

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

JÉSSICA MEN DE CAMPOS SALGUEIRO

**QUERCETINA PROMOVE EFEITO ANTIOXIDANTE E NEUROPROTETOR NO
ÍLEO E EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO NO RIM, FÍGADO E
PULMÃO DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO
INTESTINAL.**

Maringá

2021

JÉSSICA MEN DE CAMPOS SALGUEIRO

QUERCETINA PROMOVE EFEITO ANTIOXIDANTE E NEUROPROTETOR NO ÍLEO E EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO NO RIM, FÍGADO E PULMÃO DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL.

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

Orientadora: Nilza Cristina Buttow.

Maringá

2021

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

S164q	<p>Salgueiro, Jéssica Men de Campos</p> <p>Quercetina promove efeito antioxidante e neuroprotetor no íleo e efeito antioxidante e anti-inflamatório no rim, fígado e pulmão de ratos submetidos à isquemia e reperfusão intestinal. / Jéssica Men de Campos Salgueiro. – Maringá, PR, 2021. 80 f.color., figs., tabs.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Nilza Cristina Buttow. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Morfológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2021.</p> <p>1. Isquemia intestinal. 2. Estresse oxidativo. 3. Reperfusão intestinal. 4. Inflamação. 5. Sistema nervoso entérico. I. Buttow, Nilza Cristina, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Morfológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.</p> <p>CDD 23.ed. 573.3</p>
-------	---

JÉSSICA MEN DE CAMPOS SALGUEIRO

QUERCETINA PROMOVE EFEITOS ANTIOXIDANTE E NEUROPROTETOR NO ÍLEO E EFEITOS ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO NO RIM, FÍGADO E PULMÃO DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL.

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

Aprovado em: 26/05/2021.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Nilza Cristina Buttow
Universidade Estadual de Maringá

Profª Drª Maria Raquel Marçal Natali
Universidade Estadual de Maringá

Prof Dr Componente da banca
Universidade Estadual de Maringá

Prof Dr. Componente da banca
Universidade Estadual de Maringá

Prof Dr. Componente da banca
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Jéssica Men de Campos Salgueiro é bacharel em biomedicina (2014), pela Universidade Estadual de Maringá, onde desenvolveu alguns projetos de iniciação científica ao longo do curso. Em 2015, na mesma instituição de ensino, ingressou no mestrado do programa de pós-graduação em Ciências Biológicas sob orientação da professora Dr^a Maria Raquel Marçal Natali. Desenvolveu o projeto de pesquisa e defendeu sua dissertação intitulada: “Efeitos da restrição alimentar em ratos diabéticos: parâmetros fisiológicos, bioquímicos e morfológicos do intestino grosso”, obtendo em 2017 sua titulação de mestre. No mesmo ano ingressou no doutorado, sob a orientação da professora Dr^a Nilza Cristina Buttow, e em seu doutorado desenvolveu o projeto de pesquisa visando identificar os efeitos da quercetina em ratos que foram submetidos à isquemia e reperfusão intestinal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus pais (Adilson e Nilva), por todas as oportunidades e esforços sem medidas para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu marido, Mateus, por todo amor e carinho e por estar ao meu lado ao longo de toda esta caminhada, desde o meu mestrado. Ele foi o maior incentivador e apoio que eu tive durante todos estes anos.

À minha sogra, Angela, por ter me ajudado durante esse período todo e pelo carinho de mãe com que sempre me tratou.

À minha orientadora, professora Nilza, por toda paciência e por tudo que me ensinou nestes quatro anos. Mesmo em meio a tantos compromissos, sempre esteve por perto corrigindo o que precisava e me incentivando a buscar uma melhor versão do meu trabalho.

À secretária do PBC-UEM, Érica, por sempre ser tão solícita, prestativa, educada e organizada. Com certeza, uma das melhores profissionais com quem tive o prazer de conviver.

Aos Colegas de laboratório e trabalho, especialmente a Stephanie e a Camila, que foram meu braço direito para que fosse possível realizar todas as técnicas de estresse oxidativo deste trabalho.

A todas as técnicas do laboratório de histologia da UEM (Maria Angela, Sílvia e Ana Paula) que sempre estiveram presentes, ajudando em vários momentos e fazendo com que a concretização deste trabalho fosse possível.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por financiar este estudo e fornecer a bolsa para que fosse possível a minha dedicação ao trabalho.

À UEM (Universidade Estadual de Maringá) e ao PBC (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) por fazerem parte da minha formação acadêmica e pela estrutura que me permitiu desenvolver esta pesquisa.

Agradeço aos membros titulares e suplentes da banca por aceitarem meu convite e contribuírem para a excelência deste trabalho.

Obrigada a todos que de alguma forma fizeram parte deste trabalho!

APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta por dois artigos científicos. O primeiro artigo, investiga os efeitos antioxidante e anti-inflamatório da quercetina no íleo, pulmão, rim e fígado e alterações histológicas no fígado e rim de ratos Wistar que foram submetidos à isquemia intestinal de 45 minutos seguida de um período de reperfusão de 7 dias. Este artigo foi redigido de acordo com as normas da revista científica Journal of Biomedical Sciences (ISSN: 1423-0127).

O segundo artigo foi redigido de acordo com as normas da revista científica Digestive Diseases and Sciences (ISSN: 1573-2568) e investiga o efeito antioxidante e neuroprotetor promovido pelo tratamento com quercetina na mucosa intestinal. Investiga, alterações no trânsito gastrointestinal e na mucosa intestinal promovidas pela isquemia e reperfusão e como o tratamento com a quercetina pode atuar prevenindo ou amenizando os danos causados pela injúria isquêmica. Ambos artigos estão em consonância com as regras do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

RESUMO GERAL

A isquemia e reperfusão (I/R) intestinal é um quadro clínico que pode ser desencadeado por alguns fatores, incluindo procedimentos cirúrgicos, acidentes automobilísticos e doenças inflamatórias intestinais. A injúria causada pela I/R está associada ao quadro de estresse oxidativo, inflamação, alterações histológicas e neuronais no íleo e danos a órgãos remotos. Nosso estudo avaliou o potencial antioxidante e anti-inflamatório da quercetina no íleo, pulmão, fígado e rim. Avaliamos alterações histopatológicas no íleo, fígado e rim e o efeito da quercetina nestas alterações e nos neurônios entéricos mediante um quadro de isquemia intestinal de 45 minutos e reperfusão de 7 dias. Foram utilizados 50 ratos Wistar machos divididos em 5 grupos experimentais: Controle (C), *sham* controle (SC), *sham* tratado com quercetina (STQ), isquêmico controle (IC) e isquêmico tratado com quercetina (ITQ). Nos grupos IC e ITQ a isquemia foi induzida pelo clampeamento da artéria mesentérica superior por 45 minutos seguido de 7 dias de reperfusão. Aos grupos tratados (STQ e ITQ) a quercetina foi administrada via oral na dose de 10mg/Kg por 7 dias. Os parâmetros bioquímicos e inflamatórios dosados no íleo, pulmão, fígado e rim foram: glutathione s-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), hidroperóxidos lipídicos (LOOH), mieloperoxidase (MPO) e n-acetil-glicosaminidase (NAG). Além disso, foram feitas análises de tempo de trânsito gastrointestinal, morfometria e quantificação de neurônios HuC/D⁺ e nNOS⁺. Foram mensurados parâmetros histológicos no íleo, fígado e rim. A I/R promoveu aumento de estresse oxidativo no íleo, pulmão, fígado e rim. Os parâmetros inflamatórios foram alterados principalmente no pulmão e no fígado. O tratamento oral com 10mg/kg de quercetina livre reduziu o estresse oxidativo e inflamação no íleo, rim, fígado e pulmão e atenuou mudanças histológicas que ocorreram no rim e no fígado. Além disso, o tratamento promoveu neuroproteção e auxiliou na manutenção do tempo de trânsito gastrointestinal de ratos submetidos à 45 minutos de isquemia e reperfusão intestinal de sete dias.

PALAVRAS-CHAVE: Isquemia e reperfusão intestinal; Estresse oxidativo; Quercetina; Potencial antioxidante; Íleo; Órgãos remotos.

ABSTRACT

Intestinal ischemia and reperfusion (I/R) is a clinical condition that can be triggered by some factors, including surgical procedures, car accidents and inflammatory bowel diseases. Injury caused by I / R is associated with oxidative stress, inflammation, histological and neuronal changes in the ileum and damage to remote organs. Our study evaluated the antioxidant and anti-inflammatory potential of quercetin in the ileum, lung, liver and kidney. We evaluated histopathological changes in the ileum, liver and kidney and the effect of quercetin on these changes and on enteric neurons by means of a 45-minute intestinal ischemia and reperfusion of 7 days. Fifty (50) male Wistar rats were used, divided into 5 experimental groups: Control (C), *sham* control (SC), *sham* treated with quercetin (STQ), ischemic control (IC) and ischemic treated with quercetin (ITQ). In the IC and ITQ groups, ischemia was induced by clamping the superior mesentery artery for 45 minutes followed by 7 days of reperfusion. To the treated groups (STQ and ITQ) quercetin was administered orally at a dose of 10mg / kg for 7 days. The biochemical and inflammatory parameters measured in the ileum, lung, liver and kidney were: glutathione s-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), lipid hydroperoxides (LOOH), myeloperoxidase (MPO) and n-acetyl-glycosaminidase (NAG). In addition, analyzes of gastrointestinal transit time, morphometry and quantification of HuC / D + and nNOS + neurons were performed. Histological parameters were measured in the ileum, liver and kidney. I / R promoted an increase in oxidative stress in the ileum, lung, liver and kidney. The inflammatory parameters were altered mainly in the lung and liver. Oral treatment with 10mg / kg of free quercetin reduced oxidative stress and inflammation in the ileum, kidney, liver and lung and attenuated histological changes that occurred in the kidney and liver. In addition, the treatment promoted neuroprotection and helped to maintain the gastrointestinal transit time of rats submitted to 45 minutes of ischemia and intestinal reperfusion for seven days.

KEYWORDS: Intestinal ischemia and reperfusion; Oxidative stress; Quercetin; Antioxidant potential; Ileum; Remote organs.

EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO DA QUERCETINA NO ÍLEO, FÍGADO, PULMÃO E RIM DE RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

Jéssica Men de Campos^{1*}, Stephanie Carvalho Borges¹, Camila Quaglio Neves¹, Ana Paula Boromelo² e Nilza Cristina Buttow^{3*}.

* Autores correspondentes: jessicamen.salus@gmail.com; ncbuttow@gmail.com

1. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790 – Jardim Universitário, Maringá, Paraná, 87020-900, Brasil.

2. Graduação em Biologia e Bolsista PIBIC (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica), Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790 – Jardim Universitário, Maringá, Paraná, 87020-900, Brasil.

3. Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, Bloco H79 – Jardim Universitário, Maringá, Paraná, 87020-900, Brasil.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A isquemia/reperfusão (I/R) intestinal é um quadro clínico desencadeado por diversos fatores, incluindo procedimentos cirúrgicos, acidentes automobilísticos e doenças inflamatórias intestinais. A injúria causada por I/R está associada ao aumento do estresse oxidativo, inflamação e alterações histopatológicas no íleo e em órgãos distantes. Nosso estudo avaliou o potencial antioxidante e anti-inflamatório da quercetina no íleo, fígado, pulmão e rim mediante um quadro de isquemia intestinal de 45 minutos e reperfusão de 7 dias. **MÉTODOS:** A isquemia foi induzida pelo clampeamento da artéria mesentérica superior por 45 minutos seguido por reperfusão de 7 dias. A quercetina foi administrada via oral na dose de 10 mg/kg por 7 dias. Íleo, rim, fígado e pulmão foram analisados. Os parâmetros bioquímicos e inflamatórios estudados foram: glutathione s-transferase (GST), glutathione (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), hidroperóxidos lipídicos (LOOH), mieloperoxidase (MPO) e n-acetil-glucosaminidase (NAG). Além disso, também foram mensurados parâmetros histológicos no rim e no fígado. **RESULTADOS:** A isquemia e reperfusão intestinal (I/R) ocasionaram redução de GSH no íleo, pulmão e fígado e aumento de LOOH no íleo. Promoveu, também, aumento na atividade enzimática da SOD e da CAT no íleo, pulmão e fígado e aumento na atividade enzimática do GST no pulmão e rim. A MPO aumentou no pulmão e fígado, e a NAG aumentou somente no pulmão. Além disso, IR promoveu redução na densidade de hepatócitos. O tratamento com quercetina preveniu todas as alterações no íleo e pulmão. No fígado evitou as alterações histológicas. No rim, não foi capaz de prevenir as alterações de GST. E no fígado não foi capaz de evitar as alterações de GSH e CAT. **CONCLUSÃO:** O tratamento oral com quercetina reduziu o estresse oxidativo e inflamação no íleo, rim fígado e pulmão e atenuou mudanças morfológicas que ocorreram no rim e no fígado de ratos submetidos à isquemia/reperfusão intestinal.

Palavras-chave: Isquemia e reperfusão intestinal; Estresse oxidativo; Quercetina; Potencial antioxidante; Histopatologia.

INTRODUÇÃO

A isquemia intestinal (I/R) é uma patologia que ocorre na ausência ou redução do fluxo sanguíneo arterial e/ou venoso intestinal, decorrente da obstrução aguda ou crônica das artérias ou veias viscerais do tronco cefálico, da artéria mesentérica superior ou da artéria mesentérica inferior e/ou veias correspondentes (1). As causas da I/R são múltiplas e estão associadas principalmente a quadros de embolia, traumas, hérnias, trombose venosa profunda, hipotensão, vasoespasma induzido por drogas vasoativas, choque hemorrágico, cirurgias do trato gastrointestinal, processos infecciosos e inflamatórios e alterações na cascata de coagulação sanguínea (2).

A isquemia seguida de reperfusão desencadeia muitos processos biológicos que, juntos, induzem danos ao órgão que sofreu a I/R e a órgãos distantes (3). Estes danos são induzidos por inflamação, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs), aumento de óxido nítrico e permeabilidade vascular, e comprometimento da integridade da barreira intestinal (4). Durante a reperfusão a resposta imune inata e humoral são desencadeadas, e muitas células de defesa são recrutadas para o local da lesão, a fim de atenuar a injúria tecidual. O infiltrado inflamatório de neutrófilos e macrófagos no tecido libera mediadores inflamatórios, citocinas, eicosanóides e recrutam mais células, que são responsáveis por agravar ainda mais a lesão induzida por I/R e induzir a produção de espécies reativas (5).

A formação de espécies reativas promove danos a várias biomoléculas encontradas nos tecidos como membranas, lipídios, ácidos nucleicos, enzimas e receptores. Com as membranas danificadas há o comprometimento da barreira intestinal e da sua permeabilidade, facilitando a translocação das bactérias intestinais e produção de mediadores inflamatórios e EROs em órgãos distantes (5,6). Este fenômeno contribui substancialmente para o comprometimento de órgãos como pulmão, coração, rim e fígado e respostas inflamatórias sistêmicas durante e após os quadros de I/R intestinal (6).

Devido a esta grande produção de EROs na I/R intestinal, o uso de antioxidantes para reduzir os danos aos tecidos é uma ótima alternativa de tratamento (7). A quercetina é um dos flavonóides naturais mais abundantes na alimentação, está presente em chás, frutas vegetais, grãos e oleaginosas. É uma

substância bem conhecida e que promove uma variedade de efeitos protetores. Sua propriedade antioxidante é direcionada para alguns pontos específicos durante a formação de radicais livres, atua na inibição da enzima xantina oxidase, possui capacidade de quelar íons ferro que farão parte da reação de Fenton e na captura de espécies reativas neutralizando-as pela capacidade que possuem de se ligarem às espécies reativas por meio de seus grupamentos (OH-) (8). O estudo de Suganthy e colaboradores documentou que além da quercetina exercer um importante papel antioxidante, atua também, na regulação da resposta inflamatória por meio da modulação de expressão do fator nuclear eritróide-2 (NRF-2) e supressão do NF-κB (9).

