células caliciformes foi realizada em relação ao número de células epiteliais intestinais, em um total de 2500 células por animal. Após 24 horas de reperfusão, não houve alteração no número de células caliciformes em nenhum grupo estudado (Fig. 4).

Neurônios e glia mientéricos

Foram analisados o perfil celular e a densidade da população geral de neurônios marcada por HuC/D e da subpopulação nitrérgica marcada por nNOS (Fig 5 a, b e c). A população geral neuronal não apresentou diferença estatística entre os grupos estudados em relação a densidade (Fig. 5d) e em relação ao perfil celular (Fig 5f).

De forma semelhante, a densidade dos neurônios nitrérgicos não apresentou diferença estatística entre os grupos (Fig. 5e). Porém, o perfil celular dessa subpopulação apresentou-se aumentado nos grupos SC (9 %), IRC (15 %) e IRT (10 %) quando comparados ao grupo C. O grupo ST apresentou-se estatisticamente igual ao controle (Fig. 5g).

As células da glia mientérica foram analisadas através dos marcadores S100 e GFAP (Fig. 6a, b e c). Para a densidade de S100, não houve diferença estatística entre os grupos estudados (Fig. 6d). Já em relação à intensidade de brilho medida nos 30 gânglios, o grupo IRC apresentou um aumento significativo de 8 % em relação ao grupo C (Fig. 6e).

DISCUSSÃO

Durante a IR intestinal, várias alterações podem acontecer dentre elas estresse oxidativo [7], inflamação [26], modificações na estrutura e morfologia da parede

intestinal [14] e alterações no Sistema Nervoso Entérico (SNE) [10]. Sendo que a intensidade dessas alterações varia dependendo do tempo de isquemia [4] e de reperfusão [27].

As alterações observadas na enzima SOD indicam que os mecanismos antioxidantes endógenos sofreram alteração com a IR. A enzima SOD fornece importante defesa antioxidante através da dismutação de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [28]. Sua atividade pode aparecer reduzida após IR intestinal, inclusive em período curto de reperfusão [29], pois faz parte da primeira linha de defesa contra o superóxido [30]. Os resultados demonstraram uma redução da atividade da enzima no grupo IRC, no entanto, o tratamento com AAL fez com que os animais do grupo IRT apresentassem atividade semelhante ao grupo C, demonstrando que o AAL tem efeitos benéficos em casos de IR intestinal. Apesar do AAL reagir com radicais hidroxila, HOCl e oxigênio singlete, há controvérsias quanto ao poder de neutralização do radical superóxido pelo AAL [31]. Sua forma reduzida apresenta maior eficiência na neutralização de radical superóxido produzido a partir de xantina e xantina oxidase [32]. Podemos observar também que a manipulação do intestino nos grupos *sham*, não promove alteração nos níveis da enzima SOD, contudo, o tratamento com AAL diminuiu a atividade desta enzima (grupo ST) (Fig 1a). Estudos mostram que em algumas situações onde os animais não apresentam patologias, o uso de substâncias antioxidantes pode ter efeito pró-oxidante [33], incluindo o AAL [34].

Em nosso estudo utilizamos outros marcadores de estresse oxidativo, o método LOOH para análise de peroxidação lipídica, o GSH e o GST, sendo que não observamos alteração nesses marcadores em nenhum dos grupos após 24 horas de reperfusão. Isso pode ter ocorrido devido ao tempo de reperfusão, sabendo que a peroxidação lipídica, por exemplo, é o dano estrutural causado pelas espécies reativas de oxigênio sobre os lipídeos, como consequência do estresse oxidativo [35] e portanto pode ser avaliado posteriormente ao aparecimento deste. Já GSH e GST são parte do sistema antioxidante endógeno não enzimático que podem ter seus níveis reduzidos em patologias que envolvem estresse oxidativo [28].

A IR intestinal, também pode provocar uma resposta inflamatória [28]. Após 24 horas de reperfusão foi possível observar o início da resposta inflamatória observada pelo aumento da MPO. O aumento desta enzima ocorre no tecido pela presença de neutrófilos, no entanto, a dosagem de NAG, substância produzida por macrófagos, não

mostrou diferença entre os grupos. Estudos demonstram que na isquemia cerebral, as diferentes subpopulações de leucócitos são recrutadas em diferentes tempos, sendo os neutrófilos em período inicial e os macrófagos mais tardiamente [36]. Observamos ainda que o tratamento com AAL não foi capaz de reduzir o aumento dos níveis de MPO no grupo isquêmico (IRT).

Em conjunto, o estresse oxidativo e a inflamação [26] podem resultar em danos teciduais [28] e injúria celular [7]. Na célula, podem incluir alteração do potencial de membrana e da distribuição de íons, edema, desorganização do citoesqueleto e acidose [3]. O dano tecidual é mais proeminente na camada mucosa após IR observado pela ruptura das vilosidades [13], caracterizada pelo achatamento ou desaparecimento de vilosidades [14], destruição da mucosa e aparecimento de pontos hemorrágicos [27]. Porém, a mucosa intestinal apresenta rápida recuperação, sendo que a reepitelização já se inicia às 6 horas de reperfusão [14]. Apesar da recuperação da mucosa iniciar-se após 6 horas, as alterações ainda podem ser observadas após 24 horas como encontrado em nosso estudo. Outros trabalhos também observaram essa recuperação após 24 horas de reperfusão, com vilosidades íntegras [13, 14, 27, 37]. Nossos resultados demonstram pelas análises morfométricas (altura e largura das vilosidades, profundidade de cripta e espessura da submucosa), que ocorre ainda a presença de edema ou proliferação celular nos tecidos no grupo IRT. As alterações morfológicas e a destruição tecidual após IR intestinal são resultado do aumento da permeabilidade capilar, que provoca a formação de edema e o extravasamento de enzimas citosólicas para a circulação. Os radicais livres produzidos no tecido contribuem para o dano [4].

Apesar dos efeitos benéficos do AAL observamos ainda alterações morfométricas no grupo IRT em relação ao grupo C. Neste grupo as alterações observadas na mucosa e submucosa continuaram exacerbadas. É provável que o AAL tenha exercido um efeito protetor sobre o epitélio intestinal reduzindo a perda de líquido para a luz intestinal e assim promovendo um aumento na espessura pela retenção de líquidos. A redução dos parâmetros no grupo IRC em relação ao IRT pode ter ocorrido devido ao extravasamento de líquidos para a luz intestinal. Contudo, novos estudos devem ser realizados para comprovar esta hipótese.

Dentre as funções de barreira do epitélio intestinal as células caliciformes apresentam um papel importante por secretarem muco sobre este epitélio impedindo a invasão microbiana patogênica [38]. Visando avaliar possíveis alterações das células

caliciformes e relacioná-las com a proteção desta barreira estudamos sua densidade. Em nosso estudo observamos que, o número de células caliciformes não sofreu alteração entre os grupos estudados. Lindeström e Ekblad [27] observaram que há um gradativo aumento do número de células caliciformes na mucosa ao longo do tempo de reperfusão, mas que só se inicia, sutilmente a partir de 24 h.

Apesar da rápida recuperação da mucosa intestinal, o dano na camada muscular permanece aparente ao longo do tempo de reperfusão, podendo ser observado como hipertrofia [27] e degeneração muscular [14]. Em nosso estudo observou-se aumento da espessura da camada muscular nos grupos SC, IRC e IRT. Fato também observado em camundongos, com aumento principalmente da musculatura circular em 24 h de reperfusão [13]. Essas alterações que aparecem na camada muscular podem ter relação com a inflamação [14] já vista pelos níveis de MPO e também com alterações no SNE [27], principalmente na subpopulação nitrérgica [13].

Alterações morfológicas na parede intestinal também foram observadas no grupo SC nas camadas muscular, mucosa e submucosa, demonstrando que somente a manipulação do intestino pode provocar alterações. Nesse caso, o tratamento com AAL teve efeito positivo, pois o grupo ST apresentou valores similares ao grupo C.

Juntamente com as alterações na parede intestinal, estudos demonstram que o SNE também pode ser afetado pela IR [10,27]. Estudos de 24 horas de reperfusão em ratos, mostram diminuição da densidade de neurônios HuC/D, aumento na densidade de células da glia S100 β + com 35 minutos de isquemia [12] e aumento da densidade de neurônios acidófilos com 60 minutos de isquemia [27]. Porém, nosso trabalho mostrou que após 45 minutos de isquemia e 24 horas de reperfusão não houve alteração na densidade da população geral (HuC/D+) ou nitrérgica (nNOS+) e ainda da densidade de células gliais (S100+). Resultados semelhantes foram encontrados [7], onde a isquemia intestinal de 45 minutos seguida de 3 h de reperfusão também não alterou a densidade de células da glia e neurônios avaliados em ratos. Rivera e colaboradores (2009) [39] também não encontraram diferença na densidade neuronal em nenhum marcador utilizado (HuC/D e nNOS) e tempo de reperfusão (2 e 24 h, 7, 14 e 28 dias) no íleo de porquinho-da-índia. No entanto, quando avaliamos o perfil celular da população geral de neurônios mientéricos HuC/D+ do íleo dos animais não houve diferença estatística entre os grupos após IR intestinal. Porém, quando avaliamos a subpopulação nitrérgica, é possível notar o aumento da área do perfil do corpo celular desses neurônios no grupo

SC e mais significativamente ainda, no grupo IRC, comprovando que somente a manipulação do intestino do animal, pode refletir em alterações na morfologia de neurônios [7,10]. O aumento do perfil celular da subpopulação nitrérgica também foi encontrado com o mesmo tempo de reperfusão em camundongos [11]. O aumento também aparece aos 7 dias de reperfusão em ratos [10] e perdura até 4 semanas em porquinhos-da-india [39]. Mostrando que os neurônios nitrérgicos, são mais afetados que outras subpopulações, como os marcados por calretinina, por exemplo, sendo que a diferença na sensibilidade se deve provavelmente ao tipo de proteína que expressam [39].

O aumento do perfil celular dessa subpopulação pode ser denominado como edema [11] e está relacionado ao aumento de Ca^{2+} citoplasmático. A enzima óxido nítrico sintase, presente nos neurônios, depende de Ca^{2+} para produção de óxido nítrico (ON). Quando os neurônios são submetidos a um estresse, ocorre despolarização da membrana, e a entrada de Ca^{2+} é facilitada, desestabilizando a homeostase celular. O aumento do Ca^{2+} citoplasmático ainda induz a liberação de mais Ca^{2+} proveniente de estoques intracelulares, como o retículo endoplasmático. Com esse aumento de cálcio, a óxido nítrico sintase aumenta a produção de ON [40]. O ON é capaz de reagir com EROs produzidas durante a reperfusão, resultando na formação de peroxinitrito que provoca o inchaço neuronal e agregação de proteínas nitrosiladas nos neurônios. Esses processos ocorrem de forma muito rápida já no início da reperfusão, mas podem ter efeitos duradouros como a perda de função de proteínas e RNA, dano neuronal e até sua morte [11]. O ON é permeável à membrana e pode reagir no meio extracelular com EROs, estendendo o dano extracelularmente [40]. Em nosso trabalho, a avaliação do ON teve seus valores muito elevados no grupo IRC em relação ao C, e o tratamento (grupo IRT) foi eficaz na diminuição desses níveis, inclusive no grupo ST. O tratamento com AAL também foi eficiente na manutenção do perfil celular nitrérgico no grupo ST e atenuou essa alteração no grupo IRT, mas nesse caso não foi suficiente para se igualar ao grupo C.

Além dos neurônios, as células gliais entéricas também podem sofrer com os efeitos da IR intestinal. As células da glia S100+ não sofreram alteração em sua densidade. Mas, a avaliação das células gliais através da intensidade de brilho emitida pela marcação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) mostrou que após IR intestinal, há aumento da expressão desta proteína (grupo IRC). O aumento do GFAP é denominado

gliose e pode indicar o aumento da proliferação, expressão e síntese da proteína ácida fibrilar glial. Tem como causa e consequência, a produção de diversas citocinas e acontece como resposta à injúria e inflamação intestinal com papel ainda desconhecido se pró ou anti-inflamatório [41]. O que se sabe, é que a glia entérica tem capacidade de ativar diversos mecanismos para evitar danos nos neurônios resultantes de insultos tanto agudos quanto crônicos [42]. Além disso, participa ativamente na regulação da motilidade intestinal na regulação de processos fisiológicos da mucosa [43] atuando sobre os processos de secreção, absorção e também sobre a barreira epitelial intestinal [44]. O AAL demonstrou ser capaz de promover a manutenção da expressão de GFAP no grupo IRT onde observamos valores semelhantes ao grupo C.

Desta forma podemos observar que a isquemia intestinal de 45 minutos seguida de 24 horas de reperfusão induz a resposta inflamatória e causa alteração no SNE do plexo mientérico do íleo de ratos, demonstrado pelo aumento do perfil celular da subpopulação de neurônios nitrérgicos e da gliose observada em células da glia GFAP positivas. Porém, com as 24 horas de reperfusão, não foi possível observar claramente o desenvolvimento de todos os efeitos da isquemia e reperfusão e consequentemente do tratamento com AAL sobre a parede intestinal. O tratamento com 100 mg/kg de AAL foi capaz de amenizar as alterações causadas pela IR intestinal sobre o SNE e marcadores de estresse e inflamação. No entanto, são necessários novos estudos em diferentes tempos de reperfusão, os quais poderão esclarecer melhor os danos ocasionados pela IR e definir a melhor dosagem para tratamento com o AAL.