Existem poucos estudos publicados associando o uso da quercetina como tratamento para amenizar os danos causados pela isquemia intestinal de 45 minutos e reperfusão de 7 dias. Para este período de reperfusão encontramos poucas evidências de como o intestino e órgãos distantes são afetados e possíveis tratamentos para este quadro, especificamente.

Portanto, tendo em vista o potencial da quercetina em inibir enzimas oxidativas e neutralizar espécies reativas, em nosso trabalho fizemos as dosagens de várias moléculas e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, para avaliar o potencial antioxidante da quercetina diante de um quadro de I/R, avaliando não só intestino, mas também, fígado, pulmão e rim. Para estes mesmo órgãos realizamos dosagens de enzimas presentes na inflamação para avaliar o potencial antiinflamatório da quercetina, já que esta substância é conhecida por atuar inibindo alguns mediadores responsáveis por etapas importantes da cascata inflamatória. E, para embasar os resultados bioquímicos encontrados após I/R e tratamento com quercetina, realizamos a análise histopatológica de fígado e rim para evidenciar o efeito protetor da quercetina.

METODOLOGIA

Animais e tratamento

Foram utilizados 50 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*; 264 ± 3,643 g) com 60 dias de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, mantidos individualmente em caixas de polipropileno no Biotério do Departamento de Ciências Morfológicas, com iluminação de claro e escuro de 12 horas e

temperatura controlada de 22 °C ± 2 °C. O delineamento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (nº do protocolo: 7373240417) e estão de acordo com os princípios éticos adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

Os ratos passaram por uma semana de aclimação no biotério, e durante todo período que permaneceram em tratamento receberam ração padrão para roedores (NUVILAB, recomendada pela U.S. National Institutes of Health) e água *ad libitum*. Foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos (n = 10/grupo) (Tabela 1): grupo controle (C), grupo sham controle (SC), grupo sham tratado com quercetina (STQ), grupo isquêmico controle (IC) e grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ).

O tratamento dos grupos ITQ e STQ teve início 2 horas antes da cirurgia e até o fim do período de 7 dias de reperfusão. Para ser administrada aos animais, a quercetina foi dissolvida em água filtrada com pH: 7,4 (veículo), ajustado com NaOH 0,1M. O tratamento foi realizado via gavagem com 10 mg de quercetina/kg de peso corporal. Os grupos C, SC e IC foram tratados apenas com o veículo antes e nos dias subsequentes à cirurgia.

Tabela 1. Grupos experimentais e tratamento. S: *sham* (grupo submetido ao processo cirúrgico, com exposição do íleo por 45 min e a AMS não ocluída); I: isquemia/reperfusão (grupo submetido ao processo cirúrgico, com exposição do íleo e oclusão da AMS por 45 min).

Grupos		AMS ^a	Tratamento
C	Não operado	-	Veículo
SC	Submetido à cirurgia	Não ocluída	Veículo
STQ	Submetido à cirurgia	Não ocluída	Quercetina
IC	Submetido à cirurgia	Ocluída	Veículo
ITQ	Submetido à cirurgia	Ocluída	Quercetina

^a: Artéria Mesentérica Superior

Procedimento cirúrgico para isquemia

Os animais permaneceram em jejum por 15 horas antes do procedimento cirúrgico. Os ratos de todos os grupos foram anestesiados via intramuscular com uma mistura de 20 mg/Kg de xilazina (Sespo Indústria e Comércio, Paulínia, SP, Brasil) e 100 mg/kg de ketamina (Sespo Indústria e Comércio, Paulínia, SP, Brasil), todos os grupos foram submetidos à laparotomia abdominal, exceto o grupo controle.

Os grupos *sham* (SC e STQ) foram anestesiados, submetidos à laparotomia abdominal, exposição do íleo, porém, a artéria mesentérica superior e irrigação lateral não foram obstruídas, portanto não sofreram a injúria isquêmica. Nos grupos isquêmicos (IC e ITQ) a artéria mesentérica superior foi ocluída por um *clamp* para causar a injúria da I/R, e a irrigação lateral entre as regiões isquêmicas e não isquêmicas foi bloqueada por meio de amarrações. Após 45 min de isquemia, o *clamp* e as amarrações foram removidos, e o fluxo sanguíneo restabelecido (reperusão). O abdômen foi suturado com linha de nylon. O período de reperusão e de tratamento teve duração de 7 dias e neste período os animais foram mantidos em caixas individuais de polipropileno.

Coleta dos órgãos

Os ratos foram eutanasiados com uma dose letal de 120 mg/Kg de tiopental sódico (Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, SP, Brasil). Foi realizada a laparotomia abdominal e coletada do íleo, fígado, rins e pulmão.

O intestino teve seu comprimento total mensurado e os demais órgãos coletados foram pesados. O íleo, rim direito, pulmão direito e lóbulo esquerdo do fígado de cada animal foram coletados e destinados à realização das técnicas para avaliar biomarcadores de estresse oxidativo e parâmetros inflamatórios. O rim esquerdo e lóbulo direito do fígado foram destinados às técnicas de análise histológica.

Ensaio bioquímico para estresse oxidativo e parâmetros inflamatórios

Todas as análises descritas a seguir foram realizadas separadamente para fígado, rim e pulmão em todos os grupos experimentais (n = 7/grupo).

Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) e níveis de glutathione redutase (GSH) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

As atividades enzimáticas da SOD e GST foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Borges et al (36).

Atividade enzimática da catalase (CAT)

A determinação da atividade da CAT em cada órgão analisado foi realizada com base no método de Aebi (10). Uma porção de cada um dos órgãos foi homogeneizada em tampão fosfato 200 mM (pH 6,5). Em uma placa de 96 poços foi adicionado 150 µl da solução mix de 2,5 ml de tampão Tris-HCl EDTA 0,1M (pH 8,5), 47,35 ml de água destilada e 172,5 µl de H₂O₂ e em seguida foi adicionado 5 µl da amostra. A absorbância foi então medida a 240 nm e os resultados foram expressos em µmol/min/mg de proteína.

Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG)

Para inflamação, os níveis enzimáticos de MPO e NAG foram avaliados em todos os órgãos. O pellet foi ressuscitado 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 (H₂O₂) com tetrametilbenzidina na amostra. A absorbância de 620 nm demonstrou resultados em mD.O./mg de proteína. Para a NAG a solução com n-

acetil-glicosaminidase foi adicionada a amostra na presença de tampão citrato. A leitura em 405 nm demonstrou resultados em mD.O./mg de proteína.

Processamento histológico do rim e fígado

As análises histológicas foram realizadas por meio da coloração hematoxilina-eosina (HE), seguindo o protocolo padrão de execução desta técnica que segue seis principais etapas: fixação em solução de paraformaldeído 4% (pH = 7,4), desidratação em soluções com concentrações crescentes de álcool, diafanização em xilol, inclusão em parafina, microtomia (cortes semi-seriados com 6 μm de espessura, em micrótomo Leica RM 2145), coloração e montagem das lâminas (Permount®).

Os cortes histológicos corados com HE foram visualizados sob microscópio óptico (Olympus BX41 acoplado à câmera de alta resolução Q Color 3 Olympus American INC). Para as lâminas de rim foram capturadas 30 imagens/animal com objetiva de 10x e para as lâminas de fígado foram capturadas 30 imagens/animal com objetiva de 20x. Para as imagens de fígado foi padronizado a captura sempre com uma veia lobular no centro da imagem.

Determinação da densidade de hepatócitos

Foram contados, com auxílio do software ImagePro Plus®, os hepatócitos de 30 imagens/animal, em uma área total de 7,68 mm^2 e os resultados foram expressos em hepatócitos/ mm^2 .

Determinação da densidade e morfometria dos corpúsculos renais

Para determinar a densidade dos corpúsculos, foram contados todos os corpúsculos presentes nas 30 imagens/animal, em uma área total de 88,9 mm^2 . Os resultados foram expressos em corpúsculos/ mm^2 .

A morfometria foi realizada a partir da mensuração da área ocupada pelo corpúsculo, esta medida foi feita para 100 corpúsculos/animal e o resultado foi

expresso em μm^2 . Estas análises foram realizadas com auxílio do software ImagePro Plus[®].

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 7. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Para dados paramétricos foi realizada a análise de variância one-way (ANOVA), seguido de pós teste de Tukey. E para dados não paramétricos foi realizado teste Kruskal-Wallis, seguido de pós teste de Dunns. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Estresse oxidativo e parâmetros inflamatórios

Como representado na tabela 2, as análises de estresse oxidativo e parâmetros inflamatórios foram realizadas para íleo, pulmão, fígado e rim em todos os grupos experimentais, sendo eles representados por: controle (C), *sham* controle (SC), *sham* tratado com quercetina (STQ), isquêmico controle (IC) e isquêmico tratado com quercetina (ITQ).

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no pulmão e no fígado apresentaram o mesmo padrão de alteração, em ambos os órgãos houve aumento significativo da atividade no grupo IC em relação grupo C ($p = 0,035$ e $p = 0,042$, respectivamente) e redução no grupo ITQ em relação ao IC ($p = 0,045$ e $p = 0,019$, respectivamente).

No pulmão foi observada alteração na atividade da enzima catalase (CAT), houve aumento da sua atividade no grupo IC em relação aos grupos C e SC ($p = 0,044$ e $p = 0,049$, respectivamente), ao passo que o grupo ITQ apresentou redução em relação ao grupo IC ($p = 0,016$). Em relação ao fígado, houve aumento apenas no grupo IC em relação ao grupo C ($p = 0,03$).

Os níveis de glutathiona redutase (GSH) apresentaram-se alterados apenas nas dosagens realizadas para pulmão e fígado, no pulmão o grupo IC reduziu de forma significativa em relação aos grupos C, SC e STQ ($p = 0,0039$; $p = 0,020$; $p = 0,003$, respectivamente). Neste mesmo órgão o grupo ITQ apresentou aumento nos níveis de GSH em relação ao grupo IC ($p = 0,019$). No fígado as alterações foram significativas apenas no grupo IC, que apresentou redução em relação aos grupos C e SC ($p = 0,0017$ e $p = 0,015$, respectivamente).

Dentre as dosagens realizadas para avaliar estresse oxidativo e parâmetros inflamatórios, a atividade enzimática da enzima glutathiona s-transferase (GST) foi o único parâmetro que apresentou alteração para os três órgãos analisados (pulmão, fígado e rim). No pulmão a atividade de GST aumentou no grupo IC em relação ao grupo C ($p = 0,017$) e reduziu no grupo ITQ em relação ao grupo IC ($p = 0,013$). No fígado a alteração foi significativa para o grupo ITQ, que demonstrou redução em relação ao grupo IC ($p = 0,028$) e no rim os níveis do grupo IC aumentaram em relação aos grupos C e STQ ($p = 0,018$ e $p = 0,041$, respectivamente).

Alteração nos níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) foi observada apenas no pulmão, neste órgão houve aumento dos níveis de LOOH no grupo STQ em relação aos grupos C e SC ($p = 0,0036$ e $p = 0,024$, respectivamente) e redução de LOOH no grupo ITQ em relação ao grupo STQ ($p = 0,001$).

Por fim, foram realizadas as análises de parâmetros inflamatórios, por meio das dosagens de n-acetil-glucosaminidase (NAG) e mieloperoxidase (MPO). No rim não houve alteração para ambas as enzimas. No fígado apenas a atividade da MPO apresentou alterações significativas, no grupo IC houve aumento em relação aos grupos C e STQ ($p = 0,012$ e $p = 0,04$, respectivamente) e no grupo ITQ houve redução em relação ao grupo IC ($p = 0,016$). No pulmão a atividade da NAG no grupo IC apresentou aumento em relação ao grupo C ($p = 0,011$) e o grupo ITQ redução em relação ao grupo IC ($p = 0,0028$). Ainda no pulmão, a atividade da MPO apresentou aumento no grupo IC em relação aos grupos C e SC ($p = 0,0028$ e $p = 0,01$, respectivamente) e o grupo ITQ redução em relação ao grupo IC ($p = 0,03$).

Análise histológica do rim

Na figura 1 estão representados os resultados das análises histológicas do rim, que se dividiram em densidade e morfometria do corpúsculo renal. Quando à densidade do corpúsculo observou-se uma redução no grupo SC em relação ao grupo C ($p = 0,035$) e aumento na densidade do grupo ITQ em relação ao grupo SC ($p = 0,016$).

Análise histológica do fígado

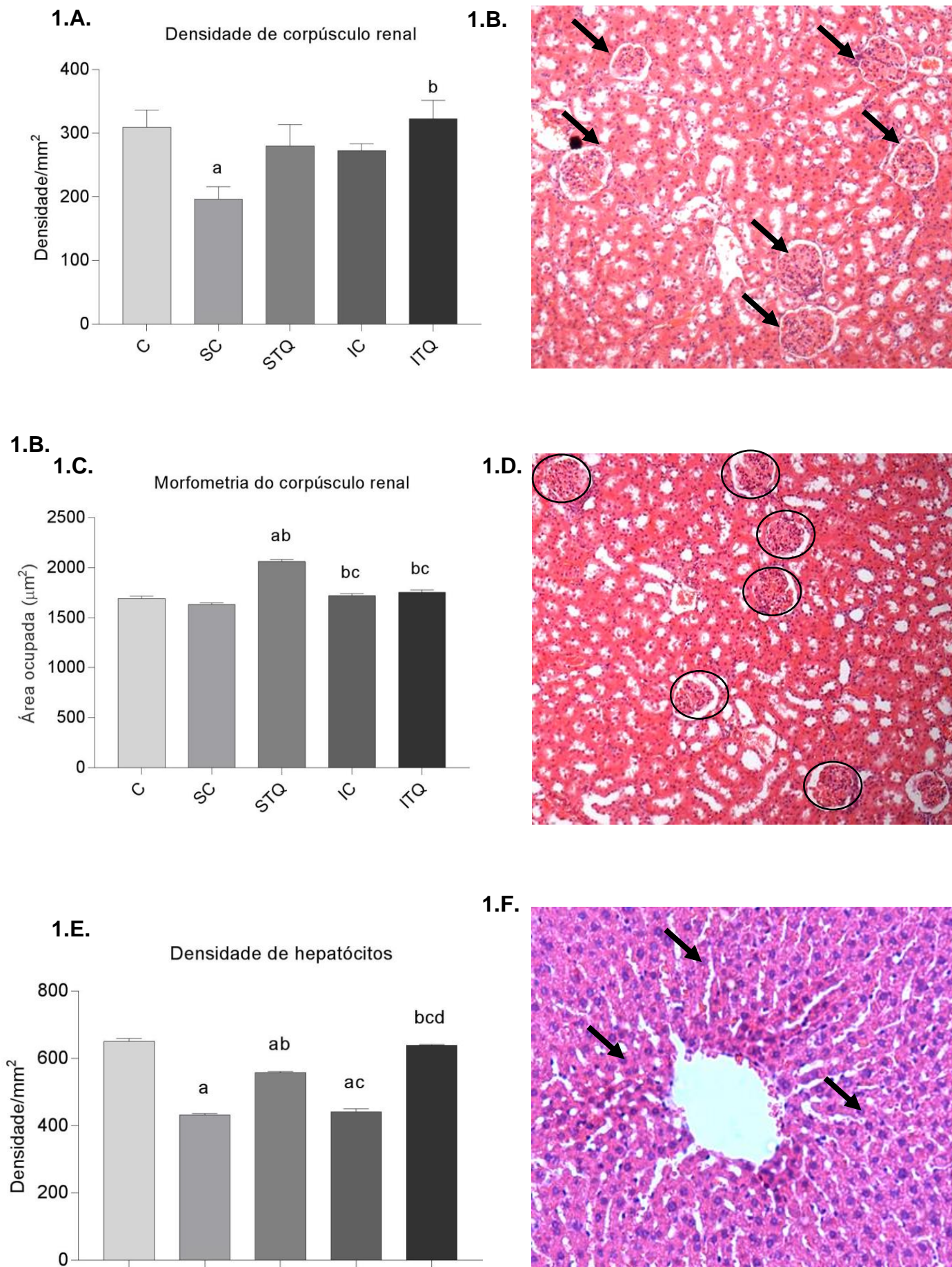
A figura 1 representa, também, as alterações histológicas encontradas no fígado quanto à densidade de hepatócitos. Para este parâmetro houve redução significativa da densidade de hepatócitos para os grupos SC, STQ e IC em relação ao grupo C ($p < 0,0001$) para todas as comparações estatísticas). Observou-se aumento na densidade do grupo STQ em relação ao grupo SC ($p < 0,0001$) e do grupo ITQ em relação ao grupo SC, STQ e IC ($p < 0,0001$) para todas as comparações estatísticas).