REFERÊNCIAS

- [1] Di Paola, R.; Impellizzeri, D.; Torre, A.; Mazzon, E.; Cappellani, A.; Gaggio, C.; Esposito, E.; Trischitta, F.; Cuzzocrea, S. Effects of palmitoylethanolamide on intestinal injury and inflammation caused by ischemia-reperfusion in mice. *J Leukoc Biol.* 2012; 91(6): 911-20.
- [2] Haglund, U.; Bergqvist, D. Intestinal ischemia – the basics. *Langenbecks Arch Surg.* 1999; 384(3): 233-8.
- [3] Collard, C. D.; Gelman, S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001; 94(6): 1133-8.
- [4] McCord, F. H. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985; 312(3): 159-163.
- [5] Parks, D. A.; Granger, D. N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986; 250(6 Pt 1): G749-53.
- [6] Mallick, I. H.; Yang, W.; Winslet, M. C.; Seifalian, A. M. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci.* 2004; 49(9): 1359-77.
- [7] Da Silva de Souza, A. C.; Borges, S. C.; Beraldi, E. J.; Sá-Nakanishi, A. B.; Comar, J. F.; Bracht, A.; Natali, M. R. M.; Buttow, N. C. Resveratrol reduces morphologic changes in the myenteric plexus and oxidative stress in the ileum in rats with ischemia/reperfusion injury. *Dig Dis Sci.* 2015; 60(11): 3252-63.
- [8] Kim, Y.; Kim, D. C.; Cho, E. S.; Ko, S. O.; Kwon, W. Y.; Suh, G. J. Antioxidant and anti-inflammatory effects of selenium in oral buccal mucosa and small intestinal mucosa during intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Inflamm.* 2014; 11(1): 36.
- [9] Impellizzeri, D.; Cordaro, M.; Campolo, M.; Gugliandolo, E.; Esposito, E.; Benedetto, F.; Cuzzocrea, S.; Navarra, M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of

flavonoid-rich fraction of bergamot juice (BJe) in a mouse model of intestinal ischemia/reperfusion injury. *Front Pharmacol.* 2016; 7:203.

[10] Borges, S. C.; Souza, A. C. S.; Beraldi, E. J.; Schneider, L. C. L.; Buttow, N. C. Resveratrol promotes myenteric neuroprotection in the ileum of rats after ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 2016; 166: 54-59.

[11] Rivera, L. R.; Thacker, M.; Pontell, L.; Cho, H. J.; Furness, J. B. Deleterious effects of intestinal ischemia reperfusion are associated with protein nitrosylation. *Cell Tissue Res.* 2011; 344(1): 111-23.

[12] Mendes, C. E.; Palombit, K.; Vieira, C.; Silva, I.; Correia-de-Sá, P.; Castelucci, P. The effect of ischemia and reperfusion on enteric glial cells and contractile activity in the ileum. *Dig Dis Sci.* 2015; 60(9): 2677-89.

[13] Rivera, L. R.; Pontell, L.; Cho, H. J.; Castelucci, P.; Thacker, M.; Poole, D. P.; Frugier, T.; Furness, J. B. Knock out of neuronal nitric oxide synthase exacerbates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice. *Cell Tissue Res.* 2012; 349(2): 565-76.

[14] Pontell, L.; Sharma, P.; Rivera, L. R.; Thacker, M.; Tan, Y. H.; Brock, J. A.; Furness, J. B. Damaging effects of ischemia/reperfusion on intestinal muscle. *Cell Tissue Res.* 2011; 343(2):411-9.

[15] Rochette, L.; Ghibu, S.; Richard, C.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res.* 2013; 57(1): 114-25.

[16] Smith, A. R.; Shenvi, S. V.; Widlansky, M.; Suh, J. H.; Hagen, T. M. Lipoic Acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry.* 2004; 11: 1135-1146.

- [17] Boyaci, M. G.; Eser, O.; Kocogullari, C. U.; Karavelioglu, E.; Tokyol, C.; Can, Y. Neuroprotective effect of alpha-lipoic acid and methylprednisolone on the spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Br J Neurosurg.* 2014; 5:1-6.
- [18] Saleh, M. C.; Connell, B. J.; Rajagopal, D.; Khan, B. V.; Abd-El-Aziz, A. S.; Kucukkaya, I.; Saleh, T. M. Co-administration of resveratrol and lipoic acid, or their synthetic combination, enhances neuroprotection in a rat model of ischemia/reperfusion. *Plos One.* 2014; 9(1): e87865.
- [19] Sun, J.; Zhang, H.; Guan, L.; Zhou, H.; Sun, M. Alpha-lipoic acid attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in mice. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(1): 358-67.
- [20] Li, Y.; Ma, Q. G.; Zhao, L. H.; Wei, H.; Duan, G. X.; Zhang, J. Y.; Ji, C. Effects of lipoic acid on immune function, the antioxidant defense system, and inflammation-related genes expression of broiler chickens fed aflatoxin contaminated diets. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(4): 5649-62.
- [21] Maritim, A. C.; Sanders, R. A.; Watkins, J. B. Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 2003; 14(5): 288-294.
- [22] Derin, N.; Akpınar, D.; Yargicoglu, P.; Agar, A.; Aslan, M. Effect of alpha-lipoic acid on visual evoked potentials in rats exposed to sulfite. *Neurotoxicol Teratol.* 2009; 31(1): 34-9.
- [23] Somani, S. M.; Husain, K.; Whitworth, C.; Trammell, G. L.; Malafa, M.; Rybak, L. P. Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. *Pharmacol Toxicol.* 2000; 86(5): 234-41.
- [24] Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974; 47(3): 469-74.

- [25] Jiang, Z.; Woollard, A. C. S.; Wolff, S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*. 1991; 26(10): 853-6.
- [26] Okudan, N.; Belviranlı, M.; Gökbel, H.; Öz, M.; Kumak, A. Protective effects of curcumin supplementation on intestinal ischemia reperfusion injury. *Phytomedicine*. 2013; 20(10): 844-8.
- [27] Lindeström, L. M.; Ekblad, E. Structural and neuronal changes in rat ileum after ischemia with reperfusion. *Dig Dis Sci*. 2004; 49(7-8):1212-22.
- [28] Bhattacharyya, A.; Chattopadhyay, R.; Mitra, S.; Crowe, S. E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev*. 2014; 94(2): 329-54.
- [29] Saleh, D. M.; Sherif, R. N. The protective effect of curcumin versus sodium nitroprusside on intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Interdiscipl Histopathol*. 2014. 2(2): 74-87.
- [30] Jaeschke, H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995; 209(2): 104-11.
- [31] Packer, L.; Witt, E. H.; Tritschler, H. J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995; 19(2): 227-50.
- [32] Suzuki, Y. J.; Tsuchiya, M.; Packer, L. Antioxidant activities of dihydrolipoic acid and its structural homologues. *Free Radical Res Commun*. 1993; 18(2): 115-22.
- [33] Chakraborty, A.; Ramani, P.; Sherlin, H. J.; Premkumar, P.; Natesan, A. Antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C in oral environment. *Indian J Dent Res*. 2014; 25(4): 499-504.

- [34] Moini, H.; Packer, L.; Saris, N. E. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 182(1): 84-90.
- [35] Sies, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1986; 25(12): 1058-1071.
- [36] Zheng, Z.; Yenari, M. A. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res.* 2004; 26(8): 881-92.
- [37] Marosti, A. R.; Silva, M. V.; Palombit, K.; Mendes, C. E.; Tavares-de-Lima, W.; Castelucci, P. Differential effects of intestinal ischemia and reperfusion in rat enteric neurons and glial cells expressing P2X2 receptors. *Histol Histopathol.* 2015; 30(4): 489-501.
- [38] Kim, Y. S.; Ho, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010; 12(5): 319-30.
- [39] Rivera, L. R.; Thacker, M.; Castelucci, P.; Bron, R.; Furness, J. B. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea pig enteric nervous system. *Acta Neuropathol.* 2009; 118(2):261-70.
- [40] Rivera, L. R.; Poole, D. P.; Thacker, M.; Furness, J. B. The involvement of nitric oxide synthase neurons in enteric neuropathies. *Neurogastroenterol Motil.* 2011; 23(11): 980-8.
- [41] Rühl, A.; Nasser, Y.; Sharkey, K. A. Enteric Glia. *Neurogastroenterol Motil.* 2004; 16(1): 44-9.
- [42] De Giorgio, R.; Giancola, F.; Boschetti, E.; Abdo, H.; Lardeux, B.; Neunlist, M. Enteric glia and neuroprotection: basic and clinical aspects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 303(8): G887-93.

[43] Grubisic, V. e Gulbransen, D. Enteric glia: the most alimentary of all glia. *J Physiol.* 2016; 595(2): 557-570.

[44] Neunlist, M.; Rolli-Derkinderen, M.; Latorre, R.; Landeghem, L. V.; Coron, E.; Derkinderen, P.; Giorgio, R. Enteric Glial Cells: Recent Developments and future Directions. *Gastroenterology.* 2014; 147(6): 1230-7.

TABELAS E FIGURAS

Tabelas

Tabela 1: Anticorpos utilizados na imunofluorescência para avaliação de neurônios e células da glia entéricas.

Primário	Espécie	Diluição	Marca	Secundário	Diluição	Marca
HuC/D	<i>mouse</i>	1:500	Invitrogen	Alexa Fluor anti- <i>mouse</i> 488	1:800	Invitrogen
nNOS	<i>rabbit</i>	1:400	Invitrogen	Alexa Fluor anti- <i>rabbit</i> 546	1:500	Invitrogen
S100	<i>rabbit</i>	1:500	Invitrogen	Alexa Fluor anti- <i>rabbit</i> 488	1:500	Invitrogen
GFAP	<i>goat</i>	1:500	Abcam	Alexa Fluor anti- <i>goat</i> 568	1:500	Invitrogen

Figuras

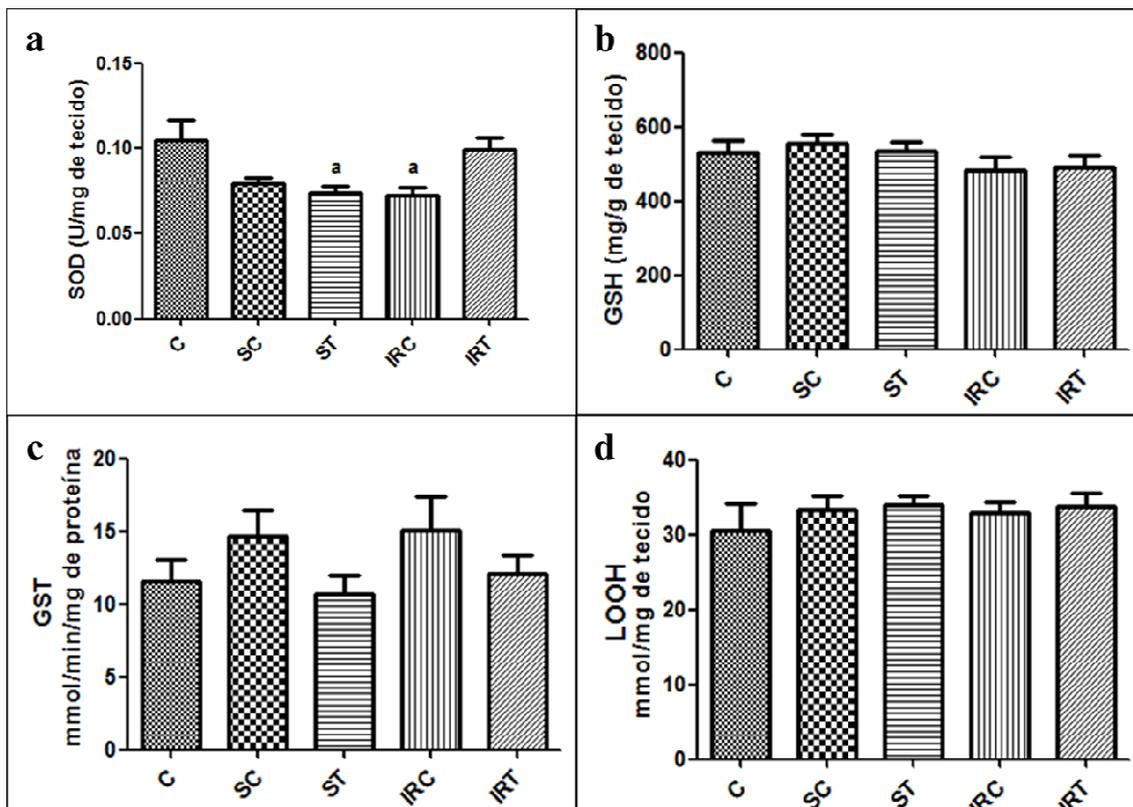


Figura 1: Efeito da IR intestinal e do tratamento com AAL sobre o estresse oxidativo da parede intestinal do íleo de ratos *Wistar*. **a** superóxido dismutase (SOD), **b** grupos sulfidrílicos não proteicos (GSH), **c** glutationa-s-transferase (GST) e **d** hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Grupos: C controle, SC *sham* controle, ST *sham* tratado, IRC isquêmico controle, IRT isquêmico tratado. Resultados expressos como média \pm erro padrão. ^a diferença estatística significativa quando comparado ao grupo C ($p < 0,0012$).