Tabela 2. Ensaio bioquímico de estresse oxidativo para íleo, pulmão, rim e fígado. ^a: diferença significativa do grupo C; ^b: diferença significativa do grupo SC; ^c: diferença significativa do grupo STQ; ^d: diferença significativa do grupo IC. Os dados foram expressos como média ± erro padrão (n = 7)

ÓRGÃO	PARÂMETROS AVALIADOS	C	SC	STQ	IC	ITQ
ÍLEO	GSH (µg/g de tecido)	971,8 ± 27,4	722,9 ± 60,1 ^a	1208 ± 65,2 ^{ab}	717,8 ± 45,4 ^{ac}	1165 ± 45,7 ^{bd}
	LOOH (mmol/mg de tecido)	66,1 ± 1,1	73,3 ± 2,3	64,76 ± 1,6 ^b	75 ± 1,1 ^{ac}	66,1 ± 2,7 ^d
	SOD (U SOD/mg de proteína)	0,17 ± 0,0085	0,23 ± 0,016 ^a	0,18 ± 0,01	0,23 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,005 ^{bd}
	GST (µmol/min/mg de proteína)	3,6 ± 0,38	3,7 ± 0,39	2,82 ± 0,49	4,05 ± 0,32	2,8 ± 0,5
	MPO (mD.O./mg de proteína)	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,008
	NAG (mD.O./mg de proteína)	0,08 ± 0,004	0,12 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,007	0,10 ± 0,004	0,09 ± 0,006
	CAT (µmol/min/mg de proteína)	0,39 ± 0,03	0,41 ± 0,07	0,38 ± 0,03 ^b	0,72 ± 0,08 ^{ac}	0,35 ± 0,03 ^d
PULMÃO	GSH (µg/g de tecido)	836,6 ± 120,9	749,9 ± 122,7	849,7 ± 59,51	316,5 ± 60,7 ^{abc}	752,8 ± 82,07 ^d
	LOOH (mmol/mg de tecido)	49,76 ± 0,8	50,44 ± 0,6	53,35 ± 0,4 ^{ab}	50,89 ± 0,4	49,49 ± 0,7 ^c
	SOD (U SOD/mg de proteína)	1,17 ± 0,1	1,26 ± 0,06	1,38 ± 0,14	1,67 ± 0,1 ^a	1,18 ± 0,10 ^d
	GST (µmol/min/mg de proteína)	0,009 ± 0,0004	0,01 ± 0,0005	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,002 ^a	0,009 ± 0,001 ^d
	MPO (mD.O./mg de proteína)	0,07 ± 0,006	0,08 ± 0,004	0,12 ± 0,02	0,18 ± 0,027 ^{ab}	0,09 ± 0,014 ^d

	NAG (mD.O./mg de proteína)	1,91 ± 0,21	2,37 ± 0,11	2,26 ± 0,50	3,60 ± 0,47 ^a	1,63 ± 0,16 ^d
	CAT (µmol/min/mg de proteína)	0,008 ± 0,0007	0,009 ± 0,0007	0,009 ± 0,001	0,01 ± 0,001 ^{ab}	0,008 ± 0,004 ^d
RIM	GSH (µg/g de tejido)	1041 ± 105,7	1025 ± 131,5	1064 ± 81,7	875 ± 77,42	878,1 ± 80,4
	LOOH (mmol/mg de tejido)	77,65 ± 0,91	76,48 ± 1,08	76,31 ± 0,88	77,94 ± 1,07	73,78 ± 1,59
	SOD (U SOD/mg de proteína)	1,38 ± 0,05	1,76 ± 0,14	1,34 ± 0,07	1,83 ± 0,22	1,37 ± 0,17
	GST (µmol/min/mg de proteína)	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,03 ± 0,002 ^{ac}	0,02 ± 0,0008
	MPO (mD.O./mg de proteína)	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,09 ± 0,009	0,15 ± 0,027	0,12 ± 0,017
	NAG (mD.O./mg de proteína)	1,82 ± 0,19	1,90 ± 0,14	1,79 ± 0,17	2,11 ± 0,24	1,78 ± 0,16
	CAT (µmol/min/mg de proteína)	0,05 ± 0,003	0,06 ± 0,006	0,05 ± 0,004	0,06 ± 0,008	0,06 ± 0,004
	GSH (µg/g de tejido)	1583 ± 22,8	1485 ± 86,0	1424 ± 53,4	1091 ± 138,7 ^{ab}	1316 ± 58,4
	LOOH (mmol/mg de tejido)	76,9 ± 1,38	76,6 ± 1,7	76,5 ± 1,03	79,0 ± 1,30	76,7 ± 0,73
FÍGADO	SOD (U SOD/mg de proteína)	1,26 ± 0,12	1,51 ± 0,10	1,49 ± 0,06	1,69 ± 0,09 ^a	1,22 ± 0,10 ^d
	GST (µmol/min/mg de proteína)	0,08 ± 0,005	0,08 ± 0,004	0,08 ± 0,007	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,0005 ^d
	MPO (mD.O./mg de proteína)	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,02 ^{ac}	0,11 ± 0,009 ^d
	NAG (mD.O./mg de proteína)	0,97 ± 0,09	1,15 ± 0,08	1,13 ± 0,07	1,29 ± 0,10	1,11 ± 0,05
	CAT (µmol/min/mg de proteína)	0,06 ± 0,009	0,06 ± 0,008	0,07 ± 0,009	0,10 ± 0,009 ^a	0,06 ± 0,009

Figura 1.





Figuras 1. **1.A.** Gráfico da densidade de corpúsculo renal/mm². **1.B.** Corte histológico do rim (aumento 10x) corado com hematoxilina-eosina (HE) e as setas indicam os corpúsculos renais quantificados. **1.C.** Gráfico da área ocupada (μm²) pelos corpúsculos renais. **1.D.** Corte histológico do rim (aumento 10x) corado com HE e as setas indicam como foi realizada a medida da área ocupada pelos corpúsculos. **1.E.** Gráfico da densidade de hepatócitos/mm². **1.F.** Corte histológico do fígado (aumento 20x) corado com HE. Ao centro localiza-se a artéria esplênica central e as setas indicam os hepatócitos quantificados. ^a: diferença significativa do grupo C; ^b: diferença significativa do grupo SC; ^c: diferença significativa do grupo STQ; ^d: diferença significativa do grupo IC. Os dados foram expressos como média ± erro padrão (n = 5).

DISCUSSÃO

1.D.

A I/R intestinal é capaz de promover danos no intestino e em órgãos remotos. Estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos da isquemia no intestino e em diferentes órgãos, com tempos de reperfusão que variam entre uma hora e três dias (11). Estes estudos demonstram que a isquemia e reperfusão intestinal promovem inflamação e estresse oxidativo em órgãos como fígado (12), rins (13) e pulmões (14). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da I/R com tempo de reperfusão de 7 dias. Nossos estudos demonstraram que a isquemia de 45 minutos, mesmo seguida de reperfusão de 7 dias, ainda apresenta estresse oxidativo e inflamação no intestino, pulmão, rins e fígado dos ratos e o tratamento com 10 mg/kg de peso corporal foi capaz de amenizar estas alterações. Lindestron e colaboradores (15) estudaram as alterações provocadas pela I/R intestinal no íleo, iniciando com uma hora até 10 semanas de reperfusão e observaram que as modificações continuam ocorrendo mesmo após as primeiras semanas de reperfusão.

Nosso estudo demonstrou que o íleo, mesmo após 7 dias de reperfusão, ainda apresenta alterações nos parâmetros de estresse oxidativo. Dentre as alterações observadas houve um aumento nos níveis de LOOH indicando que este órgão apresentou peroxidação lipídica o que pode danificar as membranas celulares (16) e

causar morte celular. O aumento da atividade de enzimas antioxidantes como SOD e CAT também foram observados. A SOD é responsável por degradar ânions superóxidos e a CAT por degradar o peróxido de hidrogênio. Aumento nos níveis dessas duas moléculas pode causar injúria às células e aos tecidos afetados. O mecanismo antioxidante endógeno atua eliminando espécies radicalares e não radicalares, na tentativa de impedir o surgimento de um quadro de estresse oxidativo (17). A I/R também causou redução nos níveis de GSH no íleo do grupo IC. O GSH atua como cofator na atividade das enzimas glutathionaperoxidase e da glutathiona S-transferase. Uma diminuição nos níveis de GSH pode indicar que essa molécula esteja sendo consumida na tentativa de eliminar espécies reativas. Apesar disso, após 7 dias de reperfusão não observamos alteração na atividade da enzima GST no grupo IC. Apesar de termos verificado que a isquemia de 45 minutos seguida de 7 dias de reperfusão alterou vários parâmetros de estresse oxidativo, observamos que os parâmetros inflamatórios avaliados (MPO e NAG) se mantiveram semelhantes ao do grupo controle. As alterações relacionadas a estresse oxidativo e parâmetros inflamatórios causados pela isquemia no íleo foram menos expressivas quando comparadas a órgãos remotos como pulmão e fígado. No íleo as alterações foram principalmente nos níveis de LOOH, SOD e CAT, estes parâmetros se mostraram aumentados em relação ao grupo controle.

Durante a I/R intestinal ocorre no intestino a redução da oxigenação do tecido, com conseqüente redução de ATP, aumento das EROs e um desbalanço metabólico e enzimático que promove o comprometimento da barreira epitelial (18). Nadatani e colaboradores (19) descrevem que a depleção de ATP causada pela isquemia contribui para o afrouxamento das junções intercelulares nas células intestinais. Esta ruptura da barreira epitelial promove a translocação bacteriana a qual pode comprometer outros órgãos (20). As bactérias caem na corrente sanguínea e migram para órgãos como fígado, pulmão e rins. Nestes órgãos se ligam a receptores tipo Toll-like (TLR), que são proteínas transmembranas que compõe uma parte do sistema imune inato. Sendo estes responsáveis pelo reconhecimento de diferentes patógenos (20).

Dentre estes receptores, temos os receptores TLR2 que reconhecem lipopolissacarídeos (LPS) expressos em bactérias gram negativas e os TLR-4 que reconhecem proteoglicanos expressos em bactérias positivas (21,22). A ligação dos patógenos a estes receptores são capazes de desencadear uma resposta

inflamatória no órgão no qual se encontram (23). Sendo assim, o processo inflamatório desencadeado pela translocação bacteriana seria o grande responsável pela injúria oxidativa em outros órgãos que não sofreram diretamente a isquemia (23,24).

Sendo órgão de primeira passagem, o fígado é um dos órgãos que com 7 dias de reperfusão é bastante afetado. No grupo IC, a I/R intestinal promoveu aumento na atividade da MPO, demonstrando a presença de neutrófilos no tecido, uma provável resposta inflamatória, decorrente da translocação bacteriana (19). Além disso, também observamos que no grupo IC a I/R promoveu redução nos níveis de GSH e aumento na atividade da SOD e da CAT. Apesar de termos encontrado essas alterações nos parâmetros de estresse oxidativo, verificamos que os níveis de LOOH nos grupos que sofreram a isquemia não se apresentavam alterados no tempo de reperfusão analisado. É possível que o aumento na atividade das enzimas antioxidantes promova um mecanismo compensatório e diminua os níveis de espécies reativas, justificando a manutenção nos níveis de LOOH no tecido (16). Na avaliação da densidade de hepatócitos, os resultados complementam àqueles encontrados nos parâmetros de estresse oxidativo e inflamação. Ao analisar nossos resultados, verificamos que o grupo IC apresentou redução significativa em relação ao grupo controle. Podemos relacionar essa alteração na densidade de hepatócitos à injúria oxidativa e inflamatória encontrada nesse grupo. Além disso, também verificamos que o grupo SC também apresentou redução significativa na densidade de hepatócitos. No entanto, em nossos resultados não encontramos alterações nos parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo nesse grupo. Provavelmente, outros fatores podem estar envolvidos nessas alterações indicando que apenas a laparotomia podem causar prejuízos relevantes ao fígado. Ghizoni e colaboradores (25) avaliando ratos artríticos observaram redução na densidade de hepatócitos associada ao aumento do estresse oxidativo e inflamação no fígado.

Outro órgão remoto afetado pela I/R intestinal é o pulmão. Dependendo do tempo de exposição à injúria e da severidade da lesão, os efeitos deletérios podem ser graves e até mesmo irreversíveis (26). Em nosso estudo foi o órgão mais afetado pela isquemia no grupo IC, apresentando a maior parte dos parâmetros de estresse oxidativo e inflamação alterados. Mesmo sendo um órgão distante do local da injúria, o pulmão apresenta alta vulnerabilidade durante o quadro de I/R intestinal. Isto se deve, provavelmente, ao fato de ser um órgão muito vascularizado, facilitando a

permeabilidade vascular, inflamação local e liberação de mediadores inflamatórios (27). Esse órgão torna-se então, um local propício para reações inflamatórias induzidas pela ligação das bactérias e seus subprodutos nos receptores TLR que favorecem a formação de muitas espécies reativas (28). Observamos um aumento na atividade das enzimas antioxidantes endógenas SOD, GST e CAT e no grupo IC. A GSH apresentou redução indicando um estado de estresse oxidativo relevante. Dentro dos parâmetros inflamatórios analisados tanto MPO quanto NAG tiveram aumento expressivo nos pulmões, indicando um quadro inflamatório.

Os rins apesar de serem órgãos que exercem funções de filtração e de detoxificação não foram tão afetados após 7 dias de reperfusão. Estudos prévios em ratos demonstram que a expressão de moléculas como a xantina oxidase, lactato desidrogenase e ácido úrico, que indicam um quadro de estresse oxidativo, podem estar alteradas no rim em casos de disfunções circulatórias, inclusive a I/R (29,30).

Considerando que as principais alterações causadas pela I/R são provocadas pelo estresse oxidativo e inflamação, o uso de substâncias que apresentam potencial terapêutico comprovado com ação antioxidante e anti-inflamatória são úteis para aplicação e tratamento contra a injúria por I/R (31). Os flavonóides, dentre eles a quercetina, tem demonstrado propriedades necessárias para o uso nestas condições. Este flavonóide atua diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio pela inibição de enzimas como a ciclooxigenase, lipoxantina oxidase, e xantina oxidase, que fazem parte do sistema enzimático que dá origem a espécies reativas (32). Possui a capacidade de quelar íons metálicos que podem iniciar a produção de radicais livres pela reação de Fenton ou atua diretamente em enzimas antioxidantes (33). Também pode atuar diretamente na captura de espécies reativas por meio dos seus grupamentos (-OH), que possuem a capacidade de interagir com radicais livres neutralizando-os (33).

Os metabólitos da quercetina são distribuídos por todos os tecidos e atuam em diversos órgãos. Quando administrada por via oral, seu primeiro sistema de passagem é o trato gastrointestinal, passando pelas primeiras modificações no estômago e, principalmente no intestino, onde é absorvida. Em seguida o fígado e todo o aparato enzimático ali presente, são responsáveis por metabolizar grande parte da quercetina e redistribuí-la, via corrente sanguínea para os demais órgãos (34,35).