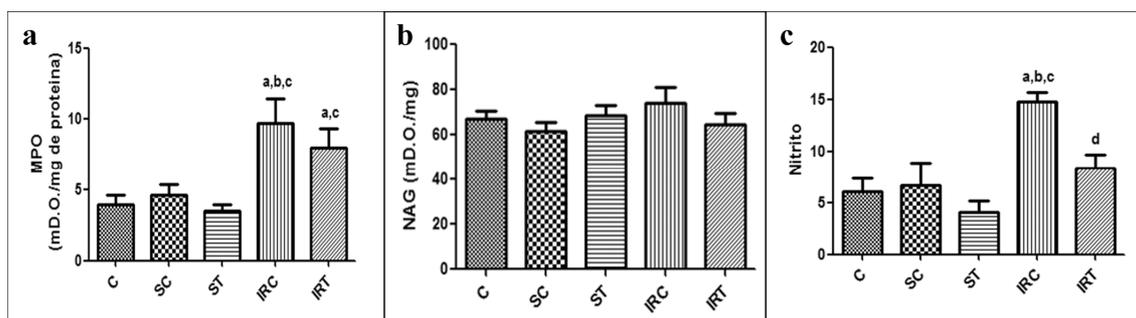


Figura 2: Efeito do tratamento com AAL e da IR intestinal sobre a inflamação da parede intestinal do íleo de ratos *Wistar*. **a** mieloperoxidase (MPO), **b** n-acetil-glicosaminidase (NAG) e **c** nitrito. Grupos: C controle, SC *sham* controle, ST *sham* tratado, IRC isquêmico controle, IRT isquêmico tratado. Resultados expressos como média \pm erro padrão. ^a diferença estatística significativa quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$), ^b diferença estatística significativa quando comparado ao grupo SC ($p < 0,05$), ^c diferença

estatística significativa quando comparado ao grupo ST ($p<0,05$), ^d diferença estatística significativa quando comparado ao grupo IRC ($p<0,05$).

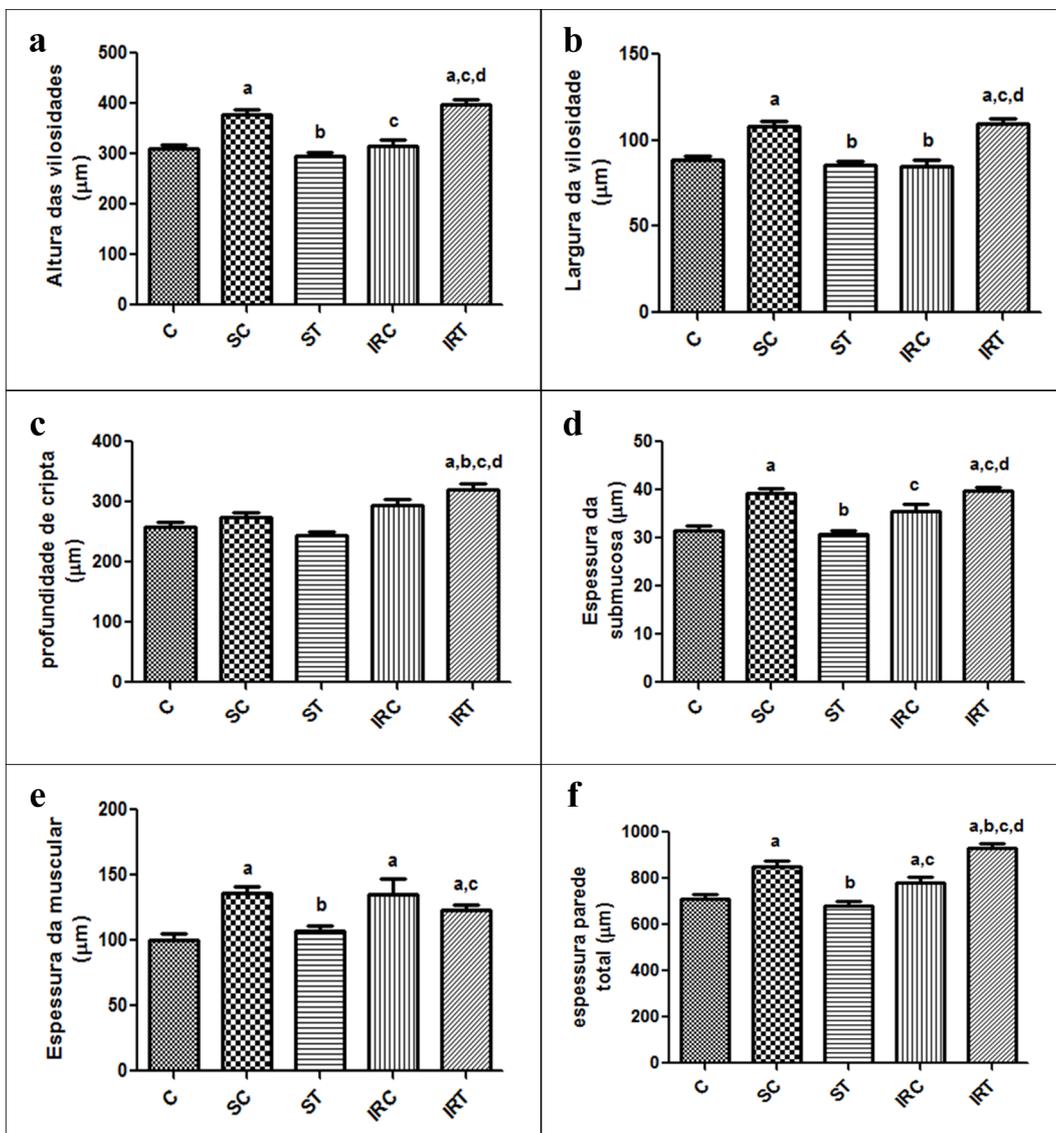


Figura 3: Morfometria da parede intestinal do íleo de ratos *Wistar* submetidos à IR intestinal e tratados com AAL, através de coloração com HE. **a** altura das vilosidades, **b** largura das vilosidades, **c** profundidade das criptas, **d** espessura da camada muscular, **e** espessura da camada submucosa e **f** espessura da parede intestinal total. Grupos: C controle, SC *sham* controle, ST *sham* tratado, IRC isquêmico controle, IRT isquêmico tratado. Resultados expressos como média \pm erro padrão. ^a diferença estatística significativa quando comparado ao grupo C ($p<0,05$), ^b diferença estatística significativa quando comparado ao grupo SC ($p<0,05$), ^c diferença estatística significativa quando comparado ao grupo ST ($p<0,05$), ^d diferença estatística significativa quando comparado ao grupo IRC ($p<0,05$).

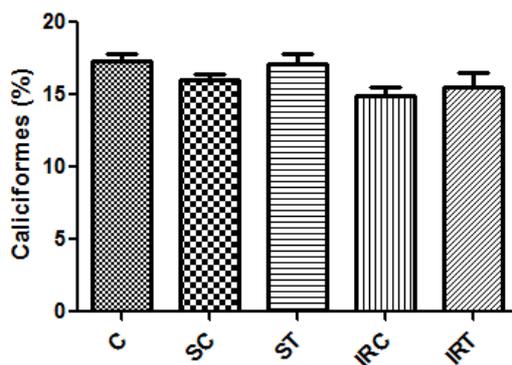


Figura 4: Índice de células caliciformes no íleo de ratos *Wistar* submetidos à IR intestinal e tratados com AAL, através de coloração com PAS. Grupos: C controle, SC *sham* controle, ST *sham* tratado, IRC isquêmico controle, IRT isquêmico tratado. Resultados expressos como média \pm erro padrão.

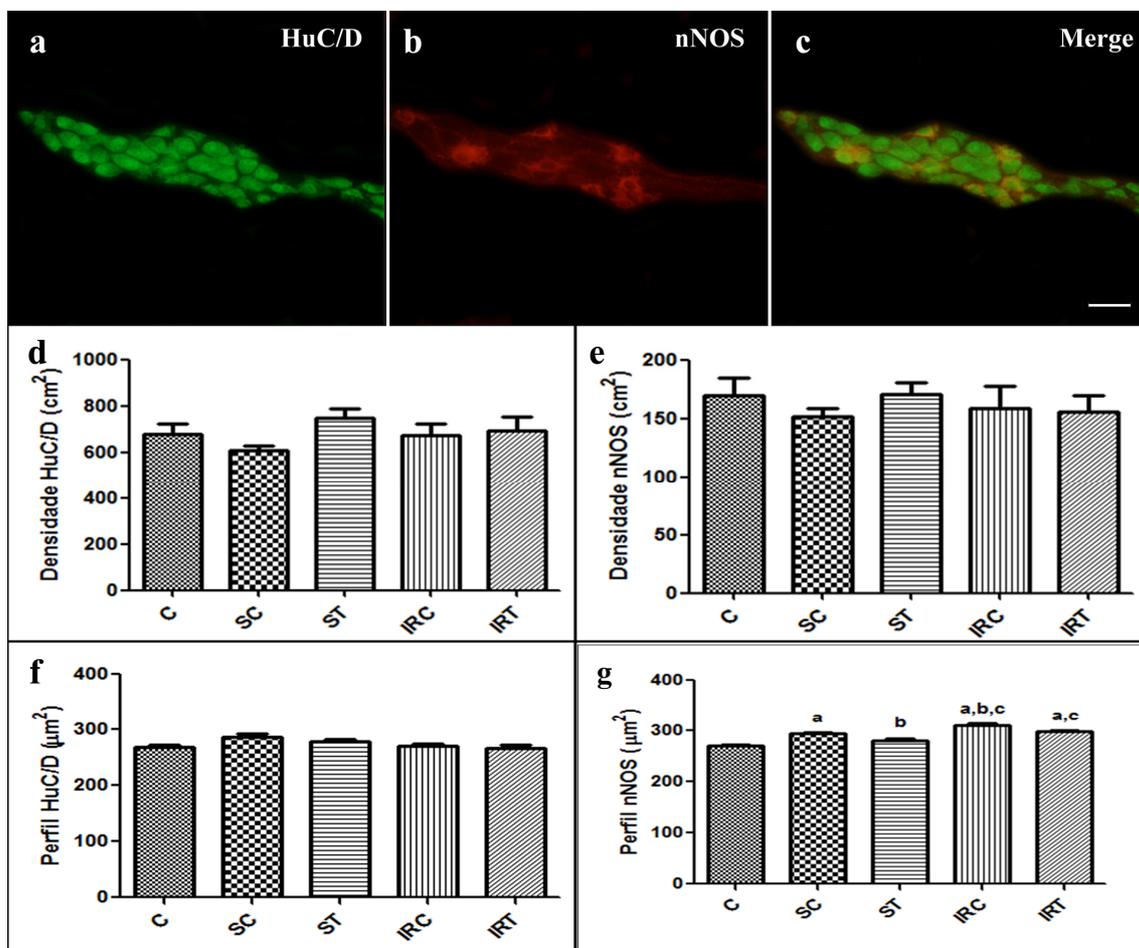


Figura 5: Efeito da IR e do tratamento com AAL sobre os neurônios do plexo mientérico do íleo de ratos *Wistar*, observado através de imunofluorescência. **a** marcação da população geral de neurônios HuC/D+, **b** marcação da subpopulação nitrérgica nNOS+, **c** união das marcações HuC/D e nNOS, **d** densidade de neurônios HuC/D+, **e** densidade de neurônios nNOS+, **f** perfil celular de neurônios HuC/D+, **g** perfil celular dos neurônios nNOS+. Grupos: C controle, SC *sham* controle, ST *sham* tratado, IRC isquêmico

controle, IRT isquêmico tratado. Barra 50 μm . Resultados expressos como média \pm erro padrão. ^a diferença estatística significativa quando comparado ao grupo C ($p < 0,0001$), ^b diferença estatística significativa quando comparado ao grupo SC ($p < 0,0001$), ^c diferença estatística significativa quando comparado ao grupo ST ($p < 0,0001$).