No íleo, os resultados de parâmetros de estresse oxidativo e inflamação no grupo isquêmico tratado com quercetina, demonstram uma melhora com os valores semelhantes ao grupo controle. Resultados semelhantes foram encontrados por Borges e colaboradores (36) quando utilizaram resveratrol para tratar lesão isquêmica em ratos que passaram por 45 minutos de isquemia seguida de 7 dias de reperfusão.

No fígado observamos que os valores na atividade enzimática da SOD, GST e MPO no grupo ITQ permaneceram semelhantes ao grupo controle. Neste mesmo grupo a GSH também apresentou valores semelhantes ao grupo controle. Por ser um órgão com grande capacidade de regeneração, o fígado teve sua recuperação favorecida, também, pelo tempo de reperfusão e pelo tratamento. Lee e colaboradores (37) demonstraram que a quercetina, exerce ação hepatoprotetora, prevenindo ou amenizando casos de esteatose, inflamação e injúria celular.

Como pudemos observar, em nosso estudo, dentre os órgãos estudados, os pulmões foram os mais afetados pela injúria de I/R intestinal após 7 dias de reperfusão. Por ser um órgão altamente vascularizado, os pulmões são influenciados tanto pelos efeitos deletérios da I/R intestinal quanto pelos efeitos de drogas utilizadas (38). Desta forma, a quercetina apresentou um efeito antioxidante positivo no grupo ITQ mantendo a atividade das enzimas antioxidantes a valores semelhantes ao grupo controle, e aumentando a quantidade de GSH. Nos parâmetros inflamatórios, observamos também uma manutenção na atividade da MPO e NAG comparado ao grupo controle, demonstrando seu efeito anti-inflamatório. Assim como em nosso estudo, no trabalho de Kahraman e colaboradores (39) observaram que a administração de uma dose de 10mg/kg de quercetina, 60 minutos antes da indução da I/R, em ratos, promoveu diminuição de parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios no pulmão.

Nos rins, o órgão menos afetado pela isquemia, o tratamento com quercetina promoveu a manutenção no grupo ITQ da atividade da enzima GST com valores semelhantes ao grupo controle. Estudos em ratos demonstram que a quercetina pode levar a aumento da sobrevivência celular quando há injúria renal induzida por agrotóxicos, sendo que este impacto é dependente da dose utilizada no tratamento (40). Dentre os parâmetros histopatológicos analisados observamos apenas alteração no grupo STQ. Este grupo apresentou aumento da morfometria do corpúsculo renal podendo indicar um aumento da capacidade de filtração glomerular.

Em resumo, a isquemia de 45 minutos seguida de reperfusão de 7 dias promove alterações mais significativas nos pulmões seguida do intestino, fígado, sendo os rins os órgãos menos afetados. A quercetina foi capaz de amenizar os danos oxidativos e inflamatórios da I/R intestinal podendo ser considerada uma molécula promissora para o tratamento de pacientes com I/R intestinal.

REFERÊNCIAS

1. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir. Bras.* 2005; 20: 336–343.
2. Fishman JE, Sheth SU, Levy G, Alli V, Lu Q, Xu D, Qin Y, Qin X, Deitch EA. Intraluminal nonbacterial intestinal components control gut and lung injury after trauma hemorrhagic shock. *Ann Surg* 2014; 260:1112–1120.
3. Turnage RH, Guice KS, Oldham KT. Endotoxemia and remote organ injury following intestinal reperfusion. *J Surg Res.* 1994; 56:571-578.
4. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Ver.* 2014; 94: 329–354.
5. Sasaki M, Joh T. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2007; 40:1–12.
6. Nadatani Y, Watanabe T, Shimada S, Otani K. Microbiome and intestinal ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2018; 17:1-7.
7. Tótha S, Joncová Z, Curgalia K, Marettab M, Šoltésa J, Martin S. Quercetin attenuates the ischemia reperfusion induced COX-2 and MPO expression in the small intestine mucosa. *Biomed & Pharm.* 2017; 95: 346-354.
8. Alrawaiq NS, Abdullah A. A review of flavonoid quercetin: metabolism: bioactivity and antioxidant properties. *Int. J. Pharm Tech. Res.* 2014; 6: 933– 941.
9. Suganthy N, Devib KP, Nabavic SF, Braidyd N, Nabavi SM. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. *Biomed & Pharm.* 2016; 84: 892-908.
10. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology.* 1984; 105: 121-126.

11. Sizlan A, Guven A, Uysal B, et al. Proanthocyanidin protects intestine and remote organs against mesenteric ischemia/reperfusion injury. *World J Surg* 2009; 33: 1384-91
12. Saidi SA, Ncir M, Chaaben R, et al. Liver injury following small intestine ischemia/reperfusion in rats is attenuated by *Pistacia lentiscus* oil: antioxidant and anti-inflammatory effects. *The Journal of Metabolic Diseases* 2017; 123: 199-205.
13. Mutlu G, Abbasoglu L, Abbasoglu-Dogru S, et al. Morphologic changes and lipid peroxidation in renal tissues of Young rats following intestinal ischemia-reperfusion. *Pediatr Surg Int* 2002; 18: 337-340.
14. Kocak C, Kocak FE, Akcilar R, Akcilar A, Savran B, Zeren S, Bayhan Z, Bayat Z. Ukrain (NSC 631570) ameliorates intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury by reducing oxidative stress. *Bosnian Jour of Bas Med Sci* 2016; 16(1): 75-81.
15. Lindstrom LM, Ekblad E. Structural and Neuronal Changes in Rat Ileum After Ischemia with Reperfusion. *Digestive Diseases and Sciences* 2004; 49:1212-1222.
16. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41:1819-1828.
17. W. Droge. Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol. Ver* 2002; 82:47-95
18. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 2004; 49:1359–1377.
19. Nadatani Y, Watanabe T, Shimada S, Otani K. Microbiome and intestinal ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2018; 17:1-7.
20. João SA, de Alencar SSS, de Cunha Medeiros A, et al. Translocation of ^{99m}Tc labelled bacteria after intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras.* 2004; 19:328–333.
21. Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, et al. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2005; 204: 27-42.
22. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* 2009; 21:317-337.
23. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007; 449(7164):819-26.

24. Gill R, Tsung A, Billiar TR. Linking oxidative stress to inflammation: toll-like receptors. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48(9):1121-1132.
25. Ghizoni C, Ames A, Lameira O, et al. Anti-Inflammatory and antioxidant actions of copaiba oil are related to liver cell modifications in arthritic rats. *Jou. of Cellular Biochemistry.* 2017, 118: 3409-3423.
26. Zhao W, Gan X, Su G, et al. The interaction between oxidative stress and mast cell activation plays a role in acute lung injuries induced by intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2014; 187: 542-52.
27. Fantozzi ET, Breithaupt-Faloppa AC, Ricardo-da-Silva FY, et al. Estradiol mediates the long lasting lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 2018; 221: 1-7.
28. Roberts AM. Central role of oxidative stress and its signaling pathways in causing and preventing acute lung injury. *Crit Care Med.* 2011; 39: 2776–2777.
29. Nielsen VG, Tan S, Weinbroum A, et al. Lung injury after hepatoenteric ischemia-reperfusion: role of xanthine oxidase. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1364–1369.
30. Weinbroum AA, Hochhauser E, Rudick V, et al. Multiple organ dysfunction after remote circulatory arrest: common pathway of radical oxygen species? *J Trauma* 1999; 47: 691–697.
31. Impellizzeri D, Cordaro M, Campolo M, et al. 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.
32. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 2000; 52: 673-751.
33. Sorata Y, Takahama U, Kimura M. Protective effect of quercetin and rutin on the photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1984; 799: 313-317.
34. Manach C. et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett., Amsterdam.* 1998; 426: 331-336.

35. Sesink ALA, O'leary KA, Hollman PCH. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *J. Nutr.*, Bethesda. 2001; 131: 1938-1941.
36. Borges SC, Ferreira PEB, Silva LM, et al. Evaluation of the treatment with resveratrol-loaded nanoparticles in intestinal injury model caused by ischemia and reperfusion. *Toxicology*. 2018, 397: 13-22.
37. Lee, ES et al. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 2003; 55: 1169-1174.
38. Caty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SI. Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg.* 1990;212(6): 694-700.
39. Kahraman, A. et al. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesion. *Toxicology*, 2003; 183: 133- 142.
40. Hou Y, Zeng Y, Li S, Qi L, Xu W, Wang H, et al. Effect of quercetin against dichlorvos induced nephrotoxicity in rats. *Experimental and toxicologic pathology*, 2014; 66: 211-218.

Journal of Biomedical Science

Submission Guidelines

Research article

Criteria

Research articles should report on original primary research.

Journal of Biomedical Science strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's information on recommended repositories. Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. A list of data where deposition is required, with the appropriate repositories, can be found on the Editorial Policies Page.

Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design e.g.:

- "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial", "X is a risk factor for Y: a case control study", "What is the impact of factor X on subject Y: A systematic review"
- or for non-clinical or non-research studies a description of what the article reports
- list the full names and institutional addresses for all authors
- if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the "Acknowledgements" section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Reports of randomized controlled trials should follow the CONSORT extension for abstracts. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Methods:** how the study was performed and statistical tests used
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** brief summary and potential implications
- **Trial registration:** If your article reports the results of a health care intervention on human participants, it must be registered in an appropriate registry and the registration number and date of registration should be stated in this section. If it was not registered prospectively (before enrollment of the first participant), you should include the words 'retrospectively registered'. See our editorial policies for more information on trial registration

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.

Methods

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

Discussion

This section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations should be provided.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and material
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our editorial policies for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state "Not applicable" in this section.

Consent for publication

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including any individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from

that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our consent form if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our editorial policies for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state “Not applicable” in this section.

Availability of data and materials

All manuscripts must include an ‘Availability of data and materials’ statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].
- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available here.

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].^[Reference number]

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our editorial policies for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each authors' competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our editorial policies.

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our editorial policies for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors' information

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

Examples of the Vancouver reference style are shown below.

See our editorial policies for author guidance on good citation practice

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Example reference style:

Article within a journal

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

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine*. 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med*. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

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. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem*. 2007. doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

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

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](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Figures, tables and additional files

See [General formatting guidelines](#) for information on how to format figures, tables and additional files.

QUERCETINA PROMOVE EFEITO ANTIOXIDANTE E NEUROPROTETOR NO ÍLEO DE RATOS SUBMETIDOS Á ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

Jéssica Men de Campos^{1*}, Stephanie Carvalho Borges¹, Camila Quaglio Neves¹, Nilza Cristina Buttow^{2*}.

* Autores correspondentes: jessicamen.salus@gmail.com; ncbuttow@gmail.com

1. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790 – Jardim Universitário, Maringá, Paraná, 87020-900, Brasil.

2. Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, Bloco H79 – Jardim Universitário, Maringá, Paraná, 87020-900, Brasil.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A isquemia/reperfusão (I/R) intestinal é um quadro clínico desencadeado por diversos fatores, incluindo procedimentos cirúrgicos, acidentes automobilísticos e doenças inflamatórias intestinais. A injúria causada por I/R está associada ao aumento do estresse oxidativo, inflamação e alterações histopatológicas no íleo e em órgãos distantes. Nosso estudo avaliou o potencial antioxidante e anti-inflamatório da quercetina no íleo mediante um quadro de isquemia intestinal de 45 minutos e reperfusão de 7 dias. **MÉTODOS:** A isquemia foi induzida pelo clampeamento da artéria mesentérica superior por 45 minutos seguido por reperfusão de 7 dias. A quercetina foi administrada via oral na dose de 10 mg/kg por 7 dias. Os parâmetros bioquímicos e inflamatórios estudados foram: glutathione s-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), hidroperóxidos lipídicos (LOOH), mieloperoxidase (MPO) e n-acetil-glucosaminidase (NAG). Além disso, foram feitas análises de tempo de trânsito gastrointestinal, neurônios HuC/D⁺ e nNOS⁺ e de parâmetros histológicos no íleo. **RESULTADOS:** A isquemia e reperfusão intestinal (I/R) promoveu aumento da SOD, CAT e LOOH e redução de GSH no íleo. Promoveu, também, aumento no tempo de trânsito intestinal e redução nas populações de neurônios HuC/D⁺ e nNOS⁺. Além disso, IR promoveu alterações na morfometria da parede intestinal. O tratamento com quercetina preveniu alterações no íleo, principalmente em relação ao estresse oxidativo, inflamação e perda neuronal. **CONCLUSÃO:** O tratamento oral com 10mg/kg de quercetina livre reduz o estresse oxidativo e inflamação no íleo, promove neuroproteção e auxilia na manutenção do tempo de trânsito gastrointestinal de ratos submetidos à 45 minutos de isquemia e reperfusão intestinal de sete dias.

Palavras-chave: Neuroproteção; Estresse oxidativo; Quercetina; Plexo mioentérico; Efeito antioxidante; Histopatologia.

INTRODUÇÃO

A isquemia e reperfusão (I/R) é uma condição patológica caracterizada pela interrupção momentânea do fluxo sanguíneo, seguida do restabelecimento deste fluxo (1). Há uma variedade de condições que podem ocasionar este quadro clínico, como, procedimentos cirúrgicos, acidentes automobilísticos, traumas de forma geral e trombose venosa ou arterial. Esta condição pode acometer diversos órgãos, porém, especialmente o intestino é extremamente sensível às injúrias causadas pela I/R (2). Isso se reflete em possíveis danos à mucosa intestinal (3), danos à população geral e subpopulações neuronais que compõe o plexo mioentérico e alterações no tempo de trânsito intestinal (4).

A I/R pode promover alterações bioquímicas importantes, aumentando a expressão de vários parâmetros inflamatórios e a produção de espécies reativas, que contribuem para que ocorram alterações histopatológicas e para que os efeitos deletérios da I/R sejam ainda mais significativos (5,6).

Diante das alterações promovidas pela I/R, o uso de antioxidantes como a curcumina (7), resveratrol (8) e quercetina (9) são alternativas interessantes e vêm trazendo bons resultados no tratamento de lesões isquêmicas e seus efeitos. A quercetina é um flavonoide natural muito viável, de valor comercial acessível e facilmente extraído de frutas e vegetais como, maçã, cereja, cebola, brócolis e vinho tinto (10,11). Devido às suas características bioquímicas, este flavonoide possui propriedades farmacológicas já conhecidas, tais como ação anti-inflamatória (12), anti-carcinogênica (13) e antioxidante (14). Além disso, estudos anteriores em diferentes patologias sugerem que a dose de quercetina com bons resultados foi de 10 mg/kg possuindo efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios muito expressivos diante de um quadro de estresse oxidativo não só no intestino, como em outros órgãos (15,16), porém os efeitos da quercetina na dose de 10mg/Kg ainda não foram estudados no íleo de ratos submetidos à isquemia seguida de reperfusão de 7 dias. Existem estudos (9,17) que utilizaram quercetina na dose de 50mg/Kg via intraperitoneal para tratar ratos *Wistar* que foram submetidos à isquemia com

reperfusão de 24 horas. As alterações observadas durante o período de reperfusão podem ocorrer por até 10 semanas de reperfusão (18). E poucos estudos avaliam os efeitos da quercetina sobre a I/R em períodos superiores a 72 horas de reperfusão. E ainda estudos sobre os efeitos da quercetina sobre a Isquemia e reperfusão intestinal normalmente utilizam doses superiores a 10 mg/kg por via oral.

Considerando que a Isquemia e Reperfusão intestinal promove estresse oxidativo, inflamação, neurodegeneração mioentérica e redução no tempo de trânsito gastrointestinal no íleo. Nosso estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com quercetina por 7 dias após a injúria isquêmica de 45 minutos em ratos *Wistar* machos sobre estes parâmetros.

METODOLOGIA

Delineamento experimental

Cinquenta (50) ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) com média de 250 gr \pm 8,43 gr de peso corporal, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, foram realocados para o Biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas e mantidos em caixas de polipropileno, com iluminação de claro e escuro de 12 horas e temperatura controlada de 22 °C \pm 2 °C. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (Nº do protocolo: 7373240417).

Durante uma semana os ratos passaram pela aclimação no biotério, e durante todo o período receberam ração padrão para roedores (NUVILAB, recomendada pela U.S. National Institutes of Health) e água *ad libitum*. Estes animais foram divididos, aleatoriamente, em 5 grupos experimentais (n = 10/grupo). Grupo controle (C), grupo *sham* controle (SC), grupo *sham* tratado com quercetina (STQ), grupo isquêmico controle (IC) e grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ), como especificado na Tabela 1.

Os grupos STQ e ITQ receberam tratamento diário com quercetina 2 horas antes da cirurgia e por 7 dias subseqüentes à esta, durante o período de reperfusão. A quercetina foi dissolvida em água filtrada com pH: 7,4 (veículo), ajustado com

NaOH 0,1M (veículo) e foi administrada via gavagem na dose de 10mg/kg de peso corporal. Os grupos C, SC e IC receberam apenas veículo, na mesma proporção, 2 horas antes e durante os 7 dias de tratamento.

Indução da isquemia

No dia anterior ao procedimento cirúrgico, os ratos permaneceram em jejum por um período de 15 horas. Todos os animais foram anestesiados, via intramuscular, com uma mistura de 20 mg/Kg de xilazina (Sespo Indústria e Comércio, Paulínia, SP, Brasil) e 100 mg/Kg de ketamina (Sespo Indústria e Comércio, Paulínia, SP, Brasil). Todos os grupos foram submetidos à laparotomia abdominal, exceto o grupo controle.

Os grupos *sham* (SC e STQ) foram anestesiados, submetidos à laparotomia abdominal e exposição do íleo, porém a artéria mesentérica superior e a irrigação lateral não foram obstruídas, portanto o fluxo sanguíneo não foi alterado e não sofreram a injúria isquêmica. Nos grupos isquêmicos (IC e ITQ) a artéria mesentérica superior foi ocluída por um clamp microvascular e a irrigação lateral foi bloqueada por meio de amarrações, alterando o fluxo sanguíneo e causando a injúria isquêmica. Durante um período de 45 minutos o clampeamento e as amarrações foram mantidas e após este período foram retiradas e o fluxo sanguíneo foi restabelecido (reperusão). O abdômen foi suturado com fio de nylon. O período de reperusão e tratamento teve duração de 7 dias e neste período os animais foram mantidos em caixas individuais no biotério.

Análise do tempo de trânsito gastrointestinal

O teste para avaliar o tempo de trânsito gastrointestinal foi realizado em todos os grupos experimentais no sexto dia de reperusão e tratamento. Foi administrado aos ratos, via gavagem, 300 µL de solução contendo 3% de corante não absorvível Carmim hidro 52% e 0,5% de etilcelulose (Corantec®, São Paulo, Brasil) diluídos em água filtrada. Após receberem a solução, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à ração e água. O resultado final foi expresso em horas, registrado no momento que apareceu o primeiro pellet fecal marcado com o corante.

Coleta do íleo

A coleta do íleo foi realizada ao final de 7 dias de tratamento, imediatamente após eutanásia dos animais, realizada com injeção intraperitoneal de dose letal (120 mg/Kg) de tiopental sódico. No momento da coleta foi mensurado o comprimento total do intestino e separada a porção do íleo dos demais segmentos. O íleo foi subdividido em 3 porções menores destinadas a diferentes técnicas: análises bioquímicas de estresse oxidativo e inflamação, análise histológica e técnica de imunomarcação de neurônios mioentéricos.

Ensaio bioquímico para estresse oxidativo e inflamação

Preparação do homogenato

Para a preparação do homogenato as amostras do intestino foram pesadas e homogeneizadas com o Turrax em tampão fosfato de potássio (200mM e pH=6,5) e o volume de tampão utilizado foi 3 vezes o peso da amostra.

Uma parte do homogenato foi separada para a técnica GSH e o restante foi centrifugado por 20 minutos a 9.000 rpm. O sobrenadante resultante da centrifugação foi dividido para as técnicas de atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST), níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e de glutathione (GSH). E o pellet foi destinado às técnicas de dosagem de proteínas, e dosagens da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e n-acetil-glicosaminidase (NAG).

Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada por meio do kit comercial *Pierce BCA protein – Assay Kit®*. As amostras e os reagentes foram pipetados em placa de 96 poços, em seguida a placa foi incubada em estufa a 37° por 30 minutos e a leitura foi realizada com espectrofotômetro no comprimento de onda de 562nm.

Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade enzimática da SOD foi realizada a partir de uma porção do sobrenadante adicionada ao tampão Tris-HCl (pH=8,5) e agitado em Vórtex. Em seguida foi adicionado pirogalol (1mM) às amostras e estas foram incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos. As amostras foram então centrifugadas por 4 minutos a 14.000 rpm e, o sobrenadante resultante foi pipetado em microplacas e a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína.

Atividade enzimática da catalase (CAT)

A determinação da atividade da CAT foi realizada com base no método de Aebi (19), no qual uma porção do sobrenadante foi diluída em tampão fosfato de potássio (0,2M e pH=6,5). Em seguida, em uma placa de 96 poços foi adicionado a amostra ao meio reacional contendo Tris-HCL EDTA (0,1M e pH 8,5) e H₂O₂. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

Atividade enzimática da glutatona s-transferase (GST)

Para determinar a atividade enzimática da GST, o sobrenadante foi diluído em tampão fosfato de potássio (0,2M e pH=6,5) e a esta mistura foi adicionada uma mistura contendo CDNB (3mM) e GSH (3mM). Em seguida esta solução foi transferida para microplacas, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

Grupos sulfidrílicos não proteicos (GSH)

Para a determinação dos grupos sulfidrílicos não proteicos GSH, foi adicionado ao homogenato o ácido tricloroacético, essa mistura foi agitada em Vórtex e centrifugada por 15 minutos a 9700 rpm. Em microplacas de 96 poços, foi pipetado o sobrenadante e o Tris-HCL (0,4M e pH=8,9), e a reação foi iniciada com DTNB (5-5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) (10mM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm e os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{g}$ de tecido.

Níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

A dosagem dos níveis de hidroperóxidos lipídicos foi realizada seguindo o método descrito por Jiang et al (20). O sobrenadante foi homogeneizado com metanol a 30% e centrifugado a 4°C por 30 minutos a 10.000 rpm. Em seguida foi preparado o meio reacional e adicionado às amostras e estas foram pipetadas em microplacas e incubadas em temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Por fim, as leituras das microplacas foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm e os resultados foram expressos em mmol/mg de tecido.

Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG)

Para a inflamação, os níveis enzimáticos de MPO e NAG foram avaliados no íleo. O pellet resultante da centrifugação inicial do homogenato foi ressuspendido em Tampão Fosfato de Potássio (0,08M) com HTAB (pH 5,4). Os níveis de MPO foram quantificados pela reação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com tetrametilbenzidina na amostra. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm e os resultados foram expressos em mD.O./mg de proteína. Para a NAG a solução com n-acetil-beta-D-glucosaminidase foi adicionada a amostra na presença de tampão citrato. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm e os resultados foram expressos em mD.O./mg de proteína.

Imunohistoquímica para neurônios HuC/D⁺ e nNOS⁺

Processamento da amostra para dupla marcação

Após a coleta e separação da porção do íleo para realização desta técnica, as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% (pH = 7,4). O íleo foi cortado em segmentos transversais menores de aproximadamente 1 cm de comprimento e dissecados com o auxílio de pinças sob estereomicroscópio para obtenção de preparados totais da túnica muscular, por meio da remoção das túnicas mucosa e submucosa. Os preparados totais foram então armazenados sob

refrigeração e conservados em PBS (Tampão Fosfato de Sódio 0,1 M e pH = 7,4) e azida sódica a 0,08%, para a realização das técnicas de imunohistoquímica.

Os preparados totais foram lavados por duas vezes durante 10 minutos em PBS (0,1M, pH 7,4) e Triton-X100 a 0,5% (PBS+T) e incubados por 1 hora em solução de bloqueio contendo albumina de soro bovino (BSA) a 2% e soro de burro a 10% em PBS+T. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-HuC/D e anti-nNOS (tabela 2) durante 48 horas à temperatura ambiente sob agitação constante, em meio de incubação composto por PBS+T, BSA a 2% e soro de burro a 2%.

Após incubação com o anticorpo primário, os preparados totais foram lavados três vezes em PBS+T por 10 minutos. Foram então incubados com anticorpos secundários (tabela 2) por 2 horas ao abrigo da luz, em meio de incubação contendo PBS+T, BSA a 2% e soro de burro a 2%. As membranas foram então lavadas 3 vezes em PBS-T por 10 minutos, montadas em lâminas histológicas contendo antifade® (Life Technologies do Brasil Com. Ind. Prod. Biotec. Ltda, SP, Brasil), e armazenadas sob refrigeração e ao abrigo da luz.

Análise quantitativa e morfométrica dos neurônios HuC/D⁺ e nNOS⁺

As análises quantitativas e morfométricas foram realizadas por meio de imagens capturadas por câmera de alta resolução acoplada ao microscópio de fluorescência FSX100 ® (Olympus) com objetiva de 20x. Estas imagens foram analisadas com o auxílio do programa ImagePro Plus (v. 4.5.029; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

Para a quantificação de neurônios HuC/D⁺ e nNOS⁺ foram contados todos os corpos celulares destes neurônios presentes em 30 imagens de gânglios/animal e os resultados foram expressos em números de neurônios/gânglio. E para a análise morfométrica, foram mensuradas as áreas de 100 corpos celulares/animal de cada tipo de neurônio e os resultados foram expressos em μm^2 .

Análise morfométrica da parede intestinal

A análise histológica da parede intestinal foi realizada por meio do protocolo de coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), que inclui basicamente seis principais

etapas: fixação em paraformaldeído 4%, desidratação, inclusão em parafina, microtomia (cortes semi-seriados de 5 µm de espessura), coloração e montagem das lâminas.

A morfometria foi realizada por meio da captura de imagens em microscópio óptico (Nikon Eclipse 80i®), com objetiva de 10x acoplado a um sistema computadorizado de análise de imagens. Foram capturadas 30 imagens do íleo e foram mensuradas as espessuras da parede total, túnica submucosa, túnica muscular, altura e largura dos vilos e profundidade das criptas com auxílio do software ImagePro Plus 4.5.029 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Para cada um dos itens foram realizadas 100 medidas/animal e os dados submetidos à análise estatística

Análise estatística

O software utilizado para análise estatística foi o GraphPad Prism 7. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade. Para dados paramétricos foi realizada a análise de variância one-way (ANOVA), seguido de pós-teste de *Tukey*. E para dados não paramétricos foi realizado o teste *Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Dunns*. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Tempo de trânsito gastrointestinal

O teste de tempo de trânsito gastrointestinal realizado ao final do tratamento demonstrou diferença estatística entre os grupos (Figura 1). O grupo *sham* controle (SC) apresentou aumento no tempo de trânsito gastrointestinal em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$). O grupo isquêmico controle (IC) teve aumento no tempo de trânsito gastrointestinal em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) apresentou redução do tempo de trânsito gastrointestinal em relação ao grupo *sham* controle (SC) ($p < 0,0001$). Da mesma forma, o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou redução no

tempo de trânsito gastrointestinal quando comparado ao grupo isquêmico controle (IC) ($p < 0,0001$). Ambos os grupos tratados com quercetina (STQ e ITQ) mantiveram-se estatisticamente semelhantes ao grupo controle (C).

Parâmetros de estresse oxidativo e inflamação

Na tabela 3 estão representadas as análises realizadas para parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo e inflamação no íleo.

A atividade da enzima catalase (CAT) não apresentou alteração no grupo *sham* controle (SC) em relação ao grupo controle (C). O grupo isquêmico controle (IC) apresentou aumento na atividade da CAT em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) apresentou redução na atividade da CAT em relação ao grupo *sham* controle (SC) ($p < 0,0001$). Da mesma forma, o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) demonstrou redução da atividade da CAT em relação ao grupo isquêmico controle (IC) ($p < 0,0001$). Os grupos STQ e ITQ mantiveram-se estatisticamente semelhantes ao grupo controle (C).

A superóxido dismutase (SOD) apresentou aumento da sua atividade no grupo *sham* controle (SC) e no grupo isquêmico controle (IC) em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) não apresentou alteração na atividade da SOD em relação ao grupo *sham* controle (SC). O grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou redução na atividade da SOD em relação ao grupo isquêmico controle (IC) ($p = 0,0008$). Os grupos tratados (STQ e ITQ) apresentaram resultados estatísticos semelhantes ao grupo controle (C).

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) apresentaram redução no grupo *sham* controle (SC) e no grupo isquêmico controle (IC) em relação ao grupo controle (C) ($p = 0,0201$ e $p = 0,0219$, respectivamente). No grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) houve aumento dos níveis de GSH em relação ao grupo *sham* controle (SC) ($p < 0,0001$). Da mesma forma, os níveis de GSH aumentaram no grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) em relação ao grupo isquêmico controle (IC) ($p = 0,0001$). Os grupos STQ e ITQ mantiveram seus resultados estatisticamente semelhantes ao grupo controle (C).

Os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) no grupo *sham* controle (SC) mantiveram-se estatisticamente semelhantes ao do grupo controle (C). O grupo isquêmico controle (IC) apresentou aumento dos níveis de LOOH em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) apresentou redução nos níveis de LOOH em relação ao grupo *sham* controle (SC) ($p < 0,0001$). Da mesma forma, o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou redução nos níveis de LOOH em relação ao grupo isquêmico controle (IC) ($p < 0,0001$). Ambos os grupos tratados com quercetina (STQ e ITQ) mantiveram seus resultados estatisticamente semelhantes ao grupo controle.

Os níveis de glutathione s-transferase (GST) e parâmetros inflamatórios: mieloperoxidase (MPO) e n-acetil-glicosamina (NAG) mantiveram-se sem alterações estatisticamente significativas para os grupos experimentais.

Morfometria da parede intestinal do íleo

Como representado na tabela 4, a espessura da parede total apresentou aumento nos grupos *sham* controle (SC) e isquêmico controle (IC) em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$). O grupo *sham* tratado com quercetina não apresentou alteração significativa em relação ao grupo *sham* controle (SC). Já o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou aumento da espessura da parede total em relação ao grupo isquêmico controle (IC) ($p < 0,0001$). Os grupos tratados (STQ e ITQ) apresentaram aumento da espessura da parede total em relação ao grupo controle (C) ($p = 0,0010$ e $p < 0,0001$, respectivamente).

Na túnica submucosa não houve alteração significativa no grupo *sham* controle (SC) em relação ao grupo controle (C). O grupo isquêmico controle (IC) apresentou aumento da submucosa em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) apresentou redução da submucosa em relação ao grupo *sham* controle (SC) ($p = 0,0483$). Da mesma forma, o grupo isquêmico tratado com quercetina também apresentou redução da submucosa em relação ao grupo isquêmico controle (IC) ($p < 0,0001$). Ambos os grupos tratados (STQ e ITQ) apresentaram redução da espessura da submucosa em relação ao grupo controle (C) ($p = 0,0054$ e $p = 0,0002$, respectivamente).

A túnica muscular apresentou um aumento da espessura no grupo *sham* controle (SC) e no grupo isquêmico controle (IC) em relação ao grupo controle (C)

($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) não apresentou alteração significativa em relação ao grupo *sham* controle (SC). Já o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou aumento da espessura da túnica muscular em relação ao grupo isquêmico controle (IC) ($p < 0,0001$). Os grupos tratados (STQ e ITQ) apresentaram aumento da muscular em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente).