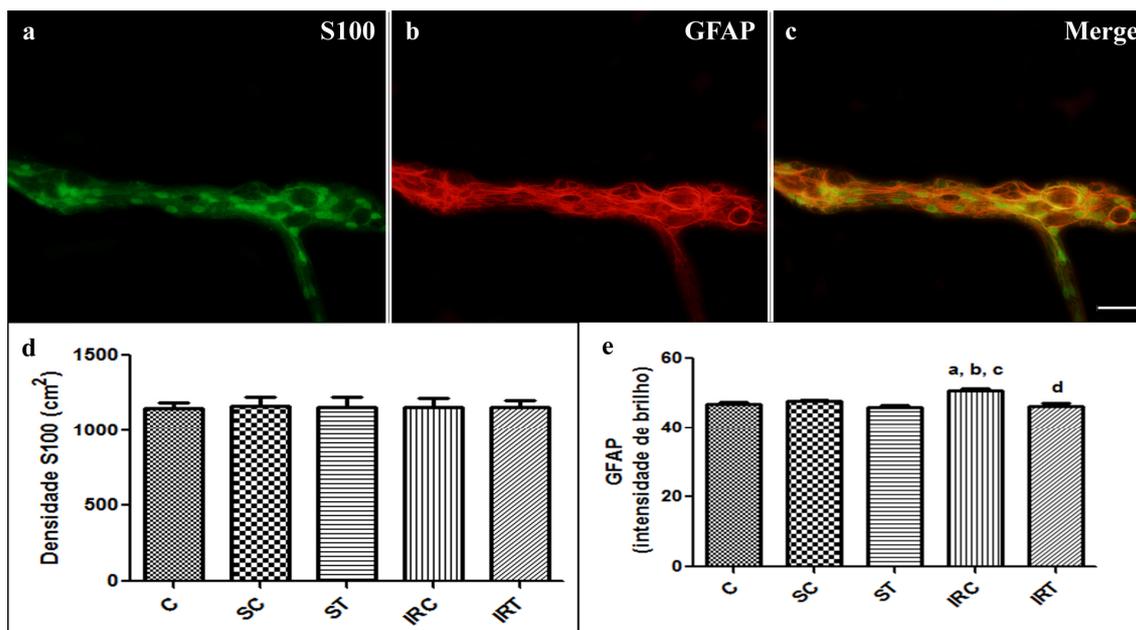


Figura 6: Efeito da IR e do tratamento com AAL sobre as células da glia do plexo mientérico do íleo de ratos *Wistar*, observado através de imunofluorescência. **a** imunomarcagem de células da glia S100+, **b** imunomarcagem de células da glia GFAP+, **c** união das marcações S100 e GFAP, **d** densidade de células gliais S100+ e **e** intensidade de brilho para células gliais GFAP+. Grupos: C controle, SC *sham* controle, ST *sham* tratado, IRC isquêmico controle, IRT isquêmico tratado. Barra de escala 50 μm . Resultados expressos como média \pm erro padrão. ^a diferença estatística significativa quando comparado ao grupo C ($p < 0,0001$), ^b diferença estatística significativa quando comparado ao grupo SC ($p < 0,001$), ^c diferença estatística significativa quando comparado ao grupo ST ($p < 0,0001$), ^d diferença estatística significativa quando comparado ao grupo IRC ($p < 0,0001$).

NORMAS REVISTA JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY

Instructions to Authors
Journal of Gastroenterology
Revised May 10, 2017

AIMS AND SCOPE

The Journal of Gastroenterology, which is the official publication of the Japanese Society of Gastroenterology, publishes Original Articles (Alimentary Tract/Liver, Pancreas, and Biliary Tract), Review Articles, Letters to the Editors and other articles on all aspects of the field of gastroenterology. Significant contributions relating to basic research, theory, and practice are welcomed. These publications are designed to disseminate knowledge in this field to a worldwide audience, and accordingly, its editorial board has an international membership.

PREREQUISITES FOR PUBLICATION

The editors of the Journal of Gastroenterology abide by the recommendations formulated by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>). A Certificate of Exclusive Submission and Disclosure of Conflict of Interest, available on-line (<http://www.springer.com/535>), must be submitted to the journal's editorial office by uploading it as a PDF via Editorial Manager.

IMPORTANT: Upon receipt of a Certificate of Exclusive Submission and Disclosure of Conflict of Interest, manuscripts are officially recognized as submissions.

Detailed Regulations on the Policy on Conflict of Interest in Medical Research Certification and COI Disclosure Form (pdf, 1MB)

ETHICAL STANDARDS

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted. The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements. Authors should also follow the guidelines for the care and use of laboratory animals of their institution or national animal welfare committee.

DISCLOSED POTENTIAL CONFLICT OF INTEREST

When submitting a manuscript to the Journal of Gastroenterology, all authors are required to disclose any financial relationship within the last 3 years with biotechnology manufacturers, a pharmaceutical companies, or other commercial entity that has any interest in the subject matter, materials, or process(es) discussed in the manuscript.

The matters requiring disclosure are outlined in the JSGE Conflict of Interest Policy, available on-line at <http://www.jsge.or.jp/english/journal> (V. Matters for COI disclosure and disclosure standards)

If you, your spouse, or other immediate family member has any of the listed relationships with a commercial entity that has an interest in the subject matter in your

manuscript, please refer to the JSGE's definition of potential conflicts of interest that must be disclosed. Corresponding author must submit the Certificate of Exclusive Submission and Disclosure of Conflict of Interest Form with all authors' signatures, and upload with your manuscript.

COI Disclosure Form The COI disclosure statement form, available online (<http://www.springer.com/535>), must be uploaded in PDF format with your manuscript. Whether conflict of interest exists or not, this disclosure statement will be inserted between the acknowledgement and reference section in the article once accepted.

Certification and COI Disclosure Form (pdf, 1MB)

CLINICAL TRIALS REGISTRATION

For research that started after September 1st, 2015, the journal requires all clinical trials that prospectively assign human subjects to medical interventions, comparison groups, or control groups for the purpose of examining the potential health effects of such interventions, to be registered in one of several free, publicly accessible, non-profit electronically searchable databases such as the one administered by the National Library of Medicine (NLM), which is located at <http://www.clinicaltrials.gov>.

Submitted manuscripts must include the unique registration number in the abstract as evidence of registration. For details regarding the required minimal registration data set, please go to the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) site at http://www.icmje.org/#clin_trials.

The journal accepts registration in the following registries:

<http://www.clinicaltrials.gov/> (Clinical Trials)

<http://actr.org.au> (Australian Clinical Trials Registry)

<http://isrctn.org> (ISRCTN Register)

<http://www.trialregister.nl/trialreg/index.asp> (Netherlands Trial Register)

<http://www.umin.ac.jp/ctr> (UMIN Clinical Trials Registry)

MANUSCRIPT SUBMISSION

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions:

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for publication of both the print and online format. (and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers.)

Manuscript Submission via Editorial Manager:

Corresponding authors should submit their manuscripts online (<http://www.editorialmanager.com/joga/>) to facilitate even quicker and more efficient processing.

Please note that all correspondence, including proofs for checking and offprint orders, will be sent to the email address of the submitting account via Editorial Manager.

Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing time and shortens overall publication time. In case you encounter any difficulties while

submitting your manuscript online, click on the Get Help Now icon in the upper right corner of your screen.

Author Accounts:

Authors entering the journal's Editorial Manager site can either create a new account or use an existing one. If you already have an account, use it for all your submissions; you can track their status on the same page. If you have forgotten your user ID and password, please enter your mail address in Password Help. You will then receive an automatic e-mail with your user ID and password.

Getting Started:

Once you have logged into your account, Editorial Manager will lead you through the submission process in an orderly, step-by-step process. If you cannot finish your submission in one visit, you can save a draft and re-enter the process later at the same point for that manuscript. While submitting your electronic manuscript, you will be required to enter data about your manuscript in the system. These include full title of the paper, author names and affiliations, and so forth. Support for special font characters is available. At any point during this process, there are Help buttons available for frequently asked questions.

TYPES OF PAPERS

Please specify the word count of the manuscript on the title page based on the word limit for each type of paper.

Review Articles:

- Word limit: not more than 6,000 words (not including references)
- Abstract (unstructured): not more than 250 words
- References: A maximum of 150 references are permitted
- Figures/Tables: at least 1 figure or table

Original Articles:

The Journal of Gastroenterology publishes Alimentary Tract /Liver, Pancreas, and Biliary Tract.

- Word limit: not more than 6,000 words (including references)
- Abstract: not more than 250 words
- Figures/Tables: no more than a combined total of 7 figures and/or tables

Figures/tables exceeding the limit should be submitted as Electronic Supplementary Material.

Letters to the Editor:

The Journal of Gastroenterology welcomes letters to the editor, provided they are related to previously published articles in this journal, and in such cases a copy of the letter will be sent to the previous article's author(s) to invite a response.

- Word limit: not more than 500 words (including references)
- Figures/Tables: not accepted

Other Articles (for editorial):

Other articles cannot exceed 800 words, not including references.

MAIN DOCUMENTS

The documents should be uploaded in Microsoft Word format (DOC/DOCX).

Manuscripts must be typed double-spaced with wide margins. The title page, abstract, key words, text, acknowledgments and references should begin on separate sheets and follow that order. Incomplete or improperly prepared manuscripts will be returned to authors without

review. All manuscripts must be written in English. Authors whose native language is not English should seek the assistance of a colleague who is a native English speaker and is familiar with the field of work.

Title Page:

The title page should include:

- The full name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- Short title (not exceeding 40 letters and spaces)
- Word count of the manuscript

Abstract:

A structured abstract of not more than 250 words is required if not specified.

It should be divided into the following sections:

- Background
- Methods
- Results
- Conclusions

Keywords:

Please provide 3 to 5 keywords which can be used for indexing purposes.

Abbreviations:

Standard abbreviations and units should be used. Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes:

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference.

Text:

The body of the article should be divided into four sections:

- Introduction: The Introduction should state the purpose of the work and provide a concise summary of the rationale for the study or observation.
- Methods: In Methods, observational or experimental subjects should be described clearly. Generic names should be used for drug names. If authors so desire, brand names may be inserted in parentheses. The methods should be stated in sufficient detail to allow other researchers to reproduce the results. The statistical methods used should be outlined in enough detail to enable knowledgeable readers with access to the original data to verify the reported results.
- Results: Results should present findings in a logical sequence, with the minimum number of tables and illustrations necessary for summarizing only important observations.
- Discussion: In the Discussion, new and important findings should be discussed with reference to other reported work, and conclusions should be added. Data and other material provided in the Introduction or the Results section should not be repeated in the Discussion section.

Acknowledgments: Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should

be written in full. All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgments section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chairperson who provided only general support. Editors should ask corresponding authors to declare whether they had assistance with study design, data collection, data analysis, or manuscript preparation.

If such assistance was available, the authors should disclose the identity of the individuals who provided this assistance and the entity that supported it in the published article. Financial and material support should also be acknowledged. Groups of persons who have contributed materially to the paper but whose contributions do not justify authorship may be listed under such headings as "clinical investigators" or "participating investigators," and their function or contribution should be described—for example, "served as scientific advisors," "critically reviewed the study proposal," "collected data," or "provided and cared for study patients."

Reference:

- Citation: Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets.

Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

- Reference list:

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Number references consecutively in the order cited in the text. Accuracy of reference data is the author's responsibility.

Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. If such a citation is from someone other than the author(s), a letter should be submitted in which the direct quotation is given with the signature of the person quoted. Unpublished papers accepted elsewhere may be included in the list by designating the journal followed by (In press) in parentheses. Provide inclusive page numbers for all references. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list. In article citations, list the first three authors only and add "et al."

In principle, only materials published in English can be used as references. When absolutely unavoidable, papers published in a language other than English may be used, but only if they have an English abstract.

• Journal article

– Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999; 36:234–5.

– Parkin DM, Clayton D, Black RJ, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5-year follow-up. *Br J Cancer.* 1996;73:1006–12.

• Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s001090000086

• Book

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

• Book chapter

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology.* London: Academic; 1980. pp. 251–306.

- Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. http://www.rsc.org/dose/title_of_subordinate_document. Accessed 15 Jan 1999.

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>

TABLES

- Use the table functions of your word-processing program, not spreadsheets, to make tables. Tables may be uploaded separately from the main document or inserted into the main document.

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.

- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

- Footnotes to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

FIGURES

- All figures should be numbered using Arabic numerals.

- Figure parts should be denoted by lowercase letters. If illustrations are supplied with upper case labeling, lower case letters will still be used in the figure legends and citations.

- Figures should be cited in the text in consecutive numerical order.

- For each figure, please supply a figure legend (caption).

- All elements in the figure should be identified in the legend.

- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the legend.

- Acceptable formats:

- EPS

- TIFF

- JPEG

- MS Office files (DOC/DOCX)

- Minimum Resolutions:

- Halftone images (e.g. Photographs with fine shading): 300 dpi

- Line art (e.g. Black and white graphic with no shading): 1200 dpi

After acceptance for publication, you will be required to provide figures/illustrations of sufficient quality for printing.

For more information about preparing figures electronically, follow the link (<http://www.springer.com/535>) for Artwork in the right-hand column under "Instructions to authors". To see the instructions, click to the gray arrow.

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL (FOR PUBLICATION)

Electronic Supplementary Material (ESM) for a paper will be published in the electronic edition of this journal. Please select the "Electronic Supplementary Material (for publication)" from the pull-down menu on the system.

- ESM may consist of:

- information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (always use MPEG-1 (.mpg) format).

- information that is more convenient in electronic form, e.g., sequences, spectral data, etc.
- large quantities of original data that relate to the paper, e.g., additional tables, large numbers of illustrations (color and black-and-white), etc.
- Legends must be brief, self-sufficient explanations of the ESM. ESM is to be numbered and referred to as S1, S2, etc.

After acceptance for publication, ESM will be published as received from the author in the online version only. Reference to this material will be given in the printed version. For more information about preparing the ESM, please follow the hyperlink (<http://www.springer.com/535>) to the Electronic Supplementary Material instructions.

OTHER FILES (FOR PEER-REVIEW ONLY)

If you have other supplementary files for peer-review only, please select “Other Files (for peerreview only)” from the pull-down menu on the system.

PDF PROOF BEFORE SUBMISSION

After uploading all the files of the article, the system will convert the files to PDF format. You are required to view the result of the conversion with Adobe Acrobat Reader. Check to see that all data is prepared for review at this point.

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration. The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”). No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your Conclusions No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted. Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results. Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at

submission. Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

Adding and/or deleting authors and/or changing the order of authors at revision stage may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the reason for the change(s) and the contribution role(s) of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.

Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is maintained on the platform, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order Open Choice or offprints. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice:

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. The basic fee for Springer Open Choice is USD 3,000 / EUR 2,200; excl. VAT. Invoicing will be done according to the location of the paying party (designated in the "Bill to" section of the Order Form). Customers providing payment from the Americas will be charged in US dollars, and customers providing payment from Europe, Africa, and Asia will be charged in Euros. For further information, see Springer Open Choice at <http://springer.com/openchoice>.

Copyright Transfer:

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints:

Upon publication the corresponding authors will receive a free eOffprint of their article. Offprints can be ordered by the corresponding author.

Proofreading:

Authors are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. The purpose of the proof is to check for typesetting errors and the completeness and accuracy of the text, tables, and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title, and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First:

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the article can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Open Choice

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative

Commons Attribution License.

Find more about the license agreement

CONTACT INFORMATION

Editorial Office

The Editor, Journal of Gastroenterology,
The Japanese Society of Gastroenterology,
Shimbashi i-Mark Building, 6th Floor,
2-6-2 Shimbashi, Minato-ku,
Tokyo 105-0004, Japan.

Fax: +81 3 6811 2352

e-mail: edi.board@jsge.or.jp