Os grupos *sham* controle (SC) e isquêmico controle (IC) apresentaram aumento na altura dos vilos em relação ao grupo controle (C) ($p = 0,0012$ e $p < 0,0001$, respectivamente). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) apresentou redução da altura dos vilos em relação ao *sham* controle (SC) ($p < 0,0001$). Em contrapartida, o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) não apresentou alteração significativa na altura dos vilos em relação ao grupo isquêmico controle (IC). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) apresentou redução da altura dos vilos em relação ao grupo controle (C) ($p = 0,0098$) e o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou aumento da altura dos vilos em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$).

A largura dos vilos não apresentou alteração significativa no grupo *sham* controle (SC) em relação ao grupo controle (C). No grupo isquêmico controle (IC) houve redução da largura dos vilos em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) apresentou aumento da largura dos vilos em relação ao grupo *sham* controle (SC) ($p = 0,0014$). Ao passo que, o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou redução da largura dos vilos em relação ao grupo isquêmico controle (IC) ($p < 0,0001$). O grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou redução da largura dos vilos em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$).

A profundidade de cripta foi avaliada e apresentou redução nos grupos *sham* controle (SC) e isquêmico controle (IC) em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) apresentou redução da profundidade de cripta em relação ao grupo *sham* controle (SC) ($p = 0,0321$). Ao passo que, o grupo isquêmico tratado com quercetina apresentou aumento da profundidade de cripta em relação ao grupo isquêmico controle (IC) ($p = 0,0004$). Ambos os grupos tratados (STQ e ITQ) apresentaram redução da profundidade de cripta em relação ao grupo controle (C) ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente).

Densidade e morfometria de neurônios HuC/D⁺ e nNOS⁺

Os dados de densidade e morfometria dos neurônios HuC/D⁺ e nNOS⁺ estão representados na tabela 5. A densidade dos neurônios HuC/D⁺ foi menor nos grupos *sham* controle (SC) e isquêmico controle (IC) em relação ao grupo controle (C) ($p=0,0012$ e $p<0,0001$, respectivamente). No grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) houve maior densidade de neurônios HuC/D⁺ em relação ao grupo *sham* controle (SC) ($p=0,0019$). Da mesma forma, o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou maior densidade de neurônios HuC/D⁺ em relação ao grupo isquêmico controle (IC) ($p=0,0317$). Tanto o grupo STQ quanto o grupo ITQ permaneceram estatisticamente semelhantes ao grupo controle (C).

Em relação à densidade da subpopulação de neurônios nNOS⁺, os grupos *sham* controle (SC) e isquêmico controle (IC) apresentaram menor densidade em relação ao grupo controle (C) ($p=0,0051$ e $p=0,0007$, respectivamente). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) apresentou maior densidade na subpopulação de neurônios nNOS⁺ em relação ao grupo *sham* controle (SC) ($p=0,0045$). Da mesma forma, o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou maior densidade nesta subpopulação neuronal em relação ao grupo isquêmico controle (IC) ($p=0,0266$). Ambos os grupos tratados com quercetina (STQ e ITQ) permaneceram estatisticamente semelhantes ao grupo controle (C).

A morfometria dos neurônios HuC/D⁺ não apresentou alterações estatísticas significantes nos grupos *sham* controle (SC) e isquêmico controle (IC) em relação ao grupo controle (C). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) apresentou redução da morfometria em relação ao grupo *sham* controle (SC) ($p=0,0161$). Já o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou aumento da morfometria dos neurônios da população geral em relação ao grupo isquêmico controle (IC) ($p<0,0001$). O grupo *sham* tratado com quercetina (STQ) apresentou redução na morfometria quando comparado ao grupo controle (C) ($p<0,0001$) e o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou aumento na morfometria quando comparado ao grupo controle (C) ($p<0,0001$).

Em relação à morfometria da subpopulação de neurônios nNOS⁺ apenas o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) apresentou redução em relação ao

grupo isquêmico controle (IC) ($p=0,0131$). Os demais grupos experimentais não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si.

DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que as lesões e efeitos decorrentes da I/R tem relação com dois principais mecanismos: o aumento da permeabilidade vascular e disfunções na parede intestinal. O aumento da permeabilidade vascular leva à ativação e recrutamento de células inflamatórias, que por sua vez produzem citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, resultando em danos intestinais (21). Estes danos intestinais causados pela inflamação e estresse oxidativo serão responsáveis pelas disfunções observadas no intestino, como: alterações no padrão de motilidade e trânsito intestinal (22,23), danos aos neurônios mioentéricos (22,24) e alterações morfológicas na parede intestinal (6).

Além disso, Lindestron e coladores (18) demonstraram em seu estudo, que as alterações da I/R intestinal no íleo podem ser notadas a partir de uma hora até 10 semanas de reperfusão, portanto, com 7 dias de reperfusão ainda é possível observar alterações significativas no intestino.

O presente estudo constatou que 45 minutos de isquemia seguidos de 7 dias de reperfusão promoveram estresse oxidativo, perda da população geral de neurônios (HuC/D) e da subpopulação nitrérgica (nNOS), um tempo de trânsito gastrointestinal mais lento e alterações na parede intestinal.

Uma das principais características da isquemia e reperfusão é a presença de estresse oxidativo e inflamação (25). Este processo é prejudicial pois gera lesões nos tecidos. Em nosso estudo quando avaliamos os parâmetros de estresse oxidativo após I/R no íleo, observamos que as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) apresentaram aumento no grupo isquêmico controle (IC). O aumento da atividade dessas enzimas que fazem parte do sistema antioxidante endógeno geralmente está associado à maior produção de espécies reativas de oxigênio (26). Alguns estudos já demonstraram que há redução da atividade da SOD após isquemia seguida por período de reperfusão de até 12 horas (27,28). Após 7 dias de reperfusão, a modulação do sistema antioxidante pode favorecer o aumento da SOD e CAT para eliminar os radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio que ainda são produzidos. Da mesma forma, o tripeptídeo GSH é

usado como indicador de estresse oxidativo, atuando como doador de elétrons para eliminar peróxidos e outras espécies reativas (29,8). No grupo isquêmico controle (IC) houve uma redução nos níveis de GSH no íleo. A redução já foi reportada por outros autores com 6 horas (6) e 7 dias de reperfusão (8). A redução do GSH pode ocorrer porque ele pode ser utilizado para catalisar a redução de H₂O₂ ou hidroperóxidos orgânicos (26). Nosso estudo também demonstrou aumento nos níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) no grupo isquêmico controle (IC). Aumento de hidroperoxidação lipídica pode promover alterações na composição, estrutura e dinâmica das membranas lipídicas levando à lesão celular e tecidual (30). Por consequência, o aumento dos níveis de LOOH pode indicar, indiretamente, que está ocorrendo danos celulares causados pelo estresse oxidativo (31).

O processo inflamatório segue uma sequência de eventos vasculares e celulares que o caracterizam. As primeiras células a migrarem para o local da injúria são os neutrófilos, que serão responsáveis pela liberação de seus grânulos azurófilos que contém mieloperoxidase e outros mediadores químicos (32). A migração de neutrófilos ocorre, principalmente, nas primeiras horas após o processo inflamatório ser desencadeado (fase aguda da inflamação). Posteriormente, outras células migram para o local, incluindo os monócitos, que ao migrarem para o local da injúria transformam-se em macrófagos que serão responsáveis pelo processo de fagocitose, liberação de mais mediadores químicos no local e liberação da enzima n-acetilglicosaminidase (NAG). Os macrófagos são células presentes tanto na inflamação aguda e crônica, portanto podem permanecer no local da injúria por um período maior de tempo do que os neutrófilos. (32,33). Lin e colaboradores (34) demonstraram que há aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em isquemia seguida de períodos curtos de reperfusão de até 24 horas. Já em nosso estudo quando avaliamos a atividade da enzima MPO após 7 dias de reperfusão, não encontramos alterações significativas em nenhum dos grupos, isto sugere que após 7 dias os neutrófilos não são as células inflamatórias predominantes no local e, conseqüentemente, há menor atividade da MPO. Em contrapartida, a atividade da NAG estava aumentada no grupo *sham* controle (SC), demonstrando que mesmo após 7 dias ainda podem ter macrófagos no local contribuindo para este aumento.

O aumento do estresse oxidativo e inflamação são capazes de causar danos à diversas células, incluindo neurônios mioentéricos. Estudo de Lindstrom e colaboradores (18) demonstra que, em períodos de reperfusão que variaram de 1

hora até 10 semanas, houve redução progressiva da densidade de neurônios nos grupos que foram submetidos à I/R. Ainda neste estudo, os autores associaram a perda neuronal com o comprometimento das secreções celulares e motilidade intestinal, uma vez que a inervação entérica é responsável por controlar estes fatores. Em nosso estudo observamos redução na população geral (HuC/D⁺) e subpopulação nitrérgica (nNOS⁺) nos grupos isquêmico controle (IC) e no grupo *sham* controle (SC), ao mesmo tempo em que houve um aumento no perfil neuronal dessas populações apenas no grupo isquêmico controle (IC). A hipertrofia neuronal (aumento da área ocupada pelo neurônio) observada pode estar associada ao aumento compensatório da síntese de neurotransmissores em detrimento da redução da densidade neuronal encontrada neste grupo (IC). Borges e colaboradores também reportaram redução na densidade e alteração no perfil da população geral e subpopulações neuronais avaliadas em seu estudo após isquemia seguida de 7 dias de reperfusão (8).

Quando analisamos a morfometria da parede intestinal do íleo (Tabela 4), notamos que os grupos *sham* controle (SC) e isquêmico controle (IC) sofreram alterações em relação ao grupo controle (C). A morfometria da parede total dos grupos SC e IC apresentou aumento em relação ao grupo controle (C). Nos grupos SC e IC as alterações na morfometria da parede intestinal podem ter uma relação direta com a manipulação do intestino no grupo falso operado (grupo SC) e com a cirurgia e I/R no grupo IC, ainda, associado a isso um quadro de mucosite. Estudos com drogas antitumorais descrevem alterações ocorridas na parede intestinal ocasionadas pelo uso dos quimioterápicos como mucosite (35). Neste caso a mucosite é dividida em cinco estágios: (i) fase de iniciação onde ocorre intensa produção de radicais livres os quais induzem danos ao DNA e RNA levando a apoptose celular; (ii) nesta etapa denominada regulação positiva o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), promove a regulação positiva de vários genes que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral-α (TNF-α), interleucina-1 (IL-1) e IL-6; (iii) nesta fase ocorrerá a amplificação e sinalização dessas citocinas pró-inflamatórias; (iv) caracterizada pela formação de ulcerações com a ruptura da barreira epitelial e a entrada de microrganismos e seus subprodutos na circulação sanguínea capazes de ativar macrófagos teciduais e produzir ainda mais citocinas pró-inflamatórias; (v) denominada de fase de cura ou cicatrização (36,37). Apesar de não termos realizado o estudo das citocinas pró-

inflamatórias, novos estudos buscando avaliar todas as alterações ocasionadas na I/R poderão auxiliar a elucidar se as alterações que ocorrem nas mesmas 5 etapas da mucosite provocadas pelo uso de drogas antitumorais.

Após 7 dias de reperfusão as características da mucosa intestinal se assemelham a fase v da mucosite ocasionada por quimioterápicos. Portanto, o aumento da espessura da parede total observado em nosso estudo pode ter relação com a intensa síntese de colágeno, produção de componentes da matriz extracelular, liberação de fatores de crescimento e proliferação celular que ocorre durante o processo de cicatrização do tecido (38). A descoberta das alterações ocasionadas na mucosa intestinal poderá auxiliar no tratamento dos pacientes que sofreram IR intestinal.

Além das alterações neuronais e na parede intestinal, em nosso estudo, observamos uma redução significativa do tempo de trânsito gastrointestinal nos grupos isquêmico controle (IC) e *sham* controle (SC) em comparação com o grupo controle (C). Rivera e colaboradores (23) também relataram atrasos no trânsito gastrointestinal que ocorrem em decorrência de alterações celulares promovidas pela I/R. Essas alterações podem estar associadas ao estresse oxidativo, resposta inflamatória (39) e alterações nos neurônios entéricos (22).

Estas mudanças fisiopatológicas observadas na I/R, como estresse oxidativo, inflamação e neurodegeneração podem ter melhoras significativas com o uso de substâncias antioxidantes (24). Os flavonóides tem tido destaque por sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória. Cada flavonóide apresenta características moleculares próprias (26) e podem apresentar efeitos mais ou menos potentes sobre diferentes patologias estando estes relacionados com seu mecanismo de ação. A quercetina por suas propriedades pode ter uma importante ação sobre a lesão isquêmica (17). Li e colaboradores (40) ressaltam em seu estudo os mecanismos de ação da quercetina, dentre eles: inibição de citocinas e enzimas pró-inflamatórias (lipoxigenase e ciclooxigenase) auxiliando na modulação da resposta inflamatória. Além de exercer papel cito e neuroprotetor (41) por ser uma molécula com alta capacidade antioxidante conferida, principalmente, pelos grupamentos OH presentes em sua estrutura. Por suas características a quercetina é uma potente eliminadora de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (42)

Em nosso estudo, o uso da quercetina na dose de 10mg/kg promoveu um efeito antioxidante e protetor que foi verificado pela redução da atividade das

enzimas SOD e CAT no grupo isquêmico tratado (ITQ). Neste grupo (ITQ) os valores de SOD e CAT mantiveram-se semelhantes ao grupo controle (C) e reduziram em relação ao grupo isquêmico controle (IC), demonstrando assim o efeito protetor da quercetina e sua capacidade de neutralizar espécies reativas produzidas durante e após I/R. Os níveis de glutathiona (GSH) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH) no grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ) também se mantiveram semelhantes aos níveis encontrados no grupo controle (C). A manutenção dos níveis de LOOH nos grupos tratados reforça a função protetora da quercetina diante de um quadro de estresse oxidativo. O trabalho de Borges e colaboradores, obteve bons resultados para tratamento da lesão isquêmica seguida de 7 dias de reperfusão utilizando 7 mg/Kg de resveratrol livre (não encapsulado), porém quando utilizaram o resveratrol nanoencapsulado na dose de 7 mg/Kg relataram que as nanopartículas exerceram certa toxicidade nos animais (8). Em nosso estudo utilizamos a quercetina livre (não encapsulada) na dose de 10 mg/kg, considerada segura e eficiente (15,16). Além disso, a quercetina possui um arranjo molecular diferente do resveratrol, e conta com um maior número de grupamentos -OH. Estes grupamentos são grandes responsáveis pelo potencial antioxidante da quercetina, já que são doadores de elétrons capazes de estabilizar espécies reativas de oxigênio (14).

A ação neuroprotetora da quercetina foi observada em nosso estudo. Nos grupos tratados com quercetina (STQ e ITQ) a densidade dos neurônios mioentéricos da população geral e subpopulação nitrérgica foi semelhante ao grupo controle (C). Este resultado sugere que a redução do estresse oxidativo nos grupos tratados possa ter influência na conservação da densidade e integridade de células neuronais no íleo. A ação neuroprotetora e antiinflamatória da quercetina foi reportada por Bossolani e colaboradores (43) quando avaliaram população geral e subpopulações no jejuno de ratos artríticos. A manutenção da população neuronal geral e subpopulação nitrérgica pode ter contribuído para assegurar a integridade da mucosa gastrointestinal (44), circulação sanguínea local, regulação das secreções, contração muscular e peristaltismo.

Em relação à morfometria da parede intestinal, os grupos tratados com quercetina (STQ e ITQ) demonstraram aumento da espessura da parede total em relação ao grupo controle (C). Neste contexto, destacou-se o resultado encontrado para o grupo isquêmico tratado com quercetina (ITQ), que além de apresentar parede intestinal mais espessa em relação ao grupo controle (C), também

apresentou parede intestinal mais espessa em relação ao grupo isquêmico controle (IC). Este resultado nos sugere que a ação anti-inflamatória e antioxidante da quercetina (40), possa ter acelerado o processo de reparo tecidual e cicatrização do tecido intestinal danificado, aumentando a síntese e deposição de colágeno, síntese de componentes da matriz extracelular e proliferação celular que ocorre após danos à parede intestinal (38). Curgali e colaboradores obtiveram bons resultados no tratamento com quercetina livre (50 mg/Kg) da injúria isquêmica com 24 horas de reperfusão, neste estudo foi relatada a melhora geral da morfologia e regeneração da mucosa do jejuno. Isto demonstra que independente do tempo de reperfusão e na dose adequada a cada circunstância a quercetina trouxe bons resultados em relação à parede intestinal.

Quando analisamos o tempo de trânsito gastrointestinal, observamos que a Quercetina (grupos STQ e ITQ) foi capaz de manter o funcionamento semelhante ao grupo controle (C). Estes resultados mostram que os efeitos antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor deste flavonóide podem ter efeitos práticos benéficos aos transtornos ocasionados aos pacientes que tiveram IR intestinal.

Em resumo, nosso estudo confirma que a isquemia seguida por um período de reperfusão de 7 dias resulta em importantes alterações oxidativas, inflamatórias, morfológicas e neurodegenerativas no íleo. E o tratamento com 10 mg/kg de quercetina é capaz de amenizar o estresse oxidativo e a inflamação na I/R intestinal, possivelmente devido à sua ação antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora. A quercetina livre na dose de 10 mg/Kg mostrou ser uma molécula promissora no tratamento de quadros de IR intestinal.

REFERÊNCIAS

1. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras.* 2005;20: 336-343.
2. Clair DG, & Beach JM. Mesenteric ischemia. *New England Journal of Medicine.* 2016; 374(10): 959-968.
3. Tassopoulos A, Chalkias A, Papalois A, et al. The effect of antioxidant supplementation on bacterial translocation after intestinal ischemia and reperfusion. *Redox Rep.* 2016;22(1): 1-9.

4. Marosti AR, Da Silva MV, Palombit K, et al. Differential effects of intestinal ischemia and reperfusion in rat enteric neurons and glial cells expressing P2X₂ receptors. *Histol. Histopathol.* 2015;30: 489-501.
5. Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S, et al. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol. Rev.* 2014;94: 329-354.
6. Da Silva De Souza AC, Borges SC, Beraldi EJ, et al. 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: 3252-3263.
7. Okudan N, Belviranli M, Gokbel H, et al. Protective effects of curcumin supplementation on intestinal ischemia reperfusion injury. *Phytomedicine.* 2013;20(10): 844-848.
8. Borges SC, Ferreira PEB, Da Silva, LM, et al. Evaluation of the treatment with resveratrol-loaded nanoparticles in intestinal injury model caused by ischemia and reperfusion. *Toxicology.* 2018;13: 396-397.
9. Curgali K, Toth S, Jonecova Z, et al. Quercetin protects jejunal mucosa from experimental intestinal ischemia reperfusion injury by activation of CD68 positive cells. *Acta Histochem.* 2018;120: 28-32.
10. Andres S, Pevny S, Ziegenhagen, R, et al. Safety aspects of the use of quercetin as a dietary supplement. *Mol Nutr Food Res.* 2017;1: 62.
11. D'andrea G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia.* 2015;106: 256-271.
12. Hou D, Zhang, W, Gao D, et al. Anti-inflammatory effects of quercetin in a mouse model of MC903-induced atopic dermatitis. *Int Immunopharmacol.* 2019;74.
13. Rauf A, Imran M, Khan IA, et al. Anticancer potential of quercetin: comprehensive review. *Phytother Res.* 2018;32(11): 2019-2130.
14. Xu D, Hu MJ, Wang YQ, et al. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. *Molecules.* 2019;24(6): 1123, 2019.
15. Hou Y, Zeng Y, Li S, et al. Effect of quercetin against dichlorvos nephrotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2014;66(4): 211-218.
16. Abarikwu SO, Adedara IA, Farombi EO. Influence of quercetin on haematological indices and biomarkers of oxidative stress in the serum of rats exposed to atrazine. *Afr J Med Med Sci.* 2010;39: 81-88, 2010.

17. Tóth Š, Jonecová Z, Čurgali K, et al. Quercetin attenuates the ischemia reperfusion induced COX-2 and MPO expression in the small intestine mucosa. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;95: 346–354.
18. Lindstrom LM, Ekblad E. Structural and Neuronal Changes in Rat Ileum After Ischemia with Reperfusion. *Digestive Diseases and Sciences*. 2004;49: 1212-1222.
19. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 121-126.
20. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP, et al. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange: comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*. 1991;26: 853–856.
21. Ito H, Sadatom A, Inoue Y, et al. Role of TLR5 in inflammation and tissue damage after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;519(1): 15-22.
22. Calcina F, Barocelli E, Bertoni S, et al. Effect of N-methyl-d-aspartate receptor blockade on neuronal plasticity and gastrointestinal transit delay induced by ischemia/reperfusion in rats. *Neuroscience*. 2005;134: 39-49.
23. Rivera LR, Pontell L, Cho HJ, et al. Knock out of neuronal nitric oxide synthase exacerbates intestinal ischemia/reperfusion. *Dig. Dic. Sci*. 2012;53: 3158-3169.
24. Borges SC, Da Silva de Souza AC, Beraldi EJ, et al. Resveratrol promotes myenteric neuroprotection in the ileum of rats after ischemia-reperfusion injury. *Life. Sci*. 2016;166: 54-59.
25. Gonzalez LM, Moeser AJ, Blikslager AT. Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: progress and promise for translational research. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015;308: 63-75.
26. He L, He T, Farrar S, et al. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;44(2): 532–553.
27. Brahmabhatt V, Oliveira M, Briand M, et al. Protective effects of dietary EPA and DHA on ischemia-reperfusion-induced intestinal stress. *J. Nutr. Biochem*. 2013;24: 104-111.
28. Liu FC, Tsai HI, Yu HP. Organ-protective effects of red extract, resveratrol, in oxidative stress-mediated reperfusion injury. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 2015: 568-634.

29. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;95: 27–42.
30. Miyamoto S, Mascio PD. Lipid Hydroperoxides as a Source of Singlet Molecular Oxygen. *Subcellular Biochemistry*. 2013: 3–20.
31. Orsu P, Murthy BV, Akula A. Cerebroprotective potencial of resveratrol through anti-oxidant and anti-nflammatory mechanisms in rats. *J. Neural. Transm (Vienna)*. 2013;120: 1217-1223.
32. Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, et al. Markers of inflammation. *Methods Mol Biol*. 2018;1803: 57-79.
33. Vanella KM, Wynn TA. Mechanisms of organ injury and repais by macrophages. *Annu Ver Physiol*. 2017;10(79): 593 – 617.
34. Lin ZL, Yu WK, Tan SJ, et al. Protective effects of terminal ileostomy against bacterial translocation in a rat modelo f intestinal ischemia/reperfusion injury. *World J. Gastroenterol*. 2014;20: 12905-17913.
35. Blijlevens NMA, Logan RM, Netea MG. Mucositis: from febrile neutropenia to febrile mucositis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;63(Supplement 1): 36–40.
36. Ong ZY, Gibson RJ, Bowen JM, et al. Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gatrointestinal mucositis. *Radiat Oncol*. 2010;5(22): 2 – 8.
37. Logan RM, Stringer AM, Bowen AM, et al. The role of pro-inflammatory cytokines in câncer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and citotoxic drugs. *Cancer Treat Ver*. 2007;33(5): 448-460.
38. Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, et al. Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut*. 2007;56(1): 130–139.
39. Lubbers T, Buurman W, Luyer M. Controlling postoperative ileus by vagal activation. *World. J. Gastroenterol*. 2010;16: 1683-1687.
40. Li Y, Yao J, Han C, et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, 2016;8(3): 167, 2016.
41. Costa LG, Garrick JM, Roquè PJ, et al. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016;2016: 1–10.

42. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*. 2008;585(2-3): 325–337.
43. Piovezana Bossolani GD, Silva BT, Colombo Martins Perles JV, et al. Rheumatoid arthritis induces enteric neurodegeneration and jejunal inflammation, and quercetin promotes neuroprotective and anti-inflammatory actions. *Life Sciences*. 2019.
44. Kim JE, Lee MR, Park JJ, et al. Quercetin promotes gastrointestinal motility and mucin secretion in loperamide-induced constipation of SD rats through regulation of the mAChRs downstream signal. *Pharmaceutical Biology*. 2018;56(1): 309–317.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Grupos experimentais e tratamento com quercetina (10mg/Kg). S grupo sham (falso operado); I grupo Isquêmico.

Grupos		AMS ^a	Tratamento
C	Não operado	-	Veículo
SC	Submetido à cirurgia	Não ocluída	Veículo
STQ	Submetido à cirurgia	Não ocluída	Quercetina
IC	Submetido à cirurgia	Ocluída	Veículo
ITQ	Submetido à cirurgia	Ocluída	Quercetina

a: Artéria Mesentérica Superior

Tabela 2. Anticorpos primários e secundários utilizados na imunomarcação para HuC/D⁺ e nNOS⁺.

Primário	Diluição	Empresa	Secundário	Diluição	Empresa
HuC/D Mouse	1:500	Invitrogen ® Cat#A21271	Anti-mouse (Alexa Fluor 488)	1:500	Invitrogen ® Cat#A21202
nNOS rabbit	1:500	Invitrogen ® Cat#6171	Anti-rabbit (Alexa Fluor 546)	1:500	Invitrogen ® Cat#A11010

Fig 1.

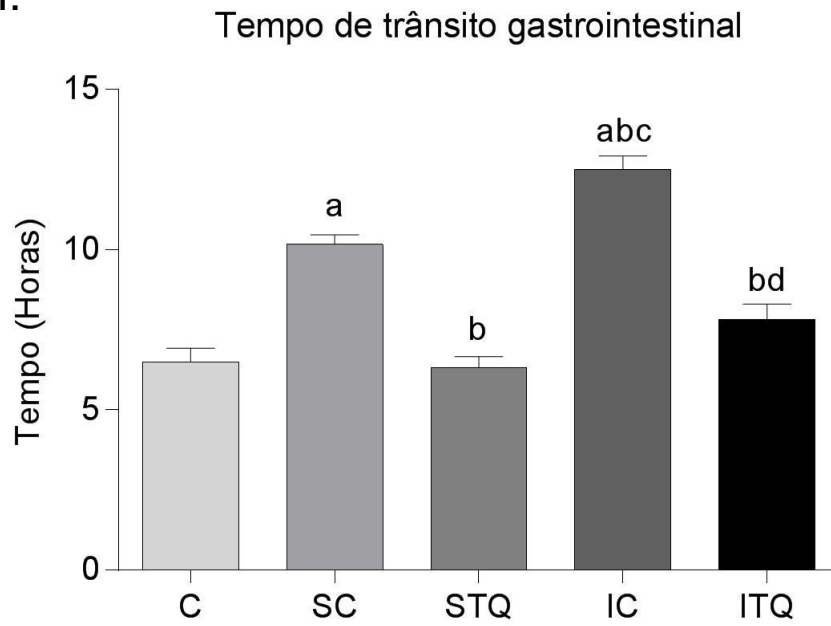


Figura 1. Tempo de trânsito gastrointestinal (horas) dos ratos dos grupos: **C** (controle), **SC** (sham controle), **STQ** (*sham* tratado com quercetina 10mg/kg), **IC** (isquêmico controle) e **ITQ** (isquêmico tratado com quercetina 10mg/kg). Resultados expressos como média \pm erro padrão ($n = 5$ /grupo). ^a: diferença significativa do grupo C; ^b: diferença significativa do grupo SC; ^c: diferença significativa do grupo STQ; ^d: diferença significativa do grupo IC.

Tabela 3. Ensaio bioquímico de estresse oxidativo para íleo. Grupos: **C** (controle), **SC** (sham controle), **STQ** (*sham* tratado com quercetina 10mg/kg), **IC** (isquêmico controle) e **ITQ** (isquêmico tratado com quercetina 10mg/kg). Resultados expressos como média ± erro padrão (n = 6/grupo).

PARÂMETROS AVALIADOS	C	SC	STQ	IC	ITQ
CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína)	0.46±0.07	0.51±0.11	0.41±0.03 ^b	0.66±0.08 ^{ac}	0.39±0.04 ^d
SOD (U SOD/mg de proteína)	0.18±0.008	0.22±0.016 ^a	0.19±0.01	0.22±0.01 ^a	0.15±0,005 ^{bd}
GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína)	3.94±0.46	3.93±0.39	3.0±0.46	3.9±0.3	3.3±0.61
GSH ($\mu\text{g}/\text{g}$ de tecido)	996.2±33.1	755.6±59 ^a	1177±61.4 ^b	756.9±53.87 ^{ac}	1144±43 ^{bd}
LOOH (mmol/mg de tecido)	68.1±2.1	72.0±2.3	65.7±1.7 ^b	73.5±1.7 ^{ac}	67.3±2.5 ^d
NAG (mD.O./mg de proteína)	0.08±0.003	0.11±0.01 ^a	0.09±0.007	0.10±0.004	0.09±0.006
MPO (mD.O./mg de proteína)	0.11±0.015	0.17±0.06	0.09±0.01	0.15±0.018	0.09±0.01

* ^a: diferença significativa do grupo C; ^b: diferença significativa do grupo SC; ^c: diferença significativa do grupo STQ; ^d: diferença significativa do grupo IC.

Tabela 4. Morfometria (μm) da parede intestinal do íleo de ratos. Grupos: **C** (controle), **SC** (sham controle), **STQ** (*sham* tratado com quercetina 10mg/kg), **IC** (isquêmico controle) e **ITQ** (isquêmico tratado com quercetina 10mg/kg). Resultados expressos como mediana e intervalo de confiança (n = 7/grupo).

	C	SC	STQ	IC	ITQ
Parede total	232.5 (226.6;231.8)	246 (235.6;241.3) ^a	238.5 (237.2;241.3) ^a	253.7 (243.9;252) abc	259.8 (258;263.2) abcd
Submucosa	14.12 (13.93;14.31)	13.96 (13.75;14.19)	13.44 (13.25;13.73) ^{ab}	15.14 (15.16;15.61) ^{abc}	13.18 (13.2;13.73) ^{abd}
Muscular	28.25 (27.47;28.45)	30.68 (29.98;31.02) ^a	31.68 (31.32;32.46) ^a	29.84 (29.96;31.32) ^{ac}	31.98 (31.49;32.63) ^{abd}
Altura dos vilos	110.7 (110.1;113.2)	117.5 (113.5;116.9) ^a	107.1 (106.2;109) ^{ab}	123 (119.3;123.7) ^{abc}	118.4 (118.3;122.1) ^{ac}
Largura dos vilos	22.16 (21.96;22.74)	21.41 (21.28;22.08)	22.79 (22.59;23.51) ^b	19.45 (19.42;20.18) ^{abc}	17.07 (17.36;18.23) ^{abcd}
Profundidade de cripta	47.03 (46.8;48.36)	42.87 (44.51;46.5) ^a	42.37 (41.83;23.21) ^{ab}	42.53 (41.72;43.13) ^a	44.44 (44.25;45.81) ^{acd}

* ^a: diferença significativa do grupo C; ^b: diferença significativa do grupo SC; ^c: diferença significativa do grupo STQ; ^d: diferença significativa do grupo IC.

Tabela 5. Densidade (neurônios/gânglio) e morfometria (μm^2) dos neurônios HuC/D⁺ e nNOS⁺ do íleo de ratos. Grupos: **C** (controle), **SC** (sham controle), **STQ** (*sham* tratado com quercetina 10mg/kg), **IC** (isquêmico controle) e **ITQ** (isquêmico tratado com quercetina 10mg/kg). Dados paramétricos expressos como média \pm erro padrão e não paramétricos como mediana e intervalo de confiança (n = 7/grupo).

	C	SC	STQ	IC	ITQ
Densidade HuC/D⁺	18.3 \pm 0.8	13.2 \pm 0.3 ^a	18.1 \pm 0.9 ^b	11.9 \pm 1 ^{ac}	15.4 \pm 0.3 ^d
Densidade nNOS⁺	6.9 \pm 0.3	4.7 \pm 0.3 ^a	7.0 \pm 0.6 ^b	4.2 \pm 0.1 ^{ac}	6.0 \pm 0.3 ^d
Morfometria HuC/D⁺	208.3 (210.7;225.3)	209.1 (214.7;229.5)	191.2 (197.7;211.4) ^{ab}	209.4 (225.5;242.8) ^c	245.3 (252;269.5) ^{abcd}
Morfometria nNOS⁺	219.9 (222.3;236.1)	220.7 (225.2;237.5)	211.4 (214.8;227.6)	229 (232.6; 246.7) ^c	216.7 (218.3;230.9) ^d

* ^a: diferença significativa do grupo C; ^b: diferença significativa do grupo SC; ^c: diferença significativa do grupo STQ; ^d: diferença significativa do grupo IC.

DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES

Instructions for Authors

Manuscripts submitted to Digestive Diseases and Sciences (DDS) should be concise, well organized, and clearly written. Acceptance of manuscripts will be based on originality and importance to the field of digestive diseases. Submitted manuscripts are reviewed by the editor-in-chief and associate editors and, in the majority of cases, by two or more experts in the field. The editors can choose to reject a manuscript without peer review if the manuscript is of insufficient quality or relevance to warrant acceptance.

Manuscripts worthy of further consideration but deemed inappropriate for the journal's readership can be transferred to the Springer Transfer Desk at the recommendation of the handling editor with the consent of the authors. The Transfer Desk will then seek to find the best fit among the hundreds of biomedical journals published by Springer. Manuscripts based on or describing the experimental or therapeutic use of complex mixtures of chemically undefined substances such as plant-derived extracts will be returned without further review.

Articles are checked for duplication. Articles with duplications considered excessive will not be published. If data from another publication is included, this should be clearly stated in the manuscript and referenced. In addition, how the submitted work differs from prior publications should be specifically stated.

The editors reserve the right to reject poorly written manuscripts regardless of scientific content. Submissions deemed of substantial scientific value but poorly written may be returned to the authors for editing by a professional service and/or a native English speaker. Springer reserves the right to copyedit accepted manuscripts. Proofs will be sent to the corresponding author for final approval and must be returned within 48 hours of receipt.

INQUIRIES

All inquiries should be addressed to the editor-in-chief or to the managing editor, preferably by email:

Editor-in-Chief

Jonathan D. Kaunitz, MD, FACG, AGAF

UCLA School of Medicine

Bldg. 114, 217E

West Los Angeles VAMC

Los Angeles, CA 90073

Managing Editor

Meghan Keeffe

Email: dds.journal@gmail.com

Fax: 415-383-8428

CATEGORIES OF MANUSCRIPTS

The editors will consider and publish the following categories of manuscripts,

- **Original Article:** articles of interest to its readership that appeal to the practicing gastroenterologists and scientists working in academic institutions and in industry who focus on the study of the digestive organs including the gastrointestinal tract, pancreas, and hepatobiliary system. Three major categories are welcome:

- 1) Medical Education and Practice for articles focused on the delivery of medical care, disease classification, health outcomes, and other aspects of health services research, and on educational topics such as issues concerning gastrointestinal fellowship programs

- 2) Basic/translational, which encompasses experimental animal research and research on clinical subjects or material using non-standard analyses and testing fundamental mechanisms

- 3) Clinical articles, which can include meta-analyses, clinical trials of any design, biomarker studies, and any other clinically-based research of interest to our readership. Industry-sponsored articles will be considered provided that the relationship is clearly disclosed in the manuscript. An original article deemed of

particular significance that is briefer than is usual may be reclassified as a brief report at the editor's discretion.

- **Review** (including systematic reviews and meta-analyses): Comprehensive and thoroughly referenced coverage of basic or clinical topics. Industry-sponsored reviews will be considered provided that the relationship to the sponsor is clearly disclosed in the manuscript.
- **Case Report:** in general, case reports are not encouraged; the editors will limit the number of case reports per issue and will only consider those reporting particularly novel and important clinical observations.
- **Correspondence:** concise opinions on papers published in DDS online within the past six months.

SPECIAL SECTIONS

The editors welcome proposals for articles addressing topics of interest to the journal's readership in the following categories. Proposed articles must receive approval by section editors prior to submission. Please email a brief summary (250 words or less) specifying the category, proposed title, and a bulleted summary of the content to the editorial office at dds.journal@gmail.com. Submitted full-length articles in these categories will be returned to the authors at the editor's discretion.

- **Mentored Reviews:** Reviews basic disease mechanisms or pathophysiology or of clinical topics. Mentored reviews must be coauthored by a trainee/postdoc/fellow and a faculty mentor.
- **Fellows and Young GIs Section:** a series of mini-reviews on the topics of education and training, with an emphasis toward trainees and young GIs, bringing to the forefront the evidence available for best practices, issues related to training programs, and other topics of interest to the most junior gastroenterologists.
- **Current Clinical Controversies:** Brief reviews addressing a controversial area of current interest to the GI community, providing incisive conclusions based on the best available evidence.

SUBMISSION

Manuscripts should be submitted online using Springer's manuscript submission and review system, Editorial Manager, at <http://dds.edmgr.com>. Editorial Manager supports a wide range of submission file formats:

- Manuscripts: Word, WordPerfect, RTF, TXT, and LaTeX
- Figures: TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript (Color art is FREE for both online and print publication and is encouraged in the interest of visual appeal and clarity.)

(Please note that PDF is not an acceptable file format for manuscripts or figures.)

Manuscript submission requires the uploading of at least one manuscript file (including references), but a cover letter, figures, figure legends, and tables may also be uploaded as separate files. Files should ideally be posted in the following order (order can be changed after uploading):

1. Cover letter
2. Manuscript
3. Tables
4. Figure legends (if separate)
5. Figures
6. Other

For all article types except correspondence, submission also requires the suggestion of four to six peer reviewers (experts in the topic area of the manuscript and not recent collaborators or from the same institution as the author[s]), including name, department, institution, and email address.

Once the manuscript is uploaded to Editorial Manager, the corresponding author will receive an email requesting approval of the PDF created from the source files. If not done immediately following upload, it is important to review and approve the PDF to initiate review by the editors.

Should any difficulties arise while submitting manuscripts online, please contact the responsible editorial assistant by clicking "Contact Us" in the Editorial Manager toolbar at the top of each page. Once submitted, a manuscript's progress through the review process may be tracked in real time.

MANUSCRIPT STYLE -- ALL MANUSCRIPTS

Titles should state the main findings of the article, not focus on design of the research, and should not exceed 120 characters (no spaces) in length. Do not use abbreviations in titles.

The title page should contain the title of the article, name(s) of author(s) and highest academic degree(s), department and institution from which the work originated, email and postal addresses of all authors, name of the corresponding author, acknowledgment of grant support, and disclosure of financial arrangements related to the research or assistance with manuscript preparation.

No more than one (1) corresponding author may be listed.

No more than one (1) first author may be listed.

See “Ethical Responsibilities of Authors” for information about author changes. Digestive Diseases and Sciences will only consider author additions BEFORE manuscript acceptance and only in special cases, e.g., when an author was added to conduct additional research in response to the comments of peer reviewers. All requests for author changes must be made by completing an authorship form (emailed by request), signed by all authors, which will be reviewed by the editor-in-chief and publishing editor.

Personal acknowledgments, if any, should be given in a separate section at the end of the article.

See “Disclosure of Potential Conflicts of Interest” below for details on including a conflict of interest and disclosure statement in the text of the manuscript.

Text should conform to accepted standards of American English style and usage. Before submitting an article to DDS, authors for whom English is a second language are encouraged to have their manuscripts reviewed and professionally edited by an individual whose native language is English. (Please see English Language Editing below.) All authors may also find the editor-in-chief’s style guide, “DDS Elementary Style: A Brief Guide for Authors” helpful toward improving the readability and impact of their manuscript.

<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10620-016-4223-1.pdf>

All manuscripts should be typed in 12-point font size and double-spaced with 1-inch margins. One space only should be used after periods and commas. Authors should retain a copy of all materials.

Keywords should express the precise content of the manuscript, as they are used for indexing purposes and should preferably be terms from the Index Medicus Medical Subject Headings (MeSH) list. Figure title and caption material should appear in the legend and not on the figure. Legends should be typed double-spaced on pages separate from the text. Figures should be numbered in one consecutive series in the order in which they are cited in the text. Please include sufficient information in the legends to interpret the figures without reference to the text.

Illustrations should be clear, with sharp contrast, especially where fine lines such as those of grids or traces are to be retained. Illustrations should be no larger than 8½ × 11 inches, but preferably of a size not needing enlargement or reduction. Non-traceable (raster) line-art and photographs should ideally be provided as TIFFs of at least 600 dpi resolution. Please provide traceable (vector) figures in EPS format. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Scanned line drawings and line drawings in BMP format should have a minimum resolution of 1200 dpi. Halftone photographs should be provided as TIFFs of at least 200 dpi resolution.

Tables should be double-spaced on separate pages, with the table number and table title centered above the table and explanatory notes below the table.

No specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. The grouping of images from different parts of the same gel, or from different gels, fields, or exposures must be made explicit by the arrangement of the figure (e.g., using dividing lines) and in the text of the figure legend. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if they are applied to the whole image and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g., changes to gamma settings) are not permitted.

References should be cited in the text by Arabic numerals enclosed in square brackets. Only literature that is published or in press (with the name of the journal) may be numbered and listed. Abstracts and letters to the editor may also be cited, but should ideally be less than three years old and identified as such after the title,

e.g., [Abstract] or [Letter to Editor]. The references section should be typed double-spaced on pages separate from the text and numbered consecutively in the order in which references are cited in text. Included are last names and initials of authors, title of article, name of publication, year published, volume, and inclusive pages. For references with more than six authors, the fourth and subsequent authors should be replaced with “et al.”; for references with between one and six authors all the authors should be listed. Abbreviations should conform to those used in Index Medicus. References must be verified by the authors against original documents.

We recommend the use of tools such as EndNote* or Reference Manager for reference management and formatting. For authors using EndNote, the following output style supports DDS formatting of in-text citations and reference list:

<http://static.springer.com/sgw/documents/945137/application/zip/SpringerVancouverNumber.zip>

The style and punctuation of the references should conform to the following examples (text enclosed in [I] symbols below, should be italicized in the manuscript):

- *Article*

Sandborn WJ, Tremaine WJ, Batts KP, et al. Fecal bile acids, short-chain fatty acids, and bacteria after ileal pouch–

anal anastomosis do not differ in patients with pouchitis. [I]Dig Dis Sci[I]. 1995;40:1471–1483.

- *Book*

Banks PA. [I]Pancreatitis[I]. New York, NY: Plenum Medical; 1979.

- *Contribution to a book:*

Creutzfeldt W. Endocrine tumors of the pancreas. In: Volk BW, Wellmann KF, eds. [I]The Diabetic Pancreas[I]. New

York, NY: Plenum Medical; 1977:551–590.

- *Electronic:*

ISI Web of Knowledge. Journal Citation Reports, 2007 JCR Science Edition. Available at:

<http://isiwebofknowledge.com>. Accessed June 20, 2008.

COPYRIGHT

Submission of a manuscript to Digestive Diseases and Sciences is a representation that the manuscript has not been published previously in any form, including symposia and proceedings of meeting, except in brief abstract form, and is not currently under consideration for publication elsewhere. 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 OpenChoice (<http://www.springeronline.com/openchoice/>), offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

MANUSCRIPT STYLE -- BY ARTICLE TYPE

Original articles should be arranged as follows: Title Page, Abstract, Keywords, Introduction, Methods, Results, Discussion, References, Tables, Figure Legends, and figures. There is no maximum for word count, figures, tables, or references. Manuscripts should include a structured abstract of no more than 250 words organized as applicable into the following categories: Background, Aims, Methods, Results, and Conclusions. Abbreviations, footnotes, and references should not be used in the abstract, with the exception of standard, repetitive abbreviations such as HCV, GERD, etc. A list of four to six keywords should be provided directly below the abstract. Reports of prospective clinical trials with a control or comparison group should be presented according to the CONSORT guidelines (<http://www.consort-statement.org> or JAMA. 2001;285:1987-1991). The registry URL (e.g., <http://www.clinicaltrials.gov> in the United States) and clinical trial number should be included in the body of the manuscript in the methods section. Meta-analyses should conform to the PRISMA guidelines (see below).

Review articles should include a general abstract of no more than 250 words followed by four to six keywords. There is no maximum for word count, figures, tables,

or references. All structured reviews and meta-analyses should adhere to the guidelines published by the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) group (Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. PLoS Med. 2009 Jul 21;6); <http://www.prisma-statement.org>.

Case reports should not include an abstract and should not exceed 1,200 words, including title, author info, and no more than ten references. Case reports should include four to six keywords and ideally a short introduction and brief discussion, the latter highlighting key lessons from the case. (Case series can be submitted as article type Case Report or Original Article, depending in part on the number of cases being reported.)

Correspondence should be limited to 500 words and should relate to papers published in DDS online within the past six months.

Abbreviation

The correct abbreviation of Digestive Diseases and Sciences for abstracting and indexing purposes is: Dig. Dis. Sci. or Dig Dis Sci.

ISSN & EISSN

The international standard serial number (ISSN) for Digestive Diseases and Sciences is 0163-2116, and the electronic international standard serial number (EISSN) is 1573-2568.

ENGLISH LANGUAGE EDITING

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review.

Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

- [English language tutorial](#)
- [Nature Research Editing Service](#)
- [American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted. If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

ETHICS AND RESPONSIBILITY 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.

- **Important 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.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy related to the research may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

<https://www.springer.com/gp/authors-editors/journal-author/journal-author-helpdesk/publishing-ethics/14214>

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form (s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z. If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. This attestation should appear in the methods section of the manuscript. In countries where such mechanisms for approval do not exist, authors are required to indicate that the research was carried out in accordance with the Helsinki Declaration. A similar assurance is required to document that animal experimentation was performed under appropriate circumstances.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. "

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required. ”

STATEMENT ON THE WELFARE OF ANIMALS

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in in the text before the References section: **Ethical approval:** “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. ”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted. ”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors. ”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors. ”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors. ”

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave

their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or

parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:|

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. ”If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included: “Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article. ”

ETHICS AND DISCLOSURE POLICIES

Material submitted to Digestive Diseases and Sciences (DDS) must be original and not published or submitted for publication elsewhere. Authors who have related material under consideration or in press elsewhere should upload a clearly marked copy at the time of their submission to DDS. If part of a contribution has appeared or will appear elsewhere in press, the author must specify the details in the covering letter accompanying the DDS submission. Duplicate publication (by the same author) and plagiarism (by a different author) must be avoided in accordance with “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” developed by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>). Each author must have participated substantially in the work and approve the final version of the manuscript. Where applicable, the following must be disclosed: all financial arrangements (research support, stock ownerships, equity interest, consultancies, or major honoraria) with a company whose product figures prominently in the manuscript; a statement of specific funding support; and identification of third party

individuals who provided writing assistance. Reports of clinical trials with a control or comparison group should be presented according to the CONSORT guidelines (<http://www.consort-statement.org> or JAMA. 2001;285:1987-1991). The clinical trial registry URL (e.g., <http://www.clinicaltrials.gov> in the United States) and clinical trial number should be included in the body of the manuscript in the methods section